



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUIMICA

THIAGO AUGUSTO DIAS SANTOS

**DETECÇÃO FOTOELETROANALÍTICA DE ADRENALINA BASEADA
EM DNA E NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ SENSIBILIZADAS COM
BIS(ETILENODITIO)TETRATIOFULVALENO EXPLORANDO LUZ DE
LED**

Orientador: Prof. Dr. Flávio Santos Damos

São Luís – MA
2017

THIAGO AUGUSTO DIAS SANTOS

DETECÇÃO FOTOELETROANALÍTICA DE ADRENALINA BASEADA
EM DNA E NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ SENSIBILIZADAS COM
BIS(ETILENODITIO)TETRATIOFULVALENO EXPLORANDO LUZ DE
LED

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQuim) da Universidade Federal do Maranhão como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Analítica
Orientador: Prof. Dr. Flávio Santos Damos

São Luís – MA
2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Flávio Santos Damos (Orientador)

Prof.^a Dr.^a Adriana Barbosa Araújo (IFMA)

Prof.^a Dr.^a Sirlane Aparecida Abreu Santana (UFMA)

AGRADECIMENTOS

Ao Deus que muda o tempo e as estações, que remove reis e estabelece reis, o meu muito obrigado por mais uma conquista;

Ao Prof. Dr. Flávio Santos Damos pela valiosíssima orientação bem como o incentivo prestado por meio de sua forma de trabalho com seriedade, compromisso e demais virtudes recomendadas a um bom professor e pesquisador;

À Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Silva Luz pelas palavras de ânimo e encorajamento ao grupo e pela motivação constantemente oferecida, além da oportunidade de aprendizado nas disciplinas oferecidas pelo PPGQuim;

Aos meus pais, José Augusto da Silva Santos e Enir Orina Helena Dias Santos por toda a criação concedida nesses longos 25 anos e por todo o empenho, dedicação e apoio prestado, os quais foram também de fundamental importância para que eu não desistisse mediante as dificuldades e prosseguisse até este momento ímpar de mais uma vitória;

Agradeço também de forma muito especial à minha tia Eniciomar Dias e minha amada irmã Lilian Monteiro, as quais se dedicaram além das expectativas para que meu crescimento fosse pleno e assim me tornasse o homem que sou hoje;

A todos os meus familiares que de forma direta ou indireta também contribuíram para meu crescimento e aquisição de valores morais os quais permanecem sendo válidos em minha vida;

A todos os meus amigos da Igreja Adventista do Sétimo Dia Central de São Luís – MA e de Levilândia em Ananindeua – PA pelo apoio e pelas orações oferecidas em meu favor;

A todos os amigos do Laboratório de Sensores, Dispositivos e Métodos Analíticos (LabS) pelo companheirismo, por toda a ajuda prestada, pelos momentos de confraternização e especialmente pela união que certamente faz toda a diferença em um grupo de pesquisa;

Ao meu amigo Sakae Yotsumoto Neto pela paciência em me ensinar a trabalhar com os equipamentos do Laboratório e no tratamento de dados também, bem como por sua disposição em ajudar a todos no grupo;

À Universidade Federal do Maranhão pelo espaço e infraestrutura concedidos para a realização da pesquisa;

Aos Docentes do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQuim) pelas disciplinas oferecidas e que contribuíram tanto para o meu desenvolvimento intelectual como também para o desenvolvimento do presente trabalho;

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq (303525/2016-9; 421139/2016-1; 305680/2015-3; 426337/2016-6), FAPEMA (PRONEM-00155/16; UNIVERSAL-00927/16) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica (465389/2014-7), pelo auxílio financeiro e bolsa concedidos que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Um sensor fotoeletroanalítico foi desenvolvido, baseado em ácido desoxirribonucleico (DNA) e nanopartículas de dióxido de titânio anatase (TiO_2) sensibilizadas com bis(etilenoditio)tetratiofulvaleno (BEDT-TTF) para a determinação de adrenalina, também denominada como epinefrina. O fotossensor compósito desenvolvido foi denominado como BEDT-TTF/DNA/ TiO_2 /ITO e exibiu uma elevada fotocorrente para a adrenalina sob a irradiação do diodo emissor de luz (LED) em comparação com cada componente do material compósito. Sob condições otimizadas, o sensor BEDT-TTF/DNA/ TiO_2 /ITO exibiu um intervalo de resposta linear de 10 nmol L^{-1} para $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ com uma sensibilidade de $8,1 \text{ nA L } \mu\text{mol}^{-1}$ e limite de detecção de 1 nmol L^{-1} para a adrenalina. O sensor fotoeletroquímico mostrou elevada fotocorrente para a adrenalina em comparação com a resposta de fotocorrente para ácido ascórbico e ácido úrico. O fotossensor BEDT-TTF/DNA/ TiO_2 /ITO foi aplicado com sucesso em amostras de urina, com valores de recuperação entre 96 e 106%.

