

ESCOLA DE ENGENHARIA



Desenvolvimento de nanomatrizes híbridas multifuncionais: utilização como sistemas inteligentes para liberação de fármacos e substratos para construção de (bio)sensores eletroquímicos.

SÃO PAULO, 2018

Thiago da Cruz Canevari

Resumo

Este relatório tem como objetivo descrever a síntese, caracterização e aplicação das matrizes nanoestruturadas multifuncionais, constituídas por nanomateriais híbridos à base de nanopartículas de carbono, (Cdots, ou seja, quantum dots de carbono) e espécies de óxido de grafeno (na forma oxidada e reduzida). Além disso, foram sintetizados também nanopartículas magnéticas dos óxidos metálicos do tipo M_xO_y ($M=Fe^{3+}$) que foram ancoradas nas superfícies dos Cdots. As diferentes combinações destes nanomateriais foram utilizadas como substrato para modificarem a superfície dos eletrodos impressos de carbono visando desenvolver (bio)sensores eletroquímicos para nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), em sêrum humano e o interferente endócrino bisfenol em água de garrafa. Os nanomateriais híbridos Cdots- Fe_3O_4 e óxido de grafeno reduzido por Cdots, rGO-Cdots, foram caracterizados por microscopia eletrônica de alta resolução (HR-TEM), espectroscopia na região Ultravioleta-visível (Uv-vis), espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS), espectroscopia Raman e as técnicas eletroquímicas de voltametria Cíclica e voltametria de pulso diferencial. O eletrodo de carbono impresso modificado com o nanomaterial híbrido magnético Cdots- Fe_3O_4 apresentou boa performance para a determinação da biomolécula de NADH com um limite de detecção de 20 nmol L^{-1} . O efeito dos principais interferentes biológicos (AA, DA e UA) na determinação da biomolécula de NADH também foi estudado e não apresentaram alterações significativas na determinação de NADH. Além disso, este eletrodo foi utilizado para determinar NADH em sêrum humano. O nanomaterial híbrido, rGO-Cdots, também serviu de substrato para modificação do eletrodo impresso de carbono no qual também apresentou excelente performance para determinação do interferente endócrino bisfenol in PBS, pH 7 com boa sensibilidade ($189.49 \mu\text{mol L}^{-1}$) e limite de detecção igual de 1 nmol L^{-1} . O eletrodo modificado também apresentou ótima performance mesmo na

presença dos principais interferentes fenólicos e foi utilizado para determinar bisfenol em água mineral armazenada em garrafa plástica.

Palavras-chave: NADH, Cdots, Fe₃O₄, eletrodo de carbono impresso, Óxido de grafeno reduzido, (bio)sensores eletroquímicos, interferentes endócrinos, nanomateriais híbridos.

1. Introdução

O desenvolvimento de nanomateriais híbridos multifuncionais, está cada vez mais crescente, devido a possibilidade destes nanomateriais poderem ser empregados em distintas áreas, como por exemplo no desenvolvimento de sensores eletroquímicos e como agentes carreadores de fármacos.

Baseado neste contexto, as nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄NP) estão sendo muito utilizadas na confecção de (bio)sensores eletroquímicos [1-4] devido possuírem propriedades magnéticas, o que favorece uma modificação mais uniforme e eficiente da superfície do eletrodo, quando auxiliado por um pequeno ímã externo, possuírem grupos funcionais em sua superfície, principalmente grupos hidroxilas, favorecendo a modificação de sua superfície por outras espécies, além de facilitarem o processo de transferência de elétrons na interface eletrodo-solução.

Nanomateriais, a base de carbono, estão sendo estudados cada vez mais desde a descoberta do grafeno devido a possibilidade de formação de diferentes nanomateriais com tamanhos distintos e estruturas cristalinas diferentes. Os principais nanomateriais de carbono são fulerenos e nanopartículas de carbono, também denominados de quantum dots de grafeno ou quantum dots de carbono, que apresentam estruturas 0 D, nanotubos de carbono com estrutura 1 D, grafeno com estrutura 2 D e grafite com estrutura 3 D [5].

As diferentes estruturas conferem aos nanomateriais diferentes propriedades físico-químicas que influenciam diretamente na aplicação. Dentre os diferentes nanomateriais a base de carbono, as diferentes espécies de grafeno denominadas de óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO) estão cada vez mais sendo estudados devido a facilidade de obtenção a partir do grafite, em comparação ao grafeno, além de possuírem facilidade de modificação de sua superfície [6,7]. A diferença entre GO e rGO está na composição da folha de grafeno, que possui geometria sp^2 , que faz parte de ambas espécies. O GO possui muitos grupos funcionais, fruto do processo de oxidação do grafite, fazendo com que surjam muitos defeitos nas folhas de grafeno caracterizados pela mudança de geometria do Csp^2 para $C-O sp^3$. Esta mudança faz com que o GO apresente alterações significativas em suas propriedades condutoras sendo muitas vezes considerados isolantes [8]. Sendo assim, o restabelecimento das propriedades condutoras caracterizado pelo aumento de carbonos com geometria sp^2 , é realizado por meio do processo de redução do GO dando origem a espécie denominada rGO. Este processo pode ser realizado por diversas rotas, tais como, utilização de redutores químicos [9,10], térmico [11], eletroquímica [12], Microondas [13], plasma [14] e ultrassom [15]. É importante ressaltar que cada processo de redução irá originar rGO com propriedades diferentes. Porém, a utilização apenas de nanopartículas como agentes redutores do GO não tem sido reportada. Devido ao rGO apresentar excelentes propriedades, tais como boa condutividade elétrica, tem sido muito empregado no desenvolvimento de (bio)sensores eletroquímicos [16,17].

Quantum dots de carbono, também conhecido como C-dots, é uma nova classe de nanopartículas de carbono, com estrutura 0D e formato semi-esférico, estão sendo muito utilizados em diversas áreas[18-20] devido possuir como principais características baixa toxicidade, boa solubilidade em água, biocompatibilidade, além de possuírem excelentes

propriedades fluorescentes, em virtude de apresentarem pequeno tamanho, menores que 10 nm, que favorece o surgimento de efeitos de confinamento quântico. É importante ressaltar que a utilização dos C-dots na preparação de (bio)sensores eletroquímicos ainda é pouco explorada, porém a modificação da superfície de diferentes eletrodos convencionais, tais como, carbono vítreo, ouro e platina, vem sendo explorada devido os C-dots apresentarem diferentes grupos funcionais, o que favorece a ligação com outras espécies, além de favorecer o processo de transferência de elétrons na superfície do eletrodo melhorando suas propriedades eletrocatalíticas [21,22]. As nanopartículas de carbono (Cdots) também têm sido utilizadas como agentes redutores de nanopartículas metálicas [23], além de serem utilizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos [24]. Tal característica das nanopartículas de carbono possivelmente é possuírem o bulk composto por carbonos sp^2 , superfície com diferentes grupos funcionais, principalmente grupos carboxílicos e hidroxilas, sendo que quanto mais grupos funcionais existirem na superfície menor é a separação energética entre os orbitais de fronteira homo-lumo [25,26].

Baseado neste contexto, este trabalho mostra a ligação das nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4 -mag) com os C-dots no qual foram utilizados para modificar a superfície do eletrodo impresso de carbono, com auxílio de um ímã externo, e utilizado para determinação da biomolécula de NADH e também mostra a redução do GO apenas pela incorporação de nanopartículas de carbono que depois será utilizado no desenvolvimento de um sensor eletroquímico para o bisfenol A.

1.1 Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e interferente endócrino bisfenol

A forma reduzida da molécula denominada nicotinamida adenina dinucleotídeo, também conhecida por NADH, é uma coenzima muito importante devido mediar centenas de reações biológicas vitais, tais como, glicólise, ciclo de Krebs, além da razão NADH/NAD indicar a presença de algumas alterações nos organismos [27]. A ausência de NADH nos seres vivos irá resultar na deficiência de energia e conseqüentemente na produção de ATP. Desta forma, a determinação desta biomolécula é muito importante e comumente é realizada por meio eletroquímico, no qual são empregados diversos eletrodos modificados com diferentes materiais, tais como, SWCNTs, óxido de grafeno oxidado e reduzido, polímeros entre outros [28]. É importante ressaltar, que os eletrodos modificados apresentam como vantagens sobre os eletrodos convencionais, tais como ouro (Au), platina (Pt) e Carbono vítreo (GCE) [29,30] realizar a eletrooxidação em potenciais menos positivos e possuir maior sensibilidade devido apresentarem melhor cinética de transferência de elétrons na interface eletrodo-solução. A determinação eletroquímica apresenta vantagens em relação a outros métodos analíticos, tais como espectroscopia de massas, cromatografia [31] e fluorescência [32] devido não necessitar de tratamento prévio das amostras, poder ser utilizada em análises *in situ*, além de apresentar alta sensibilidade.

Bisfenol A é uma substância química muito utilizada como monômero na síntese de diversos polímeros [33]. Porém, o bisfenol A é muito tóxico para os seres vivos sendo classificado como interferente endócrino, capaz de substituir muitos compostos biológicos essenciais causando sérios danos biológicos além de favorecer o surgimento de câncer nos seres humanos [34]. É importante ressaltar que o bisfenol A não é degradado pelo sistema de tratamento de esgoto podendo assim atingir os leitos dos rios e

fontes naturais de água. Diferentes métodos analíticos são empregados para determinar o bisfenol A, tais como, cromatografia [35], fluorescência [36], calorimetria [37], Uv-vis [38] e eletroquímico [39]. Sendo assim, também é importante o desenvolvimento de novos nanomateriais que possuem boas atividades eletrocatalíticas para determinar o bisfenol A.

2 Experimental

2.1.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de alta pureza: FeCl₃ (Aldrich), Fe(NO₃)₂.7 H₂O (Aldrich), 1-propanol P.A (Losco Chemical), KOH (Synth), NADH (Aldrich), Bisphenol A (Aldrich), Hidroquinona (Aldrich), catecol (Aldrich), resorcinol (Aldrich), pó de grafite 92% (Mercadocar), ácido sulfúrico 98% (Synth), ácido clorídrico 37% (Synth), Permanganato de potássio (Nuclear), Peróxido de hidrogênio 30% (CAAL). Tampão fosfato (PBS, 0.1 mol L⁻¹, pH 7.0) preparado a partir de KH₂PO₄ (Aldrich) e NaOH (Synth).

2.1.2 Síntese das nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄.

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Fe₃O₄) foram sintetizadas empregando o método de co-precipitação de acordo com o seguinte procedimento [40] modificado: Primeiramente foi preparada 600 mL de uma solução aquosa por meio da adição 0.0295 mol de FeCl₃ juntamente com 0.0155 mol de Fe(NO₃)₂.7 H₂O que servirão como fontes de Fe^{III} e Fe^{II} respectivamente. Esta solução foi desaerada com N₂ por 40 min sob agitação e em seguida foi adicionado 5 g de KOH e a solução foi mantida sob agitação por 1h. Após este período, adicionou 5 mL de tetrabutilamônio e deixou agitando por mais 10 min e as nanopartículas de Fe₃O₄ foram separadas utilizando um ímã e lavadas

com 2 porções de acetona e 2 porções de água. O produto formado será denominado como Fe₃O₄-mag.

2.1.3 Incorporation of Cdots nanocrystalline on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles.

As nanopartículas de carbono, também conhecidos como C-dots, sintetizados previamente [41] foram incorporados na superfície das nanopartículas Fe₃O₄-mag de acordo com o seguinte procedimento: 2 g do nanomaterial Fe₃O₄-mag foram dispersos em 5 mL da solução contendo C-dots, obtidos com tempo de síntese de 8,5h. Esta mistura foi colocada em banho de ultrassom por 30 min e deixado em repouso por 15 dias. A incorporação dos Cdots na superfície do material Fe₃O₄-mag ocorreu devido ambos materiais possuírem grupos funcionais livres na superfície, tais como hidroxilas e grupos carboxílicos. O material obtido será denominado Fe₃O₄-mag/C-dots.

2.3 Preparação do óxido de grafeno (GO).

A síntese do óxido de grafeno (GO) foi realizada em diferentes etapas empregando o seguinte procedimento [42] com algumas modificações: 5g de pó de grafite foram dispersos em um béquer contendo 500 mL de ácido sulfúrico 98%, à temperatura ambiente, empregando um agitador mecânico. Após a mistura permanecer 10 minutos sob agitação, foi adicionado 1g de KMnO₄. A mistura adquiriu uma coloração verde devido a formação do óxido de manganês. Em seguida, foram adicionadas 4 porções adicionais de KMnO₄ (1 g cada) até a cor verde da solução ser diminuída, indicando que o agente oxidante foi consumido. Após este procedimento de oxidação, foi adicionado lentamente 800 mL de água deionizada gelada, devido tal procedimento ser extremamente exotérmico. Após este procedimento, a mistura permaneceu por 30 minutos sob agitação e, em seguida, foram adicionadas algumas gotas de peróxido de hidrogénio até a cor da mistura passar de castanho-avermelhada para amarela. Um produto amarelo precipitou e

o sobrenadante era incolor e límpido. Em seguida, o produto amarelo foi separado e disperso em 500 mL de solução de ácido clorídrico 5% e a nova mistura foi deixada sob agitação por 20 minutos. Após este procedimento, a mistura foi mantida em repouso por 24 horas, resultando na sua completa decantação. Após esta decantação, o produto obtido foi diluído em 500 mL de água deionizada e mantida sob agitação durante 30 minutos e, em seguida, a mistura foi deixada em repouso mais 24 horas até completa decantação. O sólido obtido foi separado por centrifugação a 4100 rpm. Repetiu-se este procedimento por 6 vezes e observou-se que o sobrenadante não se apresentava incolor, assim sendo optou-se por não descartar e sim armazenar em um frasco de vidro para posterior análise. Esta solução foi denominada de solução aquosa de GO.

2.4 Processo de redução do óxido de grafeno.

A transformação do óxido de grafeno (GO) em óxido de grafeno reduzido (rGO) ocorreu por meio da mistura de 100 mL de solução aquosa de GO com 10 mL de solução alcóolica contendo nanopartículas de carbono (NPC) obtidas por meio da técnica eletroquímica de cronoamperometria, empregando eletrodos de Ouro de 2 x 2 cm [41]. Esta mistura ficou em repouso por 24 h dando origem ao nanomaterial rGO-CNPs. É importante ressaltar que não foi adicionado nenhum agente redutor externo à mistura, como também não foi empregada nenhuma energia adicional, por exemplo, aquecimento, ultrassom, plasma ou foto irradiação, sendo que a redução do GO ocorreu somente pela incorporação das nanopartículas de carbono. É importante ressaltar que o processo de redução do GO pela incorporação das nanopartículas de carbono ocorre devido a presença de elétrons e buracos na estrutura de carbono sp^2 - sp^3 juntamente com o efeito de confinamento quântico [43].

2.5 Equipamentos e medidas eletroquímicas.

A difração de raios-X pelo método pó (DRX) foi realizado com objetivo de estudar a estrutura dos nanomaterial magnético Fe₃O₄-mag e Fe₃O₄-mag/C-dots. A medida foi realizada, a temperatura ambiente, em um difratômetro Bruker D2 Phaser com fonte de radiação Cu K α ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) com deslocamento 2θ variando entre 5 e 60°.

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HR-TEM), do Fe₃O₄-mag/C-dots e rGO-CNPs foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL, operando a 200 kV. As amostras dos nanomateriais magnéticos foram dispersas em 1-propanol e rGO-CNPs em isopropanol, sendo em seguida, esta solução foi gotejada em uma grid de cobre coberta com filme ultrafino de carbono.

A espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) do nanomateriais Fe₃O₄-mag/C-dots e Fe₃O₄-mag foram realizadas em um equipamento VSW HA 100 contendo um analisador hemisférico de elétrons usando um ânodo de Alumínio com fonte de raios - X operando a 12 KeV e 15 mA. A correção das energias de ligação foi realizada por meio da linha de referência C1s do carbono que foi fixado em 284,6 eV.

Os espectros de absorção na região UV-vis, dos nanomateriais Fe₃O₄-mag e Fe₃O₄-mag/C-dots, dispersos em 1-propanol, e rGO-CNPs foram obtidos em um espectrômetro Hewlett-Packard HP-8453 A, utilizando uma cubeta de quartzo.

As propriedades magnéticas dos nanomateriais Fe₃O₄-mag e Fe₃O₄-mag/C-dots foram obtidas a temperatura ambiente, em campos magnéticos variando entre ± 10 kOe, por meio de um magnetômetro de amostra vibratório (Princeton Applied Research, modelo 530).

Os espectros Raman dos nanomateriais rGO-CNPs foram obtidos por meio do equipamento raman confocal WITec alpha-300R, no qual os nanomateriais foram dispersos em uma placa fina de silício e secos a temperatura ambiente. As medidas foram realizadas com excitação da fonte de laser em 532 nm.

As medidas eletroquímicas foram realizadas por meio de um potenciostato/galvanostato, modelo 128 N, da Metrohm Autolab BV, no qual foram utilizadas as técnicas de voltametria de pulso diferencia e voltametria cíclica. A cela eletroquímica usada nas medidas eletroquímicas é composta pelo eletrodo de trabalho de carbono impresso (Dropsens), que foi modificado pelos nanomateriais rGO-CNPs, eletrodo auxiliar constituído de fio de platina e eletrodo de referência de Ag/AgCl (3M). O eletrodo de trabalho de carbono impresso (Dropsens) modificado pelos nanomateriais Fe₃O₄-mag/C-dots teve um pequeno ímã acoplado na parte externa do eletrodo, por meio de uma fita adesiva, com objetivo de melhorar a dispersão do nanomaterial na superfície do eletrodo. Todas as medidas foram realizadas em 20 mL de solução tampão fosfato, pH 7.0. Solução padrão etanólica de bisfenol A, na concentração 10 mM, foi preparada diariamente antes das medidas. As medições de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foram realizadas para os nanomateriais Fe₃O₄-mag, Cdots e Fe₃O₄-mag/C-dots utilizando equipamento de potenciostato / galvanostato (PGSTAT-204) contendo módulo FRA, utilizando solução de KCl 0,1 M contendo íons de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} na concentração de 5 mM. O ajuste dos espectros de impedância foi feito pelo software ZView 2.

Sendo assim, a partir dos nanomateriais Fe₃O₄-mag, Cdots, GO e rGO foram desenvolvidos, dois trabalhos distintos intitulados:

- Quantun dots de carbono ligados a nanopartículas de magnetita confinados magnéticamente em eletrodos de carbono impressos e sua performance como sensor eletroquímico para NADH.

- Óxido de grafeno reduzido por incorporação de nanopartículas de carbono esférico: desenvolvimento de um sensor eletroquímico para o interferente endócrino bisfenol A.

É importante ressaltar que o uso dos nanomateriais híbridos multifuncionais, como agentes carregadores de fármacos, ainda estão sendo executadas.

3. Quantun dots de carbono ligados a nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄-mag) confinados magnéticamente em eletrodos de carbono impressos e sua performance como sensor eletroquímico para NADH

3.1 Resultados e discussão

3.2 Caracterização dos nanomateriais híbridos Fe₃O₄-mag e Fe₃O₄-mag/Cdots.

A Figura 1 mostra os difratogramas de raios-X dos nanomateriais Fe₃O₄-mag e Fe₃O₄-mag/Cdots. Como pode ser visto, o espectro de difração dos nanomateriais apresenta diferentes valores de 2θ , sendo por volta de 30,15; 35,6; 43,25; 53,64; 57,3; 62,8 que estão relacionados, respectivamente, com os planos (200, 311, 400, 422, 511 e 440) for the magnitite (Fe₃O₄), de acordo com JCDS cards No. 72-2303, [44,45], caracterizando a perfeita formação das nanopartículas magnéticas Fe₃O₄. A ausência dos deslocamentos 2θ por volta de 21,22; 26,38; 33,15 indicam que tanto hematita quanto goetita, Fe(OH)₃ e oxohidróxidos de ferro não foram formados durante o processo de síntese das nanopartículas magnéticas Fe₃O₄-mag. [40]. O nanomaterial magnético contendo Cdots ancorados na superfície, Fe₃O₄-mag/C-dots, apresentou espectro de difração praticamente semelhante ao Fe₃O₄-mag, com exceção dos picos com valores de 2θ por volta de 18,3, 28,3; 40,5 e 50,2. O pico com baixa intensidade, com valor de 2θ por volta de 18,3, corresponde ao plano (103) do grafite desordenado [5] comprovando a incorporação dos C-dots no nanomaterial magnético (Fe₃O₄-mag/C-dots). Os picos com valores de 2θ por volta de 28,3; 40,5 e 50,2, provavelmente, correspondem aos planos

crystalinos dos sais de potássio, que foi utilizado na forma de KOH, na síntese eletroquímica dos C-dots [41].

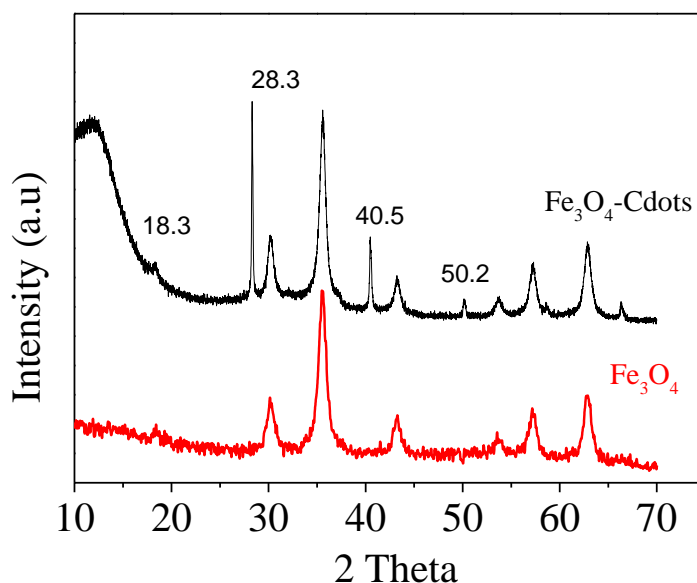


Figura 1: Espectro de difração dos nanomateriais Fe₃O₄-mag e Fe₃O₄-mag/Cdots.

As micrografias de HR-TEM foram obtidas com objetivo de estudarmos a microestrutura e a forma dos nanomateriais Fe₃O₄-mag e Fe₃O₄-mag/C-dots, como mostrado na Figura 2. Como pode ser visto na Figura 2a, os nanomateriais Fe₃O₄-mag são cristalinos, esféricos e possuem tamanhos de cristalitos maiores que 20 nm com distância interplanar de 0.29 nm. A distância interplanar de 0.29 nm corresponde aos planos (220) da estrutura de espinélio apresentada pelo Fe₃O₄ [46]. A Figura 2b mostra as que os C-dots, como preparado, possuem tamanhos menores que 5 nm e são cristalinos com distancia interplanar de 0,2 nm, correspondente ao plando de difração (102) do grafite sp². A Figura 2c, mostra claramente que ocorreu uma pequena aglomeração das nanopartículas de Fe₃O₄-mag, em virtude de apresentarem diâmetros maiores que 50 nm, correspondendo a combinação de 3 ou mais nanopartículas de Fe₃O₄-mag. Isto ocorreu possivelmente devido à alta reatividade apresentada pela superfície das nanopartículas magnéticas juntamente com a ausência de moléculas complexantes para proteger a

superfície e evitar a aglomeração. Outra informação importante, obtida por meio das micrografias da Figura 2c, é que os C-dots estão incorporados na superfície das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}$ (dentro das nano esferas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}$) devido ambos nanomateriais possuírem grupos funcionais em suas superfícies. Estas informações estão em concordância com as análises de XPS e Uv-Vis.