Palavras-chave: adrenalina, sensor fotoeletroquímico, diodo emissor de luz (LED) visível, ácido desoxirribonucleico.

ABSTRACT

A photoelectroanalytical sensor was developed, based on deoxyribonucleic acid (DNA) and anatase titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles sensitized with bis(ethylenedithio)tetrathiofulvalene (BEDT-TTF) for determination of the adrenaline, also denominated as epinephrine. The photosensor composite developed was denominated as BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO and shows a high photocurrent for the adrenaline under light emitting diode (LED) irradiation in comparison to each component of the composite material. Under optimized conditions, the BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO sensor shows a linear response range from 10 nmol L⁻¹ up to 100 μmol L⁻¹ with a sensitivity of 8,1 nA L μmol⁻¹ and limit of detection of 1 nmol L⁻¹ for the adrenaline. The photoelectrochemical sensor showed high photocurrent to adrenaline in comparison to photocurrent response to ascorbic acid and uric acid. The BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO photoelectrochemical sensor was successfully applied to urine samples, with recovery values between 96 and 106%.

Keywords: adrenaline, photoelectrochemical sensor, visible light emitting diode (LED), deoxyribonucleic acid.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Ampère
ADR	Adrenalina
AFM	Microscopia de Força Atômica (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
Ag/AgCl	Eletrodo de prata/cloreto de prata
A-T	Adenina-timina
BEDT-TTF	Bis(etilenoditio)tetratiofulvaleno
BR	Tampão Britton-Robson
CB	Banda de Condução (<i>Conduction Band</i>)
CE	Contra-Eletrodo (<i>Counter Electrode</i>)
CV	Voltametria Cíclica (<i>Cyclic Voltammetry</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DMF	Dimetilformamida
DPV	Voltametria de Pulso Diferencial (<i>Differential Pulse Voltammetry</i>)
ds-DNA	DNA dupla hélice (<i>double stranded-DNA</i>)
DSSCs	Células Solares Sensibilizadas com Corantes (<i>Dye Sensitized Solar Cells</i>)
e^-_{CB}/h^+_{VB}	Par elétron-lacuna
ECL	Eletroquimioluminescência
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva (<i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>)
E_{fb}	Potencial de banda plana

EIS	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (<i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i>)
eV	Elétron-volt
ex-TTF	Tetratiofulvalenos de conjugação π-extendida
FE-SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (<i>Field Emission Scanning Electron Microscopy</i>)
G-C	Guanina-citosina
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfônico
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de mais Alta Energia (<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
IR	Infravermelho (<i>Infrared</i>)
ITO	Óxido de Estanho e Índio (<i>Indium Tin Oxide</i>)
L-DOPA	Levogiro – Dihidroxifenilalanina
LED	Diodo Emissor de Luz (<i>Light Emitting Diode</i>)
LiTCNX	Tetracianoetilenetos de Lítio
LOD	Limite de Detecção (<i>Limit of Detection</i>)
LSV	Voltametria de Varredura Linear (<i>Linear Sweep Voltammetry</i>)
LUMO	Orbital Molecular Desocupado de mais Baixa Energia (<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>)
N_b	Número de portadores de carga
PEC	Fotoeletroquímica (<i>Photoelectrochemistry</i>)
PNMT	Fentolamina N-metil-transferase
QDs	Pontos Quânticos (<i>Quantum Dots</i>)