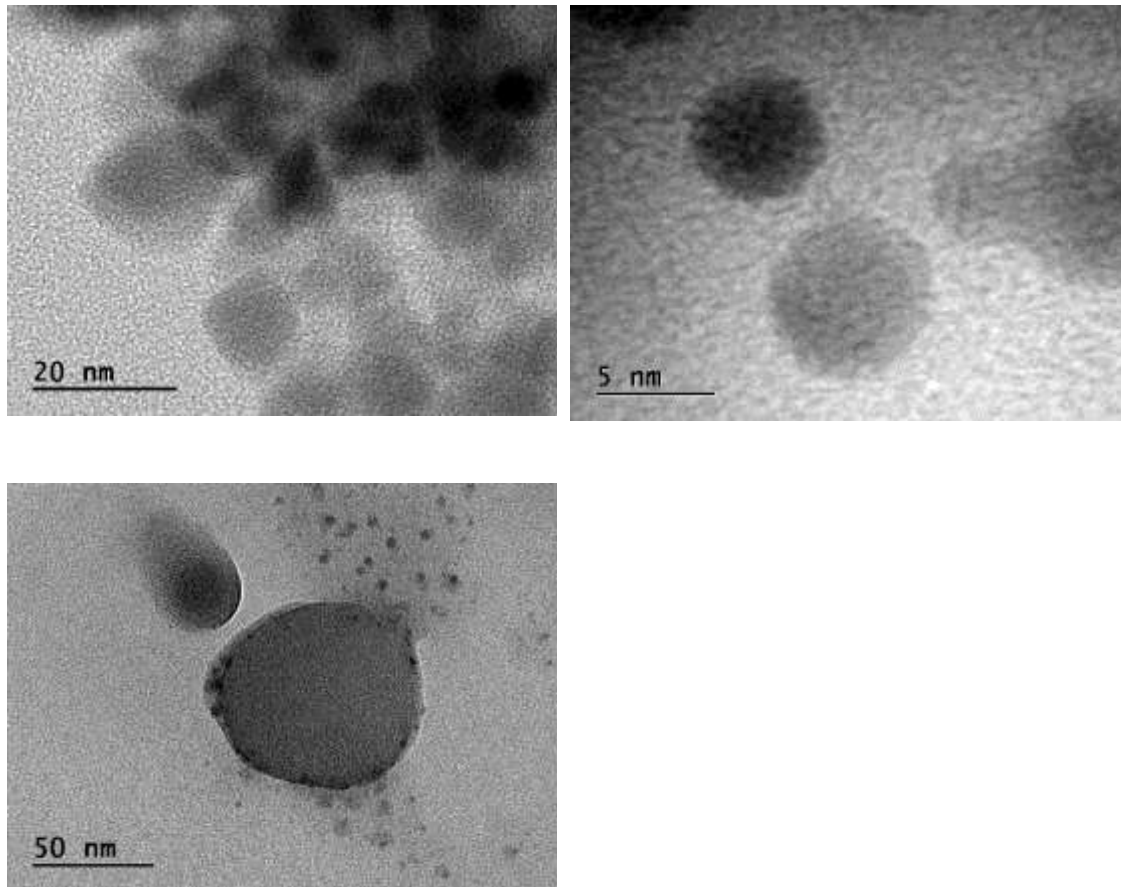
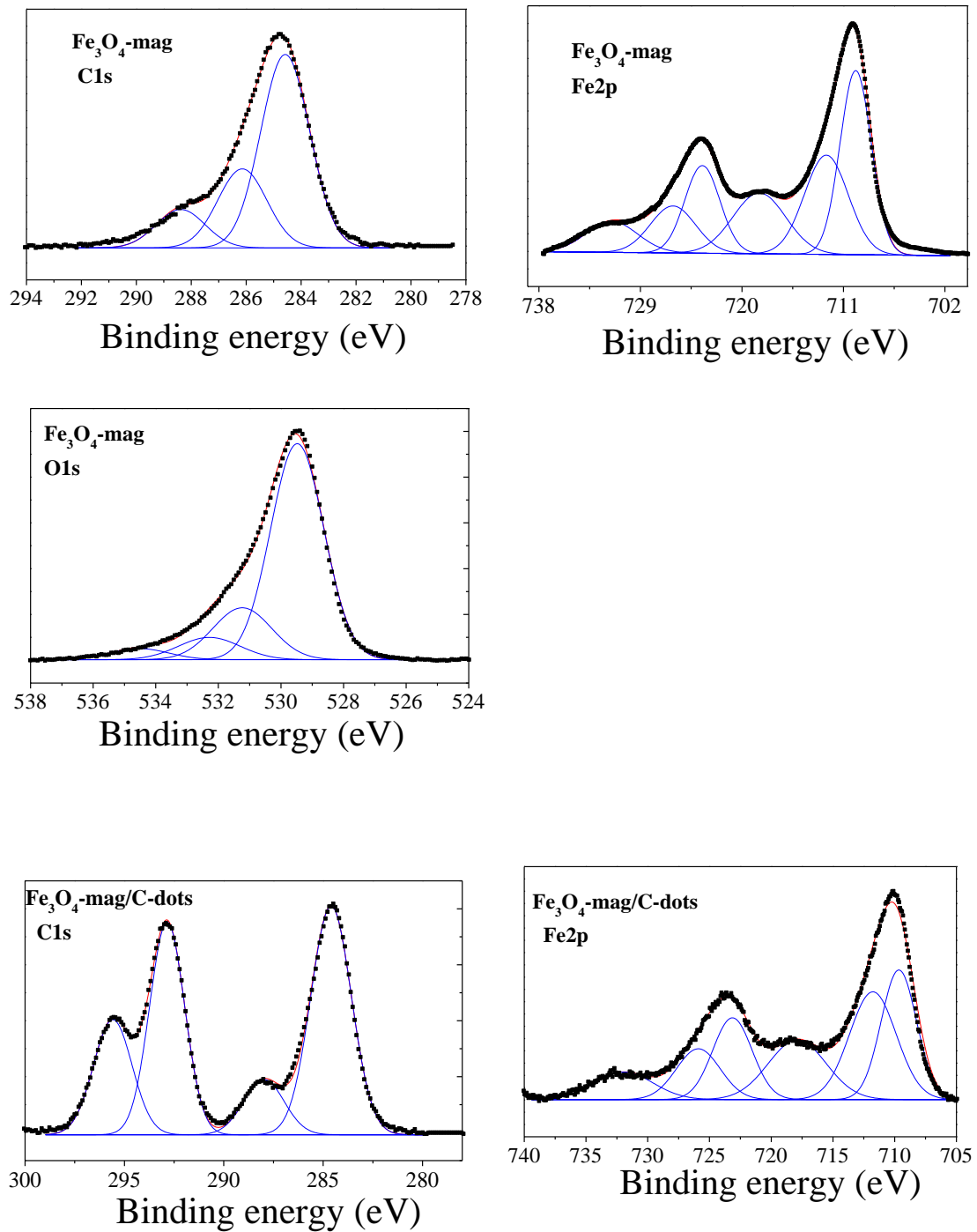


Figura 2: a) Micrografias de HR-TEM das nanopartículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}$ e b) C-dots como preparado e c) nanopartículas magnética contendo C-dots incorporados ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag/C-dots}$).

O ambiente químico dos nanomateriais $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag/C-dots}$ foram investigados empregando a espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS), como mostrado na Figura 3. Esta técnica foi utilizada para obtermos o nox dos átomos de ferro

que compõem a estrutura de espinélio da magnetita e também confirmar a ligação química entre as nanopartículas Fe_3O_4 -mag com C-dots.



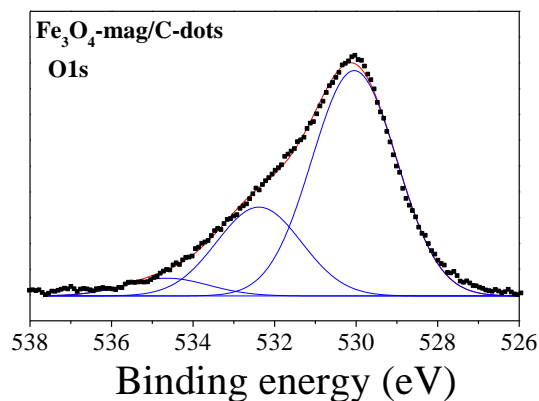


Figura 3: Espectros fotoeletrônicos de raios-X (XPS) dos nanomateriais $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag/C-dots}$.

Como pode ser visto, as componentes spin-orbita $\text{Fe}_{1/2}$ e $\text{Fe}_{3/2}$ mostram que existem 6 ambientes distintos para os átomos de ferro que se apresentam na forma de Fe^{II} e Fe^{III} . A presença dos átomos de ferro em diferentes estados de oxidação, em ambos nanomateriais $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag/C-dots}$, são frutos do processo de síntese denominado co-precipitação [40] e são comprovados pelos diferentes valores de energia de ligação.

Os valores das energias de ligação, em eV, das componentes spin-orbita para o nanomaterial $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag/C-dots}$, por volta de 709.66017 e 725.90344 (corresponde ao átomo de Fe^{II}), 711.76751 e 723.1417 (corresponde ao átomo de Fe^{III}) e 717.89211 e 731.94988 (corresponde ao átomo Fe^{III} em Fe_3O_4) [47-49]. A ausência de energia de ligação por volta de 707 eV comprova a ausência de ferro metálico. Os menores valores das energias de ligação para o átomo de ferro presentes no nanomaterial $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag/C-dots}$ em comparação com o nanomaterial $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}$, é possivelmente devido a presença de átomos de carbono mais eletronegativo provenientes dos C-dots.

A presença de átomos de carbono, juntamente com seus respectivos grupos funcionais, pode ser observada nos sinais XPS mostrados para $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-$

mag/C-dots, respectivamente. Parecem quase preservados nos Fe₃O₄-mag/C-dots, no entanto, um novo pico pode ser observado em 287,98 eV, devido à presença de pontos C ancorados na superfície MagNP. As energias de ligação para os Cdots indicam uma configuração distinta para os átomos de carbono, presumivelmente de natureza sp². Desta forma, é plausível que os Cdots possam atuar como receptores π, facilitando as reações de transferência de elétrons ao eletrodo [50,51], devido possuírem menor densidade eletrônica em comparação com as nanopartículas de Fe₃O₄-mag. O valor de energia de ligação, em eV, por volta de 284.59988 (corresponde ao carbono a forma de (C=C/C-C com hibridização sp² e hibridização sp³).

É importante ressaltar que o nanomaterial Fe₃O₄-mag, obtido na ausência de Cdots ligados a superfície, também apresenta átomos de carbono, com energia de ligação, C1s, para o carbono por volta de 285 eV, devido serem recobertos por tetrabutyl amônio para evitar a agregação das nanopartículas de Fe₃O₄. Sendo assim, a presença de carbono com energias de ligação por volta de 286.14152 eV (corresponde a ligação C-OH) possivelmente devido a presença de grupos -OH na superfície do nanomaterial Fe₃O₄-mag que liga-se ao carbono e a energia por volta de 288.38509 eV (corresponde a ligação O-C=O) [52].

A energia de ligação da componente O1s, para o nanomaterial Fe₃O₄-mag/C-dots, por volta de 530.04 eV caracteriza também a ligação do ferro com oxigênio ligado ao carbono [53]. Já a energia de ligação por volta de 532,38 eV caracteriza a ligação do ferro com oxigênio, em espécies OH, caracterizando a presença de espécies Fe-OH na superfície dos nanomateriais Fe₃O₄-mag/C-dots.

Os espectros Uv-Vis dos nanomateriais Fe₃O₄-mag, C-dots e Fe₃O₄-mag/C-dots também foram obtidos com objetivo de comprovar a interação das nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄-mag) com C-dots. Como pode ser visto na Figura 4, o nanomaterial

Fe_3O_4 -mag não apresenta nenhuma banda de absorção, porém quando o nanomaterial Fe_3O_4 -mag/C-dots é formado, surge uma banda de absorção em comprimentos de onda por volta de 218 nm indicando que está havendo interação química entre Fe_3O_4 -mag e C-dots, como mostrado pelas análises de XPS e HR-TEM. A diferença de intensidade das bandas apresentadas pelos nanomaterial Fe_3O_4 -mag/C-dots e C-dots, como sintetizado, são diferentes possivelmente devido a diferença de concentração entre C-dots imobilizados e livres em solução.

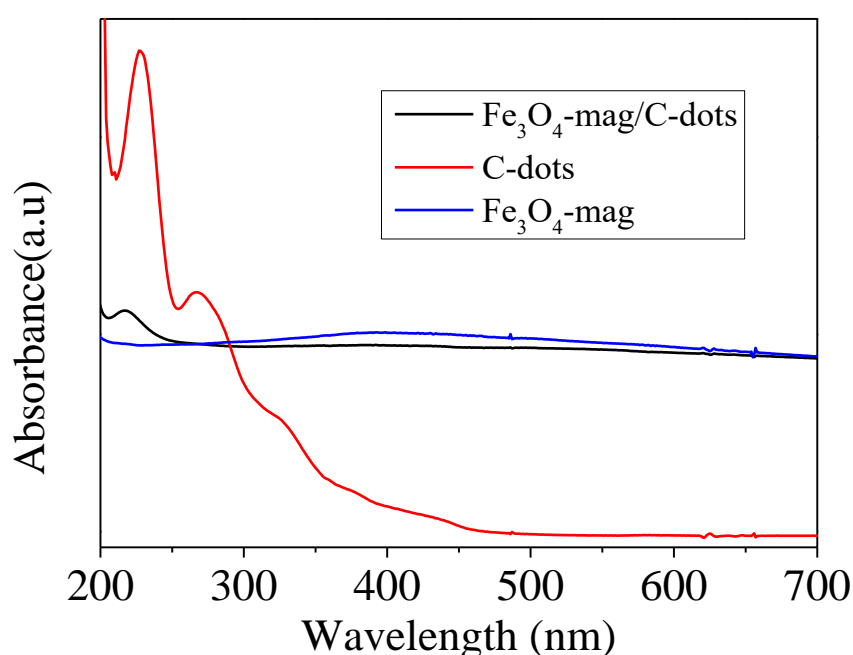


Figura 4: Espectro Uv-vis das nanopartículas magnéticas Fe_3O_4 -mag, nanopartículas magnéticas contendo C-dots incorporados (Fe_3O_4 -mag/C-dots) e C-dots obtidos em 1-propanol.

É importante ressaltar que a banda de absorção dos C-dots, como preparado, por volta de 228 nm referem-se as transições eletrônicas $\pi-\pi^*$ indicando a presença da estrutura aromática formada pelas ligações C=C (hibridização sp^2), provavelmente localizada no bulk dos C-dots [54]. As demais bandas de absorção apresentadas pelos C-dots, como preparado, foram encobertas pela larga banda de absorção apresentada pelas

nanopartículas magnéticas Fe_3O_4 -mag. Um comportamento semelhante ocorreu mediante incorporação de dopamina na superfície das nanopartículas magnéticas Fe_3O_4 [55].

As propriedades magnéticas dos nanomateriais Fe_3O_4 -mag e nanopartículas magnéticas contendo C-dots incorporados (Fe_3O_4 -mag/C-dots) também foram obtidas, com objetivo de estudar a influência dos C-dots nas propriedades superparamagnéticas nas nanopartículas de Fe_3O_4 -mag (Figura 5).

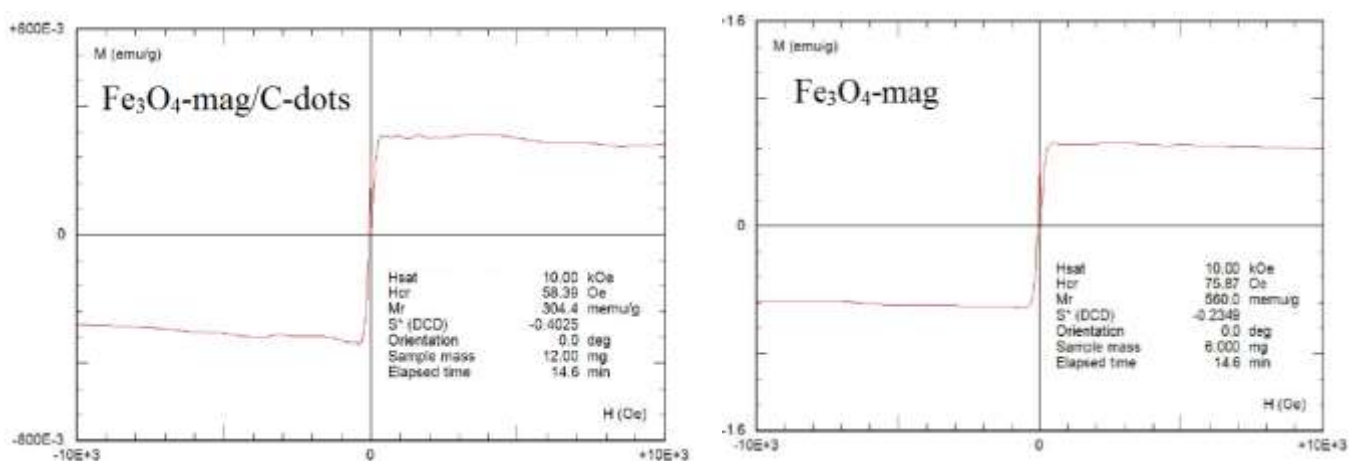


Figura 5: Propriedades magnéticas dos nanomateriais Fe_3O_4 -mag e nanopartículas magnéticas contendo C-dots incorporados (Fe_3O_4 -mag/C-dots).

Como pode ser visto na figura 5, as propriedades superparamagnéticas das nanopartículas Fe_3O_4 -mag/C-dots sofre pequena diminuição em comparação as nanopartículas Fe_3O_4 -mag devido os átomos de ferro ligarem aos C-dots. Com isso, o número de átomos de ferro (II) com elétrons desemparelhados diminui e com isso as propriedades superparamagnéticas também apresentam um pequeno decréscimo, porém não se extinguem. Sendo assim, as propriedades magnéticas apresentadas pelos nanomateriais Fe_3O_4 -mag/C-dots faz com que estes nanomateriais possam cobrir de maneira mais eficiente a superfície dos eletrodos, por meio do auxílio de um ímã, melhorando, desta maneira, a resposta eletrocatalítica do eletrodo modificado

3.3 Medidas eletroquímicas

A performance eletroquímica dos eletrodos impressos de carbono limpo e modificados com as nanopartículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag/C-dots}$ foram testadas frente a eletrooxidação da biomolécula de NADH. Para este estudo foram empregadas as técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial, no qual o eletrodo impresso de carbono continha um pequeno ímã preso na parte externa por uma fita adesiva, conforme Figura 6.



Figura 6: Fotografia do eletrodo impresso de carbono, contendo o nanomaterial híbrido com pequeno ímã acoplado na sua extremidade.

O pequeno ímã servirá para obtermos uma cobertura mais eficiente da superfície do eletrodo impresso de carbono com as nanopartículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}$ e nanopartículas magnéticas contendo C-dots incorporados ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag/C-dots}$) obtendo desta forma, uma melhor resposta eletrocatalítica em relação à biomolécula de NADH.

A Figura 7a mostra a comparação da resposta eletrocatalítica dos eletrodos impresso de carbono limpo e modificados com as nanopartículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}$ e nanopartículas magnéticas contendo C-dots incorporados ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag/C-dots}$) para a biomolécula de NADH em tampão fosfato pH 7. Como pode ser visto nos voltamogramas cíclicos obtidos, Figura7, ambos eletrodos apresentam resposta eletrocatalítica em relação a biomolécula de NADH, porém o potencial de a intensidade das correntes são diferentes.

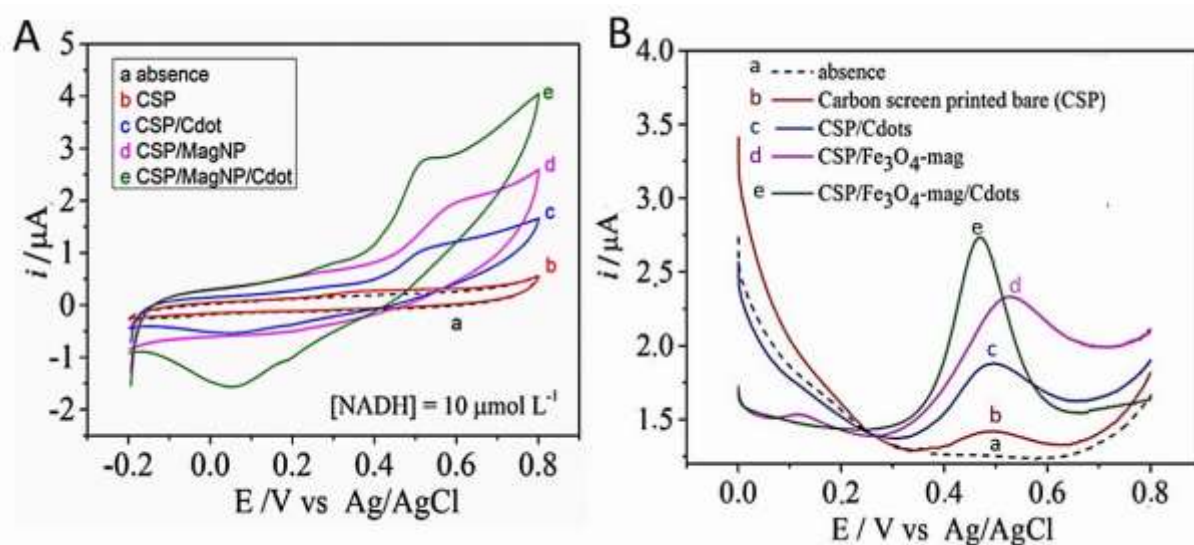


Figura 7: a) Comparativo entre os voltamogramas cíclicos e de b) voltamogramas de pulso diferencial para os eletrodos impresso de carbono limpo (CSP) e modificados com as nanopartículas magnéticas Fe_3O_4 -mag, Cdots e nanopartículas magnéticas contendo C-dots incorporados (Fe_3O_4 -mag/C-dots).

O eletrodo impresso de carbono modificado com as nanopartículas magnéticas contendo C-dots ligados (Fe_3O_4 -mag/C-dots) apresentou maior intensidade de corrente e deslocamento para potencias menos positivos ($E = 0.5 \text{ V}$) para a eletrooxidação da molécula de NADH, na concentração de $10 \mu\text{mol/L}$, em comparação com os eletrodos de impresso de carbono limpo ($E = 0.6 \text{ V}$), Cdots ($E = 0.58 \text{ V}$) e modificado com as nanopartículas magnéticas Fe_3O_4 -mag ($E = 0.57 \text{ V}$).

A melhor performance eletrocatalítica do eletrodo impresso de carbono modificado com nanopartículas magnéticas contendo C-dots incorporados (Fe_3O_4 -mag/C-dots) foi comprovada por meio da eletrooxidação de $10 \mu\text{mol/L}$ da molécula de NADH empregando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Como pode ser visto na Figura 7b, o eletrodo impresso de carbono modificado com nanopartículas magnética contendo C-dots incorporados (Fe_3O_4 -mag/C-dots) apresentou picos bem definidos e

manteve maior corrente e potencial menos positivo em comparação aos demais eletrodos devido ser uma técnica mais sensível que a voltametria cíclica.

O potencial menos positivo apresentado pelo eletrodo impresso de carbono modificado com nanopartículas magnéticas contendo C-dots incorporados ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag/C-dots}$) ($E = 0.47 \text{ V}$) em comparação aos eletrodos impresso de carbono limpo (SPE) ($E = 0.5 \text{ V}$) e modificados com Cdots ($E = 0.495$) e com as nanopartículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}$ ($E = 0.53 \text{ V}$) é devido ao bom efeito sinérgico entre as nanopartículas magnéticas ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}$) com os quantum dots de carbono (C-dots) que facilitam a transferência de elétrons na interface eletrodo-solução contendo NADH, como ilustrado na Figura 8.

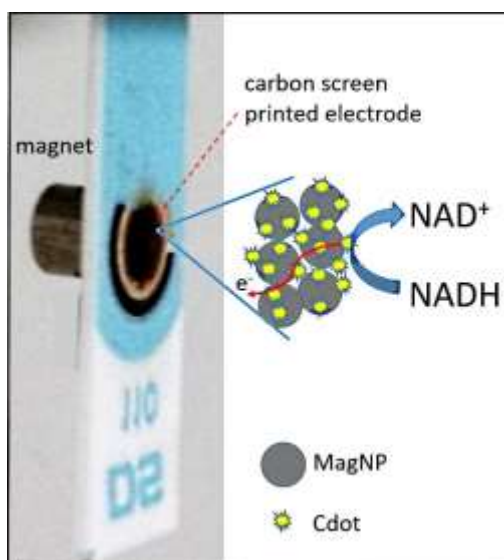


Figura 8: Ilustração do processo de transferência de elétrons na interface eletrodo modificado-solução contendo NADH.

O potencial por volta de 0.1 V , como mostrado na Figura 7b, apresentado pelo eletrodo impresso de carbono modificado com nanopartículas magnéticas ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}$) e possivelmente devido a interação dos átomos de ferro com o tampão fosfato, formando a espécie FePO_4 na superfície do eletrodo, como reportado por outros trabalhos [56,57].

Para confirmar a melhor performance eletrocatalítica do eletrodo $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag/C-dots}$ em comparação aos eletrodos modificados com os demais nanomateriais foi realizado um estudo empregando a espectroscopia de impedância eletroquímica, que mede a resistência da superfície do eletrodo (Figura 9). As medições de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e as gráficos de Nyquist foram obtidos para comparar os processos de transferência de elétrons no eletrodo impresso de carbono limpo (SPE) e modificados com as nanopartículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}$, Cdots e nanopartículas magnéticas contendo C-dots incorporados ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag/C-dots}$). As medidas foram realizadas usando a solução de KCl 0,1 M contendo 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$.

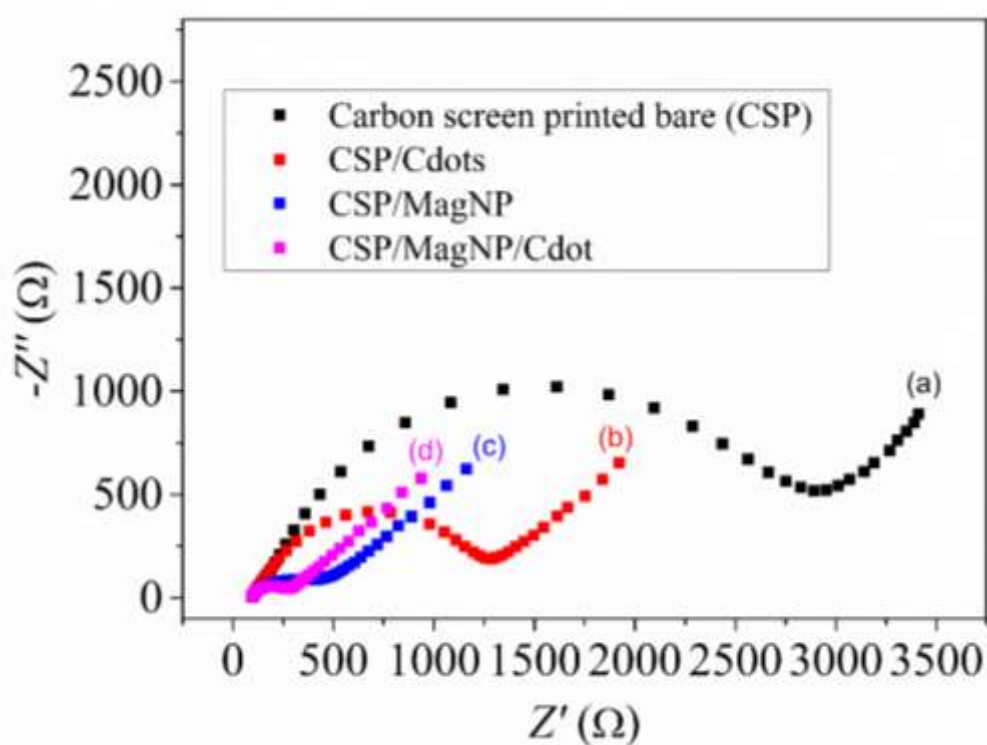


Figura 9: Gráficos de Nyquist obtidos por meio da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Medidas realizadas em solução de KCl 0,1 M contendo 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$.

Conforme mostrado na Figura 9, a resposta EIS do eletrodo SPE nua mostrou um semicírculo grande que indica uma grande resistência à transferência de carga (Rct), cerca

de 2804 Ω . Após a modificação com Cdots, MagNP e MagNP/C-dots, Rct diminuiu para 1158, 264 e 168 Ω , respectivamente. Esses resultados confirmam o efeito sinérgico entre pontos Cdots e Fe₃O₄-mag melhorando o processo de transferência de elétrons na superfície do eletrodo SPE.