QCM	Microbalança de Cristal de Quartzo (<i>Quartz Crystal Microbalance</i>)
RE	Eletrodo de Referência (<i>Reference Electrode</i>)
rpm	Rotações por minuto
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SECM	Microscopia Eletroquímica de Varredura (<i>Scanning Electrochemical Microscopy</i>)
SPR	Ressonância de Plasmon de Superfície (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
ss-DNA	DNA fita simples (<i>single stranded-DNA</i>)
SWV	Voltametria de Onda Quadrada (<i>Square Wave Voltammetry</i>)
TCNE	Tetracianoetileno
TCNQ	Tetracianoquinodimetano
T_e	Tempo de vida do elétron
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TTF	Tetratiofulvaleno
UV	Ultravioleta
VB	Banda de Valência (<i>Valence Band</i>)
WE	Eletrodo de Trabalho (<i>Working Electrode</i>)
XPS	Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raio-X (<i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i>)
XRD	Difração de Raio-X (<i>X-ray Diffraction</i>)

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação de Mott-Schottky (1)

$$\frac{1}{C^2} = \frac{2}{N_D e \epsilon_0 \epsilon} \left(E - E_{fb} - \frac{kT}{e} \right)$$

Densidade de portadores de carga (2)

$$N_D = \frac{2}{e \epsilon_0 \epsilon} \left(\frac{dE}{d(C^{-2})} \right)$$

Tempo de vida do elétron (3)

$$\tau_e = 1 / (2\pi f_{max})$$

Resposta linear para a adrenalina (4)

$$I_{fotocorrente} = (25 \pm 3) + (8,1 \pm 0,1) [ADR]$$

Limite de Detecção (5)

$$LOD = 3 \sigma_{bl} / \text{inclinação}$$

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de uma célula fotoeletroquímica.....**Pág. 26**

Figura 2: Representação esquemática da geração de fotocorrente.....**Pág. 27**

Figura 3: Esquema ilustrativo de geração de fotocorrente catódica.....**Pág. 29**

Figura 4: Representação esquemática dos níveis discretos de átomos isolados em bandas de energia**Pág. 31**

Figura 5: O nível de Fermi em metais, semicondutores e isolantes.....**Pág. 32**

Figura 6: Esquema ilustrativo de montagem da célula fotoeletroquímica para a realização das medidas amperométricas**Pág. 49**

Figura 7: Diagrama de Nyquist obtidos para BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO em solução aquosa 0,1 mol L⁻¹ de Na₂SO₄ sob condições de potencial de circuito aberto na presença (círculos pretos) e ausência (círculos em vermelho) de iluminação proveniente de luz LED**Pág. 54**

Figura 8: Gráfico de Mott-Schottky (C² vs E) obtido para TiO₂/ITO (círculos em vermelho) e BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO (círculos pretos) a uma frequência de 10 kHz**Pág. 55**

Figura 9: Ângulo de fase em função da frequência obtidos para TiO₂/ITO (círculo preto) e BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO (círculo vermelho) em KCl 0,1 mol L⁻¹ e ácido ascórbico 0,02 mol L⁻¹**Pág. 58**

Figura 10: Resposta de fotocorrente do BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO (1), BEDT-TTF/TiO₂/ITO (2), TiO₂/ITO (3) e ITO (4). Experimentos realizados em solução tampão fosfato (pH 7,0) contendo 1 mmol L⁻¹ de adrenalina e potencial aplicado de 0,25 V vs. Ag/AgCℓ_(saturado)**Pág. 59**

Figura 11: Esquema reacional proposto para a detecção fotoeletroanalítica de adrenalina**Pág. 61**

Figura 12: Influência da solução tampão na resposta do fotossensor para adrenalina a 100 μmol L⁻¹. As medidas foram realizadas em solução tampão fosfato, HEPES e Britton-Robson 0,1 mol L⁻¹ e um potencial aplicado de 0,25 V vs. Ag/AgCℓ_(saturado)**Pág. 62**

Figura 13: Influência do pH da solução sobre a resposta do fotossensor para 100 μmol L⁻¹ de adrenalina. As medidas foram realizadas em solução tampão fosfato na concentração de 0,1 mol L⁻¹ e potencial aplicado de 0,25 V vs. Ag/AgCℓ_(saturado)**Pág. 63**