3.4 Determinação da biomolécula NADH.

A Figura 10 mostra a determinação eletroquímica da biomolécula de NADH, em PBS, pH 7, pelo eletrodo impresso de carbono modificado com nanopartículas magnéticas contendo C-dots incorporados (Fe₃O₄-mag/C-dots) por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial. Como pode ser visto, a corrente catalítica do eletrodo impresso de carbono modificado com Fe₃O₄-mag/C-dots aumenta linearmente com o aumento da concentração da biomolécula de NADH. Esta boa resposta eletrocatalítica pode ser atribuída ao excelente processo mediador de elétrons, na interface eletrodo-solução, ocasionado pelo efeito sinérgico entre as nanopartículas magnéticas e quantum dots de carbono.

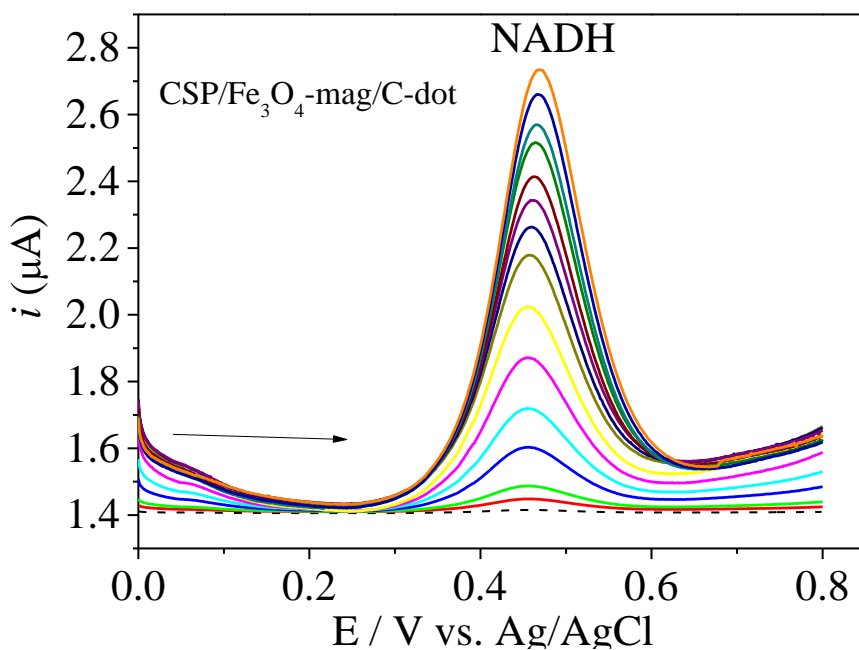


Figura 10: Determinação eletroquímica da biomolécula de NADH, em PBS, pH 7, pelo eletrodo impresso de carbono modificado com nanopartículas magnéticas contendo C-dots incorporados (SPE/Fe₃O₄-mag/C-dots).

As medidas eletroquímicas foram realizadas com a concentração de NADH variando de 2×10^{-7} a 12×10^{-6} mol L⁻¹, em PBS, pH 7. A curva de calibração i vs. [NADH], Figura 11, possui duas regiões lineares que podem ser expressas, por meio das seguintes equações de reta, respectivamente: i (µA) = $1.4 \times 10^{-6} (\pm 2.4 \times 10^{-9}) + 0.15 (\pm 8.76 \times 10^{-4})$ [NADH] (µ mol L⁻¹), com $n=7$, concentração de NADH variando de 2×10^{-7} a 6×10^{-6} mol L⁻¹ e $r=0,9998$ e i (µA) = $1.78 \times 10^{-6} (\pm 9.9 \times 10^{-8}) + 0.08 (\pm 0.01104)$ [NADH] (µmol L⁻¹) com $n=7$, concentração de NADH variando de 6×10^{-6} a 12×10^{-6} mol L⁻¹ e $r=0,9998$.

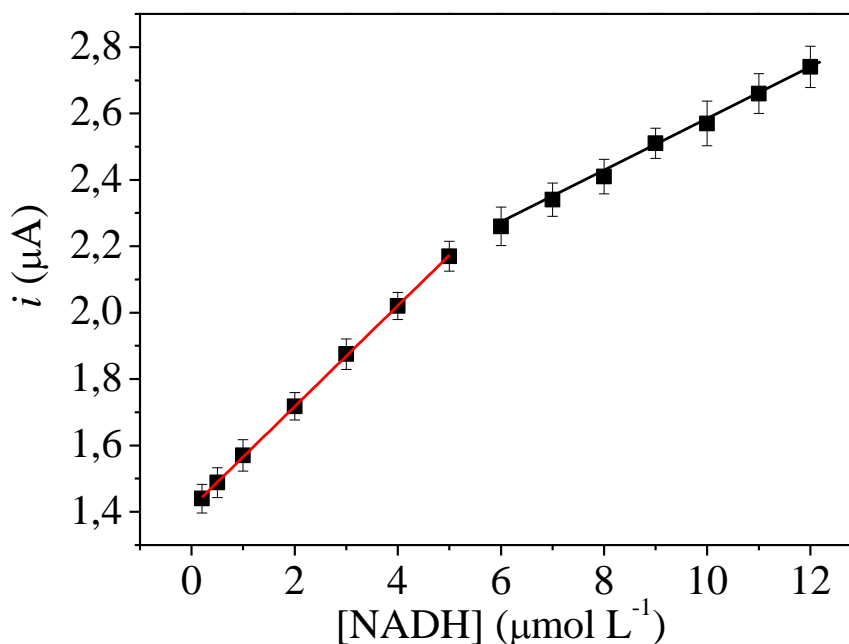


Figura 11: A curva de calibração i vs. $[\text{NADH}]$ obtida pelo eletrodo $\text{CSP}/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}/\text{C-dots}$, em PBS, pH 7, com a concentração de NADH variando de 2×10^{-7} a 12×10^{-6} mol L^{-1} .

As duas regiões lineares apresentadas na curva de calibração, possivelmente é devido estar ocorrendo o processo de adsorção da molécula de NADH na superfície do eletrodo $\text{SPE}/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}/\text{C-dots}$, semelhante ao que ocorreu com Fe_3O_4 modificado com rGO [58]. A diminuição do coeficiente angular (sensibilidade) com o aumento da concentração de NADH, apresentada na segunda região linear, demonstra que está ocorrendo uma limitação cinética, no qual um processo de adsorção irreversível do reagente/produto dificulta o processo de transferência de elétrons na interface eletrodo-solução [59,60].

O limite de detecção apresentado pelo eletrodo $\text{SPE}/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-mag}/\text{C-dots}$, calculado de acordo com a IUPAC foi de 20 nmol L^{-1} . O cálculo do limite de detecção utilizando o método da IUPAC foi realizado considerando a razão $3\sigma/\text{coef.angular}$, no qual σ é o

desvio padrão das medidas de corrente de 10 voltamogramas de pulso diferencial, sem adição dos analitos.

É importante ressaltar que o limite de detecção apresentado pelo eletrodo SPE/Fe₃O₄-mag/C-dots para a biomolécula de NADH é melhor em comparação a outros eletrodos modificados previamente utilizados, como por exemplo, Fe₃O₄ modificado com rGO [61], eletrodo de carbono vítreo modificado Fe₃O₄/MWCNTs [62], SPE modificado com óxido de grafeno reduzido (RGO) e hidrocloreto de polialinina (PAH) [63], grafeno modificado com piroloquinolina [64] e SPE modificado com polímeros condutores e nanomateriais [65].

3.5 Influência dos interferentes na determinação da biomolécula NADH.

A versatilidade do eletrodo impresso de carbono modificado com o nanomaterial magnético contendo C-dots incorporados (SPE/Fe₃O₄-mag/C-dots) foi investigada, por meio da determinação da biomolécula NADH na presença de diferentes interferentes, em tampão PBS, pH 7 (Figura 12). Os principais interferentes biológicos que influenciam na determinação eletroquímica do NADH, são ácido ascórbico (AA), dopamina (DA) e ácido úrico (UA) [66]. Sendo assim, a determinação eletroquímica da biomolécula NADH na presença destes interferentes é importante. Com pode ser visto na Figura 12 inserida, o eletrodo SPE/Fe₃O₄-mag/C-dots apresenta resposta eletrocatalítica, em diferentes potenciais, para as espécies, AA, DA, UA, analisadas individualmente em presença da biomolécula de NADH.

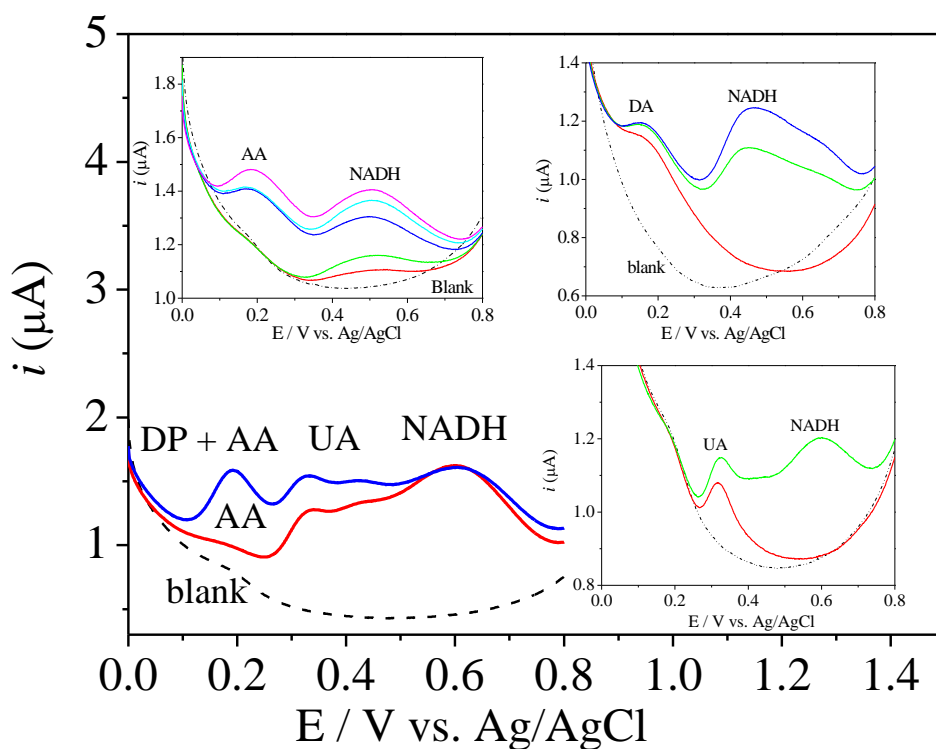


Figura 12: Estudo da interferência das principais espécies biológicas, tais como, ácido ascórbico (AA), dopamina (DA) e ácido úrico (UA) na determinação eletroquímica da biomolécula de NADH, em PBS, pH 7.

As medidas eletroquímicas individuais dos interferentes AA, DA e UA, na presença de NADH, ocorreu em PBS, pH 7, com adição de alíquotas de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NADH e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ das espécies interferentes, para cada medida eletroquímica. Porém, apenas na presença de ácido úrico, UA, a oxidação eletroquímica da molécula de NADH, ocorreu em potencial mais positivo em comparação com outras espécies, possivelmente devido ao maior número de átomos de nitrogênio presentes na molécula de UA. É sabido, que os átomos de nitrogênio apresentam sítios básicos de Lewis e isso favorece a ligação com os átomos de ferro (sítios ácidos de Lewis) presentes na superfície do eletrodo e consequentemente as moléculas de UA ficam adsorvidas na superfície do eletrodo dificultando o processo de transferência de elétrons na interface eletrodo-solução. Com

isso, torna-se mais difícil a oxidação da molécula de NADH na superfície do eletrodo e com isso o potencial de oxidação é deslocado para potenciais mais positivos.

Devido ao eletrodo SPE/Fe₃O₄-mag/C-dots apresentar boa resposta electrocatalítica para o NADH, com boa separação de pico e dos potenciais individuais dos diferentes interferentes (AA, DA e UA), foi realizado a determinação electroquímica da biomolécula de NADH, na presença simultânea de AA, DA e UA, como mostrado na Figura 12.

Como pode ser visto, o eletrodo CSP/Fe₃O₄-mag/C-dots pode ser utilizado para determinação da biomolécula de NADH na presença simultânea dos principais interferentes biológicos.

3.6 Características do eletrodo CSP/Fe₃O₄-mag/C-dots.

A modificação da superfície do eletrodo de carbono impresso com os nanomateriais magnéticos Fe₃O₄-mag e Fe₃O₄-mag/C-dots, é altamente reprodutível, sendo que 2 a cada 10 eletrodos não funcionam. O eletrodo SPE/Fe₃O₄-mag/C-dots apresentou alta durabilidade, permanecendo electroativo, por aproximadamente 30 dias, sem perda significativa da atividade electrocatalítica.

Outra característica importante é que o eletrodo SPE/Fe₃O₄-mag/C-dots apresentou boa reprodutibilidade para a determinação electroquímica da biomolécula de NADH, com desvio padrão relativo de 6%, considerando 10 medidas com a concentração de NADH fixa em $12 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

3.7 Determinação de NADH em s rum humano

O desempenho do eletrodo SPE/Fe₃O₄-mag/C-dots foi testado em uma amostra de soro humano, fornecida por Sigma / Aldrich. As medidas foram realizadas em triplicata, pelo método de adi o padrão, contendo NADH em soro humano. Como pode ser visto na Tabela 1, o eletrodo exibiu um bom desempenho na determina o de NADH na amostra de soro humano, produzindo resultados consistentes validados pelo procedimento de adi o padrão. Portanto, o eletrodo SPE/Fe₃O₄-mag/C-dots pode ser efetivamente usado para determinar NADH em amostras reais.

Tabela 1: Recupera o do NADH utilizando SPE/Fe₃O₄-mag/C-dots em Serum humano.

Human Serum sample	Added ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	*Found ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recovery %
NADH	0.7	0.68	97.14
	0.9	0.94	104
	1.2	1.32	110

* Average of 3 determinations

4.0  xido de grafeno reduzido por meio da incorpora o de nanop rculas de carbono esféricas: desenvolvimento de um sensor eletroquímico para o interferente endócrino bisfenol A.

4.1 Resultados e discussão

4.2 Caracteriza o dos nanomateriais híbridos rGO-Cdots.

A Figura 13 mostra as micrografias de HR-TEM, em diferentes magnitudes, para os nanomateriais GO e rGO-CNPs. Como pode ser visto na Figura 1a e b, o óxido de grafeno (GO) formado possui diversas folhas de grafeno sendo que algumas são pequenas e isoladas e outras são grandes e apresentam na forma de folha irrugada. Porém, quando o GO é reduzido pela incorporação das nanopartículas de carbono (CNPs) ocorre separação das folhas de grafeno e o nanomaterial rGO apresenta a superfície altamente decorada pelas nanopartículas de carbono (Figura 13d). Outra característica importante é que as CNPs são e sua maioria menores que 5 nm e cristalinas com espaços entre planos de 0.2 nm, referentes ao plano do carbono com hibridização sp^2 , como pode ser visto na imagem ampliada da figura 13d.

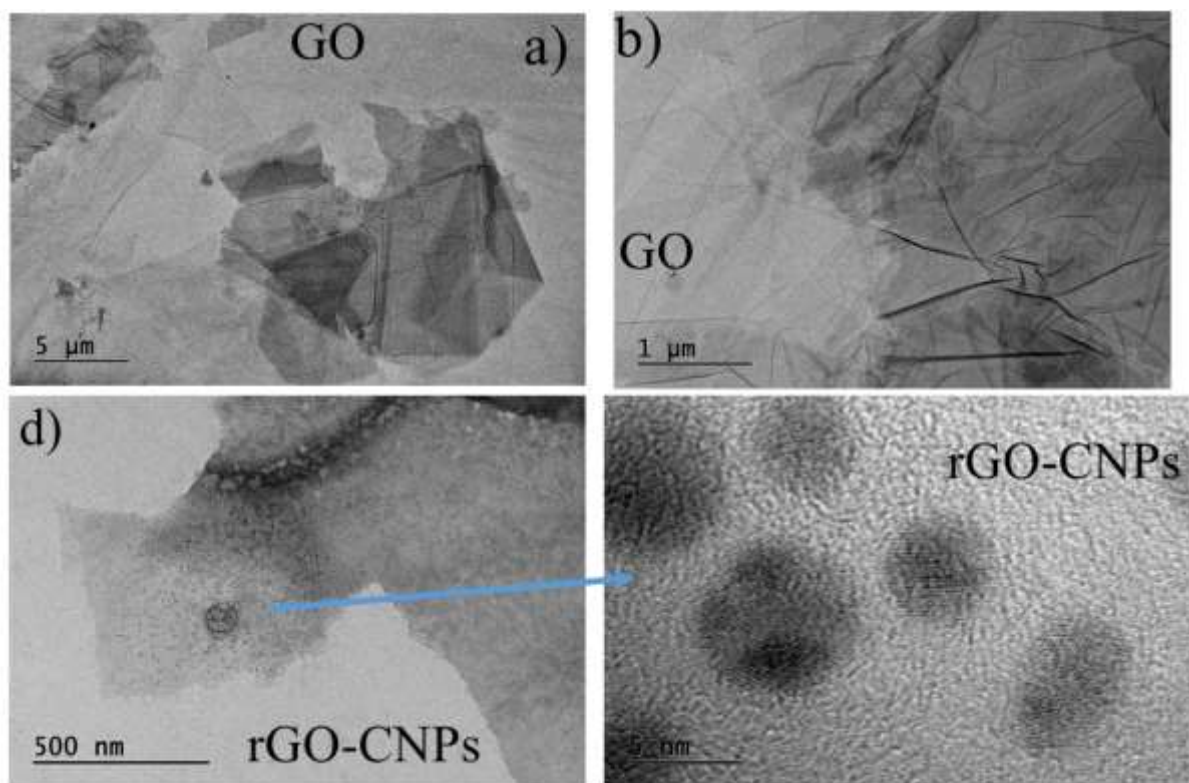


Figure 13: HR-TEM images in magnitude difference of nanomaterials GO and rGO-CNPs.

Os espectros na região Uv-vis foram obtidos com a finalidade de comprovar a redução do óxido de grafeno pela incorporação das nanopartículas quase esféricas de carbono (CNPs). A Figura 14a mostra os espectros Uv-vis obtidos, em água, para os nanomateriais óxido de grafeno, óxido de grafeno reduzido contendo CNPs e CNPs. Como pode ser visto, o óxido de grafeno apresenta duas bandas características em 227 e 300 nm. A banda por volta de 227 nm corresponde as transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ devido a presença das ligações covalentes entre os átomos de Csp^2 que constituem os anéis hexagonais. A banda por volta de 300 nm corresponde as transições devido presença de grupos funcionais, principalmente, grupos carboxílicos e hidroxilas que são característicos dos óxidos de grafeno [67]. Entretanto, quando as nanopartículas quase esféricas de carbono são incorporados na superfície dos óxidos de grafeno ocorre uma mudança no espectro Uv-vis em comparação ao GO, no qual a banda por volta de 227 nm desloca para 262 nm e a banda por volta de 300 nm deixa de existir comprovando a redução dos anéis hexagonais do GO reestabelecendo a estrutura conjugada $\pi-\pi$ entre os átomos de carbono na folha de grafeno[68,69], caracterizando a formação do nanomaterial (rGO/NPC). O processo de redução não remove totalmente os grupos funcionais presentes na superfície do óxido de grafeno. Este processo de redução faz com que o nanomaterial (rGO/NPC) apresente melhores propriedades eletrônicas em comparação com ao GO [70].

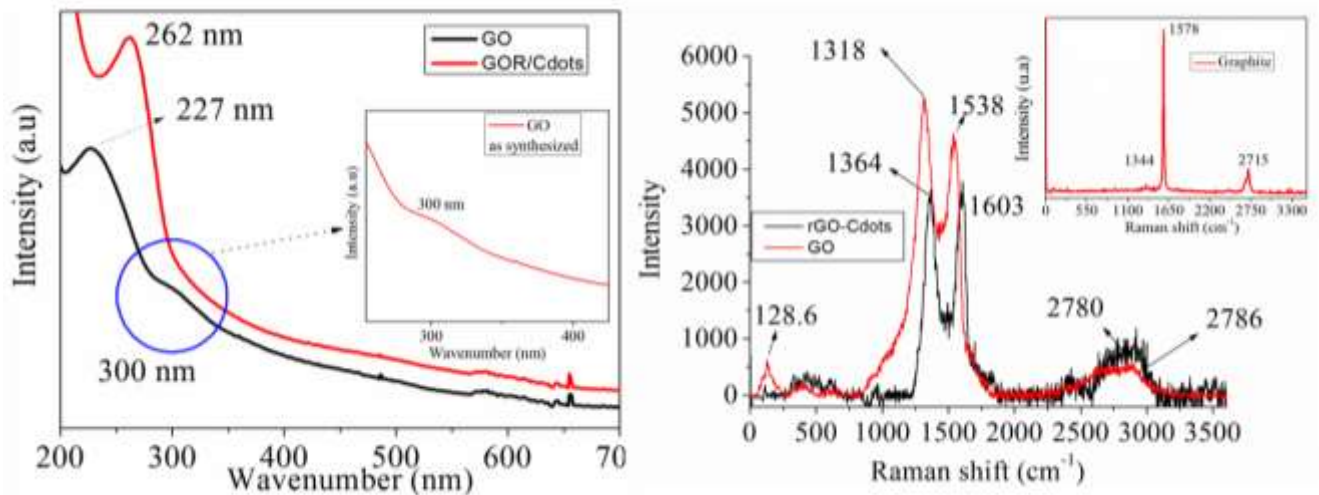


Figure 14: a) Espectros Uv-Vis obtidos em água para os nanomateriais GO e GO reduzido contendo nanopartículas quase esféricas de carbono (rGO-CNPs) b) Espectros Raman dos nanomateriais GO e rGO-CNPs. (Figura inserida: Espectro raman do grafite que deu origem ao GO).

A espectroscopia raman foi utilizada para estudar a mudança estrutural que ocorre quando as nanopartículas de carbono (CNPs) foram incorporadas na superfície do GO. A principal mudança é devido a alteração da hibridização dos carbonos sp^2 - sp^3 que compõem a folha de grafeno. A figura 14b mostra os espectros raman para os nanomateriais GO, rGO-CNPs e para o grafite que foi usado como material de partida do GO (figura inserida). Como pode ser visto, o espectro raman do grafite apresenta uma banda intensa em 1578 cm^{-1} que é denominada banda G e duas bandas de baixa intensidade em 1344 e 2715 cm^{-1} que são denominadas, respectivamente, de banda D e G'. Estas três bandas são utilizadas para caracterizar nanomateriais a base de carbono no qual a banda D refere-se aos defeitos presentes na estrutura do grafeno, caracterizada pelos átomos de carbono com hibridização sp^3 . Entretanto, a banda G refere-se a estrutura organizada dos planos do grafeno, caracterizada pela presença de átomos de carbono com hibridização sp^2 , e a banda G' refere-se ao harmônico oriundo da banda G [71]. Quando

as CNPs são incorporadas na superfície do GO, ocorre diminuição da intensidade das bandas D e G e aumento da intensidade da banda G'. Isto significa, que o GO foi reduzido pelas nanopartícula de carbono (CNPs) dando origem ao nanomaterial (rGO-CNPs), estando de acordo com as análises de Uv-vis. Outra informação, é que as bandas D e G, do nanomaterial rGO-CNPs, foram deslocadas em comparação ao GO indicando que está havendo interação entre rGO e as CNPs. Este deslocamento sugere que as CNPs estão atuando como agentes redutores do GO. A baixa intensidade da banda G' juntamente com a posição em 2780 cm^{-1} , indica que existem diversas camadas de grafeno ligadas devido a interação π - π . [72], estando de acordo com as imagens de HR-TEM.

4.3 Medidas eletroquímicas

A Figura 15 mostra a comparação entre as respostas eletrocatalíticas do eletrodo de carbono impresso limpo (SPE) e modificado com os nanomateriais GO (SPE-GO), nanopartículas de carbono (SPE-CNPs) e rGO-CNPs (SPE-rGO-CNPs) em relação a determinação do interferente endócrino bisfenol A. Como pode ser visto, ambos materiais apresentam resposta eletrocatalítica para o bisfenol A, porém o eletrodo impresso modificado com rGO-CNPs (SPE-rGO-CNPs) apresentou melhor resposta eletrocatalítica (maior intensidade de corrente) em comparação ao demais eletrodos modificados devido ao efeito sinérgico entre óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de carbono. Tal efeito sinérgico é devido o rGO apresentar ótimas propriedades condutoras devido a estrutura de grafeno ser em grande parte restabelecida pelo processo de redução juntamente com o aumento da área eletroativa devido a presença de nanopartículas de carbono resultando em uma melhora no processo de transferência de elétrons [73]. Outra característica importante, é que o eletrodo impresso modificado com rGO-CNPs apresentou oxidação do bisfenol em potencial menos positivo (0.529 V) em

comparação com eletrodos modificados com GO (0.535 V) e eletrodo impresso limpo (0.54 V).

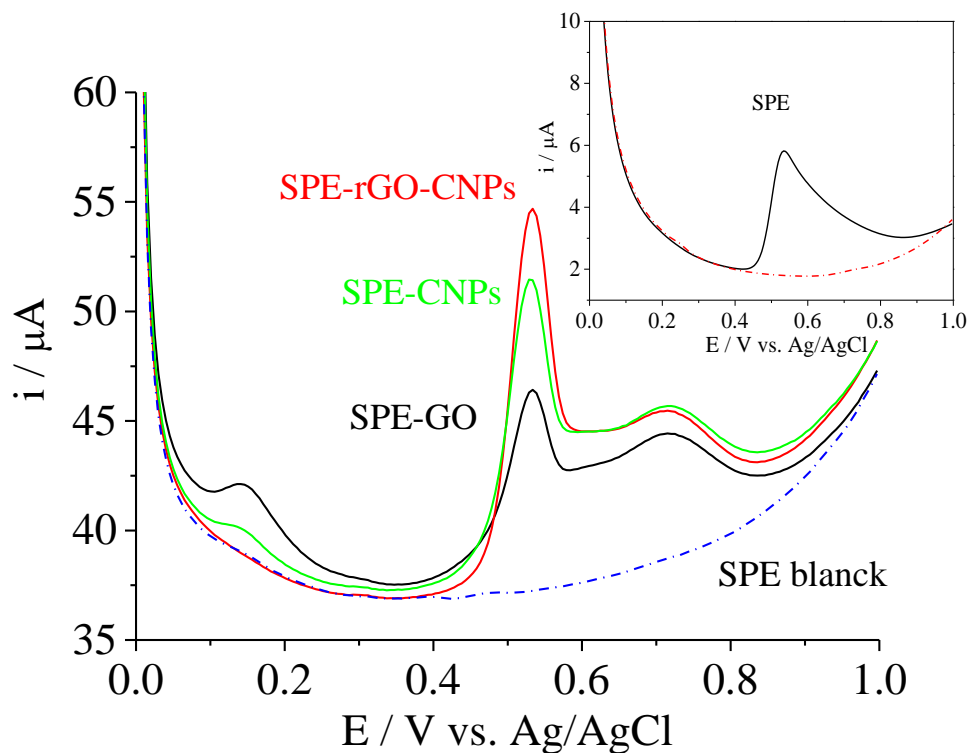


Figura 15: Respostas electrocatalíticas do eletrodo de carbono impresso limpo (SPE) e modificado com os nanomateriais GO (SPE-GO), nanopartículas de carbono (SPE-CNPs) e rGO-CNPs (SPE-rGO-CNPs) em relação a determinação do interferente endócrino bisfenol A.