Figura 14: Influência do potencial aplicado para 100 μmol L⁻¹ de adrenalina. As medidas foram realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,0**Pág. 65**

Figura 15: Fotocorrentes do sensor fotoeletroquímico obtidos sobre condições otimizadas para adrenalina em intervalos de concentração entre 0,01 e 100 μmol L⁻¹ (curva analítica inserida)**Pág. 66**

Figura 16: Fotocorrente obtida para o sensor fotoeletroquímico proposto em relação às várias substâncias interferentes em comparação com a obtida para adrenalina sobre condições otimizadas a potencial aplicado de 0,4 V vs. Ag/AgCℓ_(saturado). A concentração de todas as espécies foi fixada a 100 μmol L⁻¹**Pág. 70**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação de alguns parâmetros analíticos do fotossensor proposto para determinação de adrenalina frente a outras técnicas eletroquímicas**Pág. 68**

Tabela 2: Valores de recuperação de ADR obtidos para duas amostras de urina humana (n = 5)**Pág. 71**

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1. Fundamentos Teóricos	23
2.1.1. <i>Definição e Classificação de Sensores Químicos</i>	23
2.1.2. <i>Sensores Fotoeletroquímicos</i>	24
2.1.3. <i>O Modelo das Bandas de Energia</i>	30
2.1.4. <i>O Efeito da Fotoexcitação na Transferência de Elétrons</i>	33
2.2. Revisão Bibliográfica	36
3. OBJETIVOS	46
3.1. Objetivo Geral	46
3.2. Objetivos Específicos	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1. Equipamentos e Reagentes	48
4.2. Procedimentos Experimentais	49
4.2.1. <i>Limpeza do Eletrodo ITO</i>	49
4.2.2. <i>Construção do sensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO</i>	50
4.3. Preparo de Soluções	51
4.3.1. <i>Soluções Tampão</i>	51
4.3.2. <i>Adrenalina e Espécies Interferentes</i>	51
4.4. Preparo e análise das amostras de urina	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1. Caracterização da plataforma fotoeletroquímica por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)	54

5.2. Características fotoeletroquímicas do Sensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂	59
5.3. Otimização da Resposta do Sensor Fotoeletroanalítico BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO	62
5.4. Desempenho Analítico do Sensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO	66
5.5. Aplicação do sensor fotoeletroanalítico BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO em amostras de urina humana	71
6. CONCLUSÃO	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso é um dos sistemas mais complexos do corpo humano e constitui um aspecto diferencial no que diz respeito à correspondência e harmonia entre os diversos elementos constituintes do maquinário humano, bem como para as relações do organismo em conjunto com o meio exterior. Além de elementos conjuntivos comuns, entram na formação do tecido nervoso as células nervosas, mais comumente denominadas como neurônios. Essas células especializadas produzem importantes substâncias que agem como mensageiros químicos, que são os neurotransmissores, os quais atuam tanto no Sistema Nervoso Central (encéfalo e medula espinhal) quanto no Sistema Nervoso Periférico (nervos periféricos e junções neuromusculares)¹.

A maneira pela qual os neurotransmissores são transportados até seus locais de ação se dá por meio das sinapses nervosas, que são predominantemente sinapses químicas as quais ocorrem entre neurônios ou ainda entre um neurônio e outro tipo de célula, de modo que o sentido do transporte ocorre geralmente de um terminal axonal (neurônio pré sináptico) e a região dendrítica de um neurônio seguinte (neurônio pós sináptico). O impulso nervoso pode ser estimulado por esses mensageiros químicos, ou esses neurotransmissores podem atuar especificamente em um determinado órgão ou músculo alvo².

Dependendo da atuação específica e levando também em consideração a estrutura química, os neurotransmissores são constituídos em classes diferenciadas sendo que dentre tais classes, as catecolaminas são um importante grupo de neurotransmissores aminérgicos que apresentam em sua estrutura química o grupo catecol associado e um grupo amino. Os neurotransmissores que compõem esta classe são: L-DOPA, dopamina, noradrenalina e adrenalina, e possuem como precursor comum o aminoácido tirosina³.

Dentre esses neurotransmissores catecolaminérgicos, a adrenalina, também conhecida como epinefrina, é um dos componentes que recebe especial atenção em virtude de sua aplicação em procedimentos de urgência e emergência há décadas, na administração dessa substância em procedimentos de desfibrilação cardíaca, ressuscitação cardiopulmonar e pós-parada cardíaca⁴.

A adrenalina é um hormônio simpaticomimético e neurotransmissor secretado pelas glândulas suprarrenais e, em condições fisiológicas, existe no tecido nervoso como cátion orgânico, além de ser comumente encontrado em fluidos biológicos⁵. Seus níveis no corpo afeta uma série de ações do sistema nervoso, como: pressão arterial, frequência cardíaca, lipólise, resposta imune e metabolismo de glicogênio⁶. A adrenalina pode também ser obtida a partir de noradrenalina pela ação da enzima fentolamina N-metil-transferase (PNMT)³.

Diante de sua peculiaridade e importância, a quantificação de adrenalina em amostras biológicas é de grande interesse na atualidade, sendo a urina uma das amostras mais facilmente obtidas e, conseqüentemente, uma das mais comumente empregadas na análise clínica de adrenalina visando o diagnóstico. De forma geral, os níveis de adrenalina nos fluidos biológicos, como a urina, dependem da idade e condições do paciente⁷. Para pessoas saudáveis, por exemplo, a concentração fisiológica de adrenalina encontrada em amostras de urina está em nível nanomolar (22 – 109 nmol L⁻¹)⁸.

Dessa maneira, diversas metodologias analíticas têm sido propostas para determinação desse neurotransmissor, dentre as quais pode-se mencionar os métodos fluorimétricos⁹, espectrofotométricos¹⁰, radioimunoensaios enzimáticos¹¹, cromatografia gasosa¹², cromatografia líquida de alta eficiência¹³, eletroforese capilar¹⁴ e os métodos eletroquímicos¹⁵⁻¹⁸.

Apesar desse grande número de métodos analíticos que têm sido propostos para a determinação de adrenalina, a maioria deles sofre de algumas desvantagens, como custo elevado, longo tempo de análise, necessidade de pré-tratamento extensivo de amostra, derivatização molecular, extração e purificação, bem como a exigência de usuários altamente treinados ou qualificados. Os ensaios fluorimétricos e radio-enzimáticos são atualmente os mais utilizados na determinação de adrenalina em plasma, urina e tecidos, sendo que o ensaio radio-enzimático é significativamente mais sensível e específico em comparação ao método fluorimétrico, porém, é tecnicamente muito complexo, consome uma grande quantidade de tempo para o preparo e determinação da amostra, além do custo elevado¹⁵.

Nesse sentido, os métodos eletroquímicos apresentam-se como alternativa mais viável para a quantificação de adrenalina, uma vez que estes métodos são de custo mais acessível, de fácil operação e resposta rápida em comparação aos

métodos analíticos mencionados. No entanto, para a determinação desse neurotransmissor, a maioria dos sensores eletroquímicos apresenta um baixo intervalo de resposta linear ou apresentam valores de limite de detecção e sensibilidade fora da faixa de concentração necessárias para a determinação de adrenalina em amostras biológicas¹⁶⁻¹⁸.

Tendo em vista que os dispositivos fotoeletroquímicos têm emergido atualmente como sistemas potencialmente sensíveis e com elevada capacidade de proporcionar altos intervalos de resposta linear, sua aplicação na quantificação de adrenalina se apresenta como uma alternativa promissora¹⁹⁻²¹. Em termos gerais, a detecção fotoeletroquímica é baseada na geração de fotocorrente proveniente da excitação de um material fotoativo a partir da incidência de luz ou alguma outra forma de radiação eletromagnética. Além disso, tendo em vista que a fonte de excitação e o sistema de detecção são de natureza distintas, os dispositivos fotoeletrocatalíticos apresentam uma elevada relação sinal/ruído^{21,22}.

Materiais fotoativos empregados em fotoeletroquímica, tais como os óxidos semicondutores, têm atraído grande interesse quanto ao desenvolvimento de sistemas fotocatalíticos e fotoeletroquímicos. Dentre estes, o dióxido de titânio anatase (TiO_2) é um dos mais empregados em sistemas fotoeletroquímicos em virtude de algumas vantagens, como: baixa toxicidade, hidrofobicidade, baixo custo e estabilidade à fotocorrosão²². Além disso, o TiO_2 anatase apresenta bandas de valência com valores elevados e negativos, o que permite que as lacunas geradas tendam a se localizar na superfície da partícula, tornando-a extremamente ativa para captar elétrons livres de moléculas doadoras²².

Em contrapartida, o TiO_2 apresenta algumas desvantagens para aplicações como material fotocatalítico, incluindo a recombinação dos portadores de carga fotogerados e valor de *band gap* elevado, em torno de 3,22 eV, de forma a limitar esse semicondutor à absorção eficiente de radiação principalmente na região do ultravioleta²³. Desta forma, esse alto valor de *band gap* do TiO_2 limita sua potencial aplicação ao campo fotoeletroanalítico no que tange a determinação de espécies biológicas, tendo em vista que a radiação na região do UV pode danificar essas espécies²⁴.

Nesse sentido, algumas estratégias têm sido propostas com o objetivo de melhorar o desempenho fotoeletroquímico do TiO_2 quanto à sua capacidade de absorção na região do visível. Dentre as estratégias empregadas, a dopagem com

íons de metais de transição é bastante comum, além da introdução de defeitos na rede do TiO_2 , bem como sua sensibilização com corantes⁶. Além disso, o TiO_2 tem sido sensibilizado com vários compostos de maneira a buscar maior atratividade às propriedades desse semicondutor no que diz respeito ao desenvolvimento de dispositivos fotoeletroquímicos, incluindo a introdução de ftalocianinas^{25,26}, polímeros condutores²⁷, porfirinas²⁸, tetracianoetilenetos de lítio (LiTCNX)²⁹, pontos quânticos (*Quantum Dots* – *QDs*)³⁰, entre outros.

Dentro da perspectiva do uso de corantes para sensibilização do TiO_2 , o tetratiofulvaleno (TTF) é um forte doador de elétrons- π que tem atraído especial atenção no desenvolvimento de sensores químicos³¹, materiais supercondutores³², ferromagnéticos³³, dispositivos ópticos não-lineares³⁴, células à biocombustível³⁵ e, mais recentemente, no desenvolvimento de células solares sensibilizadas com corantes (*Dye Sensitized Solar Cells* – *DSSCs*)³⁶. Logo, utilizar esse composto como agente de sensibilização em materiais fotoativos em processos fotoeletroquímicos torna-se atrativa.

Tendo em vista as limitações do TiO_2 quanto à sua capacidade de absorção na região do visível e o uso em potencial dos compostos de TTF no melhoramento da performance de diversos materiais, o presente trabalho tem como propósito o desenvolvimento de um novo sensor fotoeletroquímico à base de óxido de estanho e índio (ITO) modificado com nanopartículas de TiO_2 anatase sensibilizadas com BEDT-TTF para a detecção de adrenalina usando um diodo emissor de luz visível (LED). Adicionalmente, o ácido desoxirribonucleico de fita simples (ss-DNA) foi empregado a fim de obter um filme biocompatível e estável à superfície do eletrodo modificado, com o intuito de proporcionar melhor estabilidade e sensibilidade à plataforma fotoeletroquímica.

Neste sentido, o presente trabalho propõe uma ideia pioneira para a determinação de adrenalina explorando a interação entre BEDT-TTF e as nanopartículas de TiO_2 bem como uma possível interação desse neurotransmissor com o ss-DNA na performance fotoeletroquímica do material compósito, explorando luz proveniente de lâmpada de LED comercial.

REFERENCIAL

TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Fundamentos Teóricos

2.1.1. Definição e Classificação de Sensores Químicos

Os sensores químicos são dispositivos capazes de fornecer continuamente uma informação química ou física de um sistema, convertendo essa informação em um sinal analítico mensurável. De forma geral, um sensor químico é composto basicamente por três unidades funcionais, tais como: (1) uma parte receptora sensível à determinada característica do sistema, (2) um transdutor para converter a informação obtida em um sinal analítico e (3) um amplificador de sinal que, como o nome sugere, irá amplificar o sinal analítico de modo que possa ser facilmente analisado através do dispositivo de saída^{37,38}.

A grande variedade de espécies químicas e biológicas que podem ser analisadas por esses dispositivos se deve à quantidade considerável de sensores disponíveis baseados em diversos tipos de transdução, dentre os quais é possível mencionar algumas classes, como:

a) Sensores Sensíveis à Massa: São baseados na transformação da variação de massa ou rearranjo atômico/molecular de uma determinada superfície em sinais analíticos mensuráveis. Técnicas analíticas como a Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM) e Microscopia de Força Atômica (AFM) integram essa modalidade de sensor cujo funcionamento consiste, de forma geral, no efeito piezoelétrico inverso e direto, respectivamente³⁹.

b) Sensores Ópticos: Esta classe de sensores se baseia na medida de propriedades ópticas e sua conversão em sinais analíticos. Um exemplo desse tipo de dispositivo é a técnica de Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR) cujo funcionamento consiste basicamente no fenômeno de reflexão interna total atenuada^{40,41}.

c) Sensores Elétricos: São dispositivos baseados na conversão das alterações das propriedades elétricas que ocorrem no seio da solução em sinais analíticos mensuráveis, a exemplo do que ocorre em sensores condutimétricos⁴².

d) Sensores Eletroquímicos: Convertem os processos eletroquímicos entre o analito e o eletrodo em sinais analíticos, ou seja, seu princípio de funcionamento é baseado na avaliação de processos redox que envolvem as espécies químicas em solução e o eletrodo. Dentre os transdutores empregados estão os potenciométricos, amperométricos, voltamétricos, impedimétricos, entre outros⁴³.

Além das classes mencionadas, outro grupo de dispositivos que têm atraído grande interesse da comunidade científica são os sensores fotoeletroquímicos. Estes dispositivos constituem-se em uma ferramenta promissora na determinação de muitas espécies químicas e biológicas, além da possibilidade de amplificação de sinal pelo emprego de materiais fotoativos os quais possibilitem de forma eficiente o processo de transferência de elétrons no sistema eletroquímico, a partir da emissão de radiação eletromagnética. Além disso, os fotossensores se mostram também uma ferramenta promissora na investigação de processos de biorreconhecimento, o que possibilita, por exemplo, o estudo de danos no DNA⁴⁴, interações antígeno e anticorpo⁴⁵, imunoenaios⁴⁶, entre outras aplicações.

2.1.2. Sensores Fotoeletroquímicos

Desde a descoberta pioneira do efeito fotoelétrico por Edmond Becquerel em 1839, um público substancial da comunidade científica tem sido atraído e culminou no campo da fotoeletroquímica moderna⁴⁷. Desde então, essa área tem levado adiante pesquisas promissoras em vários campos, como no desenvolvimento de células fotovoltaicas⁴⁸, fotocatalise⁴⁹ e emprego de sensores e biossensores^{50,51}, entre outros reportados na literatura⁵²⁻⁵⁶.

O princípio de funcionamento dos sensores fotoeletroquímicos consiste basicamente na conversão de energia proveniente de luz ou alguma outra forma de radiação eletromagnética em eletricidade e, para isso, empregando um material fotossensível no processo de conversão fotoelétrica⁵⁷. Além de sensores, biossensores fotoeletroquímicos também têm atraído um grande público para aplicações em áreas como o campo farmacêutico e ambiental²¹.

Os sensores fotoeletroquímicos contemplam basicamente as mesmas vantagens dos sensores eletroquímicos, tais como: bons níveis de sensibilidade e

seletividade, estabilidade, custo variando de baixo a moderado e resposta rápida⁵⁸. Adicionalmente, os sensores fotoeletroquímicos requerem um bom material fotocatalítico a fim de possibilitar o processo de transferência de carga. Em suma, esse princípio de funcionamento tem por base o efeito fotoelétrico e, portanto, é necessário que haja energia suficiente para promover os elétrons do material fotoativo de maneira eficiente para que a transferência de carga ocorra na interface eletrodo-solução.

Assim, para que exista transferência de carga a partir da luz nos sistemas fotoeletroquímicos, a energia da radiação emitida deve ser suficiente para promover os elétrons a níveis de energias mais altos, de forma similar às exigências quanto ao efeito fotoelétrico, onde a ejeção de elétrons a partir da emissão de fótons requer uma quantidade mínima de energia (a chamada função trabalho)⁵⁹.

Dentre as limitações dos sensores fotoeletroquímicos, inclui-se a absorção da radiação na região do ultravioleta por parte do material fotoativo, a exemplo do TiO₂. Nesse caso, a detecção de espécies biológicas não é viável uma vez que essa região do espectro ocasiona eventualmente a degradação de biomoléculas^{21,23}. Adicionalmente, dependendo do tipo de material fotossensível empregado, pode haver recombinação do par elétron-lacuna (e^-_{CB}/h^+_{VB}) gerado pela absorção de luz, o que é desfavorável quanto à separação de carga e, conseqüentemente, geração de fotocorrente no sistema.

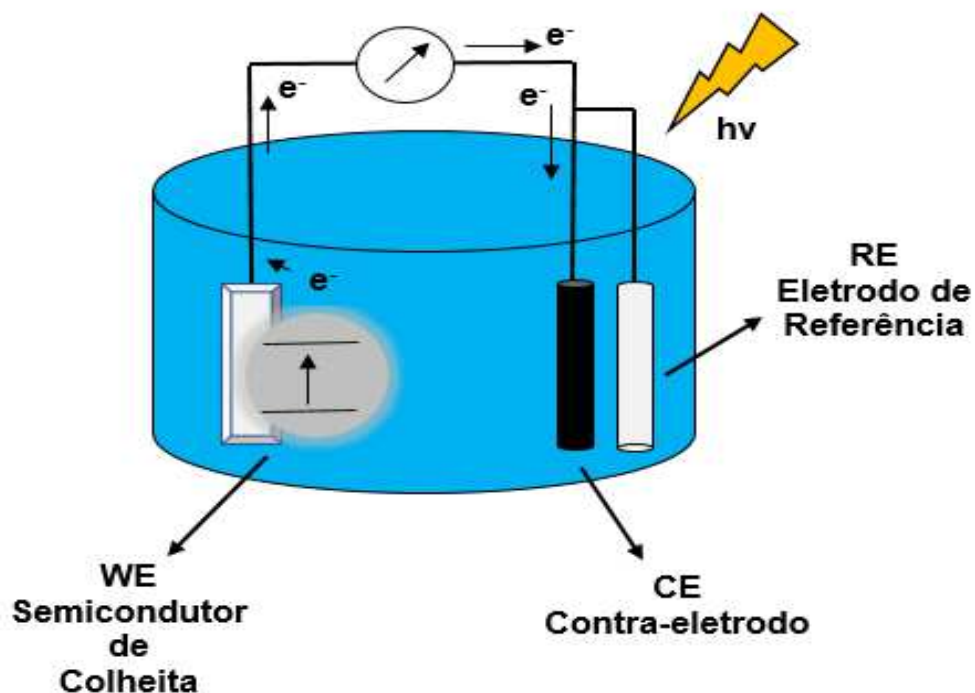
Diante disso, o desenvolvimento de dispositivos fotoeletroquímicos inclui estratégias de amplificação de sinal a partir do processo de funcionalização de superfície dos materiais fotoativos. Alguns trabalhos reportados na literatura abordam acerca do desenvolvimento de pesquisas recentes na área de sensores e biossensores fotoeletroquímicos visando materiais fotocatalíticos promissores. Dentre esses materiais, podem-se destacar os semicondutores, além de materiais à base de carbono, grafeno, QDs e mediadores de transferência de elétrons, como os compostos de TCNX (TCNQ e TCNE)⁶⁰.

Portanto, os sistemas fotoeletroquímicos têm recebido grande visibilidade como resultado da ampla perspectiva de aplicação destes dispositivos, não somente para determinação de espécies químicas e biológicas, mas também para melhorar a eficiência de conversão fotoelétrica dos materiais fotoativos.

2.1.2.1. A Célula Fotoeletroquímica

O esquema geral de uma célula fotoeletroquímica está ilustrado na figura 1. Em suma, o sistema fotoeletroquímico contém quatro componentes indispensáveis, sendo o primeiro deles um semicondutor de colheita, isto é, o material fotossensível associado a um substrato condutor transparente como eletrodo de trabalho (*Working Electrode – WE*). O