4.4 Determinação eletroquímica do interferente endócrino Bisphenol A.

A Figura 16 mostra a determinação do interferente endócrino bisfenol A utilizando o eletrodo de carbono impresso modificado com rGO-CNPs (SPE-rGO-CNPs) por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial. Como pode ser visto na Figura 16A, o eletrodo (SPE-rGO-CNPs) apresenta boa resposta electrocatalítica em relação a determinação do bisfenol A devido a corrente catalítica aumentar à medida que a

concentração de bisfenol A aumenta. A Figura 16b, mostra a curva de calibração para a determinação do bisfenol A pelo eletrodo SPE-rGO-CNPs no qual apresenta uma relação linear entre a corrente (i) e o aumento da concentração de bisfenol A. As medidas foram realizadas com a concentração de bisfenol A variando de 7.5×10^{-9} a 2.6×10^{-7} mol L⁻¹, in PBS, pH 7, no qual pode ser representada pela seguinte equação: i (A) = $3.57 \times 10^{-5} (\pm 2.59 \times 10^{-7}) + 189.49 (\pm 3.5)$ [Bisphenol A] ($\mu\text{mol L}^{-1}$), with $n= 11$ and $r= 0.998$. O limite de detecção calculado de acordo com a IUPAC, considerando ($S/N=3$), foi de 1×10^{-9} mol L⁻¹. Tal limite de detecção apresentado pelo eletrodo SPE-rGO-CNPs mostrou-se melhor, em comparação, com outros eletrodos modificados com diversos tipos de nanomateriais, por exemplo, Cu₂O-rGO, nanopartículas magnéticas impressas molecularmente, Nanofolhas de hidróxido duplo de Ni₂Al esfoliada (, óxido de grafeno reduzido decorado com nanopartículas), Líquido iônico de nano-carbono modificado com carbono mesoporoso, Tirosinase à base de nanographene [74-80]. Outra característica importante apresentada pelo eletrodo SPE-rGO-CNPs é a alta sensibilidade [$189.49 (\pm 3.5) \mu\text{mol L}^{-1}$] apresentada em relação ao bisfenol A, fazendo com que este eletrodo SPE-rGO-CNPs possa ser útil na construção de um sensor eletroquímico para o bisfenol em amostras reais.

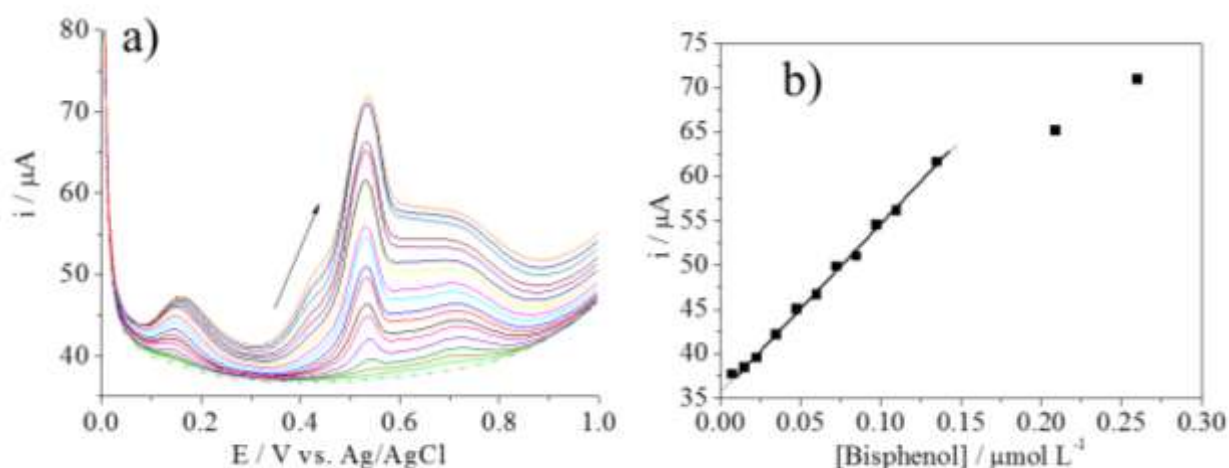


Figura 16: a) Determinação do interferente endócrino bisfenol A pelo eletrodo de carbono impresso modificado com rGO-CNPs (SPE-rGO-CNPs) empregando a técnica de voltametria de pulso diferencial, b) Curva de calibração $i \times [\text{bisfenol A}]$ obtida pelo eletrodo SPE-rGO-CNPs. Medidas realizadas em tampão fosfato, pH7.0.

O pico com potencial por volta de 0.15 V, possivelmente é fruto de subprodutos da eletrooxidação do bisfenol A [81] devido ir aumentando com o aumento da concentração do bisfenol A na cela eletroquímica.

4.5 Estudo de possíveis interferetes na determinação do Bisphenol A.

A versatilidade do eletrodo SPE-rGO-CNPs foi testada levando em consideração a determinação do bisfenol A na presença de possíveis interferentes fenólicos, tais como Hidroquinona (HQ), Catecol (Cat) e resorcinol (RC), Figura 17. As medidas de voltametria de pulso diferencial foram realizadas em tampão fosfato, pH 7.0, com a concentração de HQ, Cat e RC sendo 100 vezes superior à concentração de bisfenol A (BP). Um teste preliminar foi realizado apenas adicionando HQ, Cat e RC ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), na cela eletroquímica contendo o eletrodo SPE-rGO-CNPs. A figura 17a mostra que o eletrodo SPE-rGO-CNPs apresenta atividade eletrocatalítica para HQ e Cat, em mesmo

potencial, com um único pico por volta de $E = 0.21$ V e pouca sensibilidade para o RC com ombro em potencial por volta de 0.60 V. Em seguida, foi adicionado mais ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) de HQ, Cat e RC juntamente com diferentes concentrações de BP (0.5 a $4 \mu\text{mol L}^{-1}$), como mostrado na figura 17.

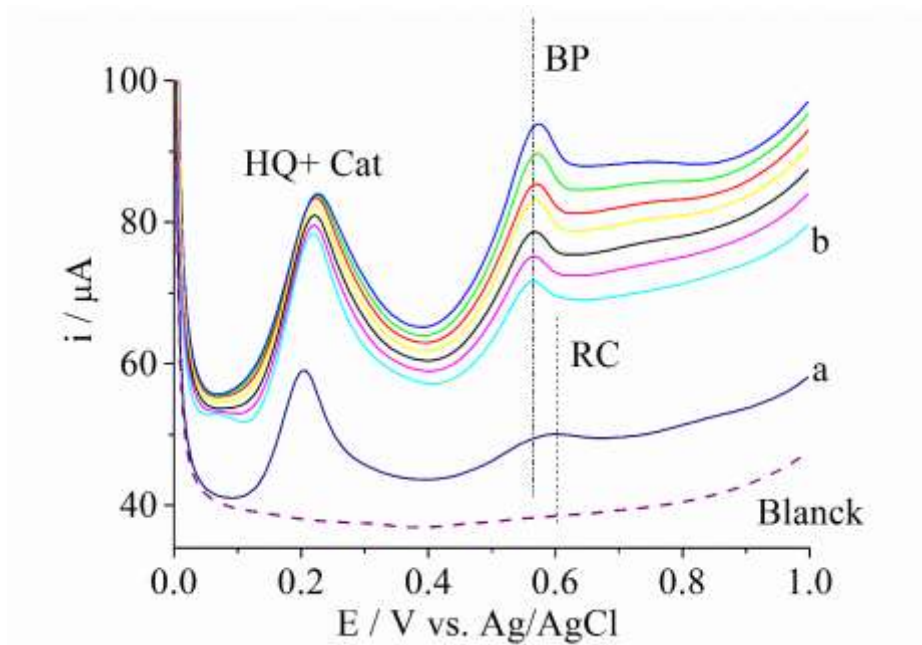


Figura 17: Determinação do bisfenol A na presença de possíveis interferentes fenólicos, tais como Hidroquinona (HQ), Catecol (Cat) e resorcinol (RC). As medidas de voltametria de pulso diferencial foram realizadas em tampão fosfato, pH 7.0.

Como pode ser visto a partir da Figura 17b, o eletrodo SPE-rGO-CNPs apresenta boa reposta electrocatalítica para o bisfenol A em presença dos interferentes fenólicos. Entretanto, os interferentes HQ, Cat e RC apresentaram pequena interferência na determinação do BP, em tampão fosfato, pH 7.0, deslocando o potencial para potenciais mais positivos (por volta de 0.565 V) em comparação com a determinação do bisfenol A ausência de interferentes. A pequena interferência no potencial de determinação do bisfenol A possivelmente é devido ao aumento da dupla camada elétrica em função da presença da adsorção dos interferentes na superfície do eletrodo dificultando a

transferência de elétrons na interface eletrodo-solução. É importante ressaltar que a presença de interferentes não impede a determinação do bisfenol A.

4.6 Determinação eletroquímica do Bisphenol A em amostra real.

A aplicação do eletrodo SPE-rGO-CNPs na determinação de bisfenol A em amostras reais também foi testada. As medidas foram realizadas em triplica, pelo método de adição padrão, utilizando água mineral armazenada em garrafa plástica. Nenhum pico de oxidação foi encontrado na análise de água, possivelmente devido não haver bisfenol A ou se apresentar em concentrações muito inferior ao limite de detecção do eletrodo SPE-rGO-CNPs. Sendo assim, a água armazenada em garrafa plástica foi contaminada com sucessivas adições de 50 μL de solução de bisfenol A. Os resultados obtidos empregando o método de extrapolação estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados da recuperação de bisfenol A em água armazenada em garrafa plástica.

Water sample	Added ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	*Found ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recovery %
Bisphenol A	0.08	0.077	96.3
	0.5	0.487	97.4
	1	1.02	102

* Average of 3 determinations

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, pode-se dizer que o eletrodo SPE-rGO-CNPs é eficiente e pode ser utilizado na determinação de bisfenol A em amostras reais.

4.7 Características do eletrodo SPE-rGO-CNPs.

A reprodutibilidade na produção do eletrodo é de 100% levando em consideração a produção de 10 eletrodos. Outra característica importante é a alta repetibilidade das medidas de determinação do bisfenol A empregando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Dos 10 eletrodos SPE-rGO-CNPs utilizados todos apresentaram atividade electrocatalítica para o bisfenol A ($0.02 \mu\text{mol L}^{-1}$) com pequeno desvio na intensidade de corrente, com desvio padrão de 0.5 %, considerando 10 medidas. O eletrodo SPE-rGO-CNPs permaneceu estável por mais de 1 mês.

5.0 Conclusões.

O novo nanomaterial híbrido magnético híbrido, aqui denotado como Fe_3O_4 -MagNP/Cdots, exibiu um sinergismo entre os Cdots nanocristalinos e as nanopartículas Fe_3O_4 -MagNP, conforme confirmado por HR-TEM e XPS. A modificação do eletrodo impresso de carbono (SPE) com Fe_3O_4 -MagNP/Cdots, que pode ser realizada pela simples aplicação de um ímã em miniatura externo, fornece uma maneira muito prática de realizar a análise, ao mesmo tempo que aumenta os sinais aumentando a área de superfície da aglomeração das nanopartículas. O efeito sinérgico nas partículas híbridas melhorou a cinética de transferência de elétrons para o eletrodo SPE- Fe_3O_4 -MagNP/Cdots, permitindo o desenvolvimento de um sensor eletroquímico altamente sensível para NADH. O novo sensor exibiu boa reprodutibilidade e alta estabilidade, e pode ser empregado na determinação de NADH mesmo na presença de interferentes biológicos típicos, como AA, DA e UA.

A redução do GO por meio da incorporação das nanopartículas de carbono (CNPs) foi comprovada pelas técnicas Uv-Vis e espectroscopia Raman. As CNPs, além de reduzirem o GO, ficaram incorporadas na superfície do óxido de grafeno reduzido (rGO-

CNPs) conforme mostrado pela HR-TEM micrografias. O efeito sinérgico entre rGO e CNPs proporcionou ao nanomaterial (rGO-CNPs) excelentes propriedades electrocatalíticas em relação a determinação do bisfenol A. A boa sensibilidade aliada ao baixo limite de detecção e a facilidade de modificação da superfície do eletrodo de carbono impresso (SPE), faz com que o nanomaterial seja potencialmente útil na confecção de sensores electroquímicos para a determinação do interferente endócrino bisfenol A.

5.1 Produções e eventos científicos.

Desde de o período de implantação do projeto, fevereiro de 2017 até o presente momento, foram produzidos 3 trabalhos científicos, fruto do projeto de pesquisas.

- Magnetite Nanoparticles Bonded Carbon Quantum Dots Magnetically Confined onto Screen Printed Carbon Electrodes and their Performance as Electrochemical Sensor for NADH. *Electroanalysis*, **2017**, 29, 1968 – 1975

-Reduced graphene oxide by incorporation of spherical carbon nanoparticles: development of an electrochemical sensor of endocrine disruptor bisphenol A. *Sensors & Actuators: B. Chemical*. **2017**. Manuscrito submetido: SNB-D-17-04660.

- A nano-magnetic electrochemical sensor for the determination of mood disorder substances. *RSC Advances*. Submetido, RA-ART-03-2018-00185.

Eventos científico.

- **Fe₃O₄ nanoparticles bonded with nanocrystalline c-dots: application as non-enzymatic biosensor magnetic for NADH.** Este trabalho foi apresentado no 46th World Chemistry Congress, 40^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e IUPAC

49th General Assembly que ocorreu na cidade de São Paulo, Brasil, no período de 7-14 de Julho de 2017

5.2. Referencias

- [1] H. E. Toma, *Green Chem.*, 17, 2015, 2027-2041.
- [2] J.B. Haun, T.J. Yoon, H. Lee, R. Weissleder. *Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2, 2010, 291–304.
- [3] A, R. Kaushik, P.R. Khan, P. Solanki, J. Pandey, S. Alam, Ahmad, B.D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron*, 24, 2008, 676–683.
- [4] H. Keypour, S. G. Saremi, H. Veisi, M. Noroozi. *J. Electroanal. Chem.* 780, 2016, 160–168.
- [5] V. Georgakilas, J. A. Perman, J. Tucek, R. Zboril. *Chem. Rev.* 115, 2015, 4744–4822.
- [6] L. Cao, M. J. Mezziani, S. Sahu, Y-P Sun. *Acc. Chem. Res.*, 46, 2013, 171-180.
- [7] S. Pei, H-M. Cheng. *Carbon*. 50, 2012, 3210 –3228.
- [8] C. Gomez-Navarro, J. C. Meyer, R. S. Sundaram, A. Chuvilin, S. Kurasch, M. Burghard, K. Kern, U. Kaiser. *Nano Lett.* 10, 2010, 1144–1148.
- [9] Z-L. Wua, C-K. Lia, J-G. Yua, X-Q. Chen. *Sens. Actuators, B.* 239, 2017, 544–552.
- [10] C. K. Chua, M. Pumera, *Chem. Comm.* 52, 2016, 72-75.
- [11] A. Gopalakrishnan, P. Sahatiya, S. Badhulika. *Materials Letters*. 198, 2017, 46-49.
- [12] R. Shi, J. Liang, Z. Zhao, A. Liu, Y. Tian. *Talanta*, 169, 2017, 37-43.
- [13] H. Qiu, F. Qiu, X. Han, J. Li, J. Yang. *Appl. Surf. Sci.* 407, 2017, 509-517.
- [14] Y-W. Chi, C-C. Hu, K-P. Huang, H-H. Shen, R. Muniyandi. *Electrochim. Acta.* 221, 2016, 144–153.
- [15] D. Voiry, J. Yang, J. Kupferberg, R. Fullon, C. Lee, H. Y. Jeong, H. S. Shin, *Science*, 23, 2013, 1413-1416.

- [16] E. Povedano, F. H. Cincotto, C. Parrado, P. Díez, A. Sánchez, T. C. Canevari, S. A.S. Machado, J. M. Pingarrón, R. Villalonga. *Biosens. Bioelectron.* 89, 2017, 343–351.
- [17] Z. Wang, Z. Dai. *Nanoscale*, 7, 2015, 6420–6431.
- [18] X. T. Zheng, A. Ananthanarayanan, K. Q. Luo, P. Chen, *Small*. 11,2015, 1620–1636.
- [19] S. N. Baker, G. A. Baker. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 2010, 6726 – 6744.
- [20] S. Li, L. Wang, C. C. Chusuei, V. M. Suarez, P. L. Blackwelder, M. Micic, J. Orbulescu, R. M. Leblanc, *Chem. Mater.* 27, 2015, 1764–1771.
- [21] Q Huang, H. Zhang, S. Hua, F. Li, W. Weng, J. Chen, Q. Wang, Y. He, W. Zhang, X. Bao, *Biosens. Bioelectron.* 52, 2014, 277–280.
- [22] C. S. Lim, K. Hola, A. Ambrosi, R. Zboril, M. Pumera. *Electrochem. Communications* 52, 2015, 75–79.
- [23] Q. Lu, J. Deng, Y. Hou, H. Wang, H. Li, Y. Zhang, S. Yao. *Chem. Commun.*, 51, 2015, 7164.
- [24] F. R. Baptista, S. A. Belhout, S. Giordanib, S. J. Quinn. *Chem. Soc. Rev.*, 44, 2015, 4433.
- [25] H. Ding, S-B Yu, J-S. Wei, H-M. Xiong. *ACS Nano*. 10, 2016, 484–491.
- [26] Y. F. Wang and A. G. Hu, *J Mater Chem C*, 2014, 2, 6921-6939.
- [27] S-J. Lin, L. Guarente. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 2003, 241–246.
- [28] F. S. Omar, N. Duraisamy, K. Ramesh, S. Ramesh. *Biosen. Bioelectron.* 79, 2016, 763–775.
- [29] H. Jaegfeldt, *J. Electroanal. Chem.*, 110, 1980, 295—302.
- [30] J. Moiroux, P.J. Elving. *Anal. Chem.*, 50, 1978,1056–1062.
- [31] Aronov, P., Kawahara, Y., Cox, J., Christison, T., Lopez, L. Determination of NADH and NADPH using ion chromatography and high resolution accurate mass spectrometry. In: Thermo Scientific. 2014, pp. 1–8.

- [32] T.S. Blacker, Z.F. Mann, J.E. Gale, M. Ziegler, A.J. Bain, G. Szabadkai, M.R. Duchon. *Nat. Commun.*, 5, 2014, 3936.
- [33] N. Salgueiro-González, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez. *Anal. Chim. Acta.* 962, 2017, 1-14.
- [34] D. G. Skledar, L. P. Mašič. *Environ Toxicol Pharmacol.* 47, 2016, 182-199.
- [35] C. Nicolucci, S. Errico, A. Federico, M. Dallio, C. Loguercio, N. Diano. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 140, 2017, 105-112.
- [36] J. Zhang, T. Zhang, T. Guan, P. Ruan, D. Ren, W. Dai, H. Yu. *Chemosphere.* 180, 2017, 253-258.
- [37] Y. Zhang, Y. Wang, W. Zhu, J. Wang, X. Yue, W. Liu, D. Zhang, J. Wang. *Microchim. Acta*, 184, 2017, 951-959.
- [38] N. K. Temel, R. Gürkan. *Anal. Methods.* 2017, 9, 1190-1200.
- [39] Y. Zhou, L. Yang, Y. Dang. *Sens. Actuators, B.* 245, 2017, 238–246.
- [40] M. Yamaura, R.L Camilo, L.C Sampaio, M.A Macêdo, M Nakamura, H.E Toma. *J. Magn. Magn. Mater.* 279, 2004, 210.
- [41] T. C. Canevari, M. Nakamura, F.H.Cincotto, F. M. de Melo, H. E. Toma, *Electrochim. Acta*, 209, 2016, 464.
- [42] A. M. DIMIEV. J. M. TOUR, *ACS Nano*, 8, 2014, 3060–3068.
- [43] C. T. Chapman, W. Liang, X. Li. *J. Phys. Chem. Lett.* 2, 2011, 1189–1192.
- [44] W. Zhao, L. Zhu, Y. Lu, L. Zhang, R. H. Schuster, W. Wang. *Synthetic Metals* 169, 2013, 59– 63.
- [45] M-L. Chen, Y-J He, X-W. Chen, J-H Wang. *Langmuir*, 28, 2012, 16469.
- [46] S. Sun, H. Zeng, D. B. Robinson, S. Raoux, P. M. Rice, S. X. Wang, G. Li. *J. am. chem. soc.* 126, 2004, 273-279.

- [47] A. P. Grosvenor, B. A. Kobe, M. C. Biesinger, N. S. McIntyre. *Surf. Interface Anal.* 36, 2004, 1564–1574.
- [48] T. Yamashita, P. Hayes. *Applied Surface Science.* 254, 2008, 2441–2449.
- [49] T. Fujii, F.M.F. de Groot, G.A. Sawatzky, F.C. Voogt, T. Hibma, K. Okada, *Phys.Rev. B: Condens. Matter.* 59, 1999, 3195.
- [50] B. Folkesson, R. Larsson. *J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom.* 50,1990, 267-276.
- [51] Wagner, J.F. Moulder, L.E. Davis, W.M. Riggs, *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy*, Perking-Elmer Corporation, 1979.
- [52] S. Guo, D. Wen, Y. Zhai, S. Dong, E. Wang, *Acsnano*, 4, 2010, 3959–3968.
- [53] V. Chandra, J. Park, Y. Chun, JW. Lee, IC. Hwang, KS, Kim. *ACS Nano.* 4, 2010, 3979–86.
- [54] P. Yu, X. Wen, Y-R. Toh, J. Tang. *J. Phys. Chem. C.* 116, 2012, 25552.
- [55] H. Li et al. *Biosens. Bioelectron.* 26, 2011, 3590–3595.
- [56] H Teymourian, A. Salimi, S. Khezrian. *Biosens. Bioelectron.* 49, 2013, 1–8.
- [57] K.J. McKenzie, F. Marken, *Pure and Applied Chemistry.* 73, 2001, 1885–1894.
- [58] H. T. A. Salimi, S. Khezrian. *Biosens. Bioelectr.* 49, 2013, 1–8.
- [59] T. C. Canevari, P. A. Raymundo-Pereira, R. Landers, E. V Benvenuti, S. A.S. Machado, *Talanta* 116, 2013, 726–735.
- [60] H.-S. Wang, T.-H. Li, W.-L. Jia, H.-Y. Xu. *Biosens. Bioelectr.* 22, 2006, 664–669.
- [61] T H. Teymourian, A. Salimi, S. Khezrian. *Biosens. Bioelectr.* 49, 2013, 1–8
- [62] H. Teymourian, Salimi, S. Khezrian. *Biosens. Bioelectr.* 33, 2012, 60–68.
- [63] O-M. Istrate, L. Rotariu, C. Bala. *Microchim Acta* 183, 2016, 57–65
- [64] S. Han, T. Du, H. Jiang, X. Wang. *Biosens. Bioelectr.* 89, 2017, 422-429.
- [65] M. Sahin, E. Ayranci. *Electrochim. Acta*, 166, 2015, 261–270.
- [66] T C. Canevari, R. C.G. Vinhas, R. Landers, Y. Gushikem. *Biosens. Bioelectr.* 26, 2011, 2402-2406.

- [67] Z. Luo, Y. Lu, L. A. Somers and A. T. C. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 2009, 898–899.
- [68] J. M. Gonçalves, R. R. Guimaraes, C. V. Nunes Jr., A. Duarte, B. B. N. S. Brandao, H. E. Toma and K. Araki. *RSC Adv.*, 6, 2016, 102504–102512.
- [69] D. Li, M. B. Muller, S. Gilje, R. B. Kaner and G. G. Wallace, *Nat. Nanotechnol.*, 3, 2008, 101–105.
- [70] S. Pei, H-M. Cheng, *Carbon* 50, 2012, 3210–3228.
- [71] Mildred S. Dresselhaus, Ado Jorio, Mario Hofmann, Gene Dresselhaus, Riichiro Saito. *Nano Lett.* 10, 2010, 751–758.
- [72] Andrea C. Ferrari. *Solid State Communications* 143, 2007, 47–57.
- [73] J. Chazalviel, P. Allongue. *J Am Chem Soc.* 133, 2011, 762-764.
- [74] R. Shi, J. Liang, Z. Zhao, A. Liu, Y. Tian. *Talanta*, 169, 2017, 37-43
- [75] L. Zhu, Y. Cao, G. Cao. *Biosensors and Bioelectronics*, 54 (2014) 258–261)
- [76] T. Zhana, Y. Song, Z. Tan, W. Hou, *Sensors and Actuators B* 238 (2017) 962–971)
- [77] Y. Zhang, Y. Cheng, Y. Zhou, B. Li, W. Gu, X. Shi, Y. Xian. *Talanta*, 107, (2013), 211–218
- [78] Y. Li, X. Zhai, X. Liu, L. Wang, H. Liu, H. Wang. *Talanta*, 148 (2016) 362–369
- [80] L. Wu, D. Deng, J. Jin, X. Lu, J. Chen. *Biosensors and Bioelectronics*. 35 (2012) 193–199.
- [81] H. Yin, Y. Zhou, S. Ai, Q. Chen, X. Zhu, X. Liu, L. Zhu, *J. Hazard. Materials* 174, 2010, 236–243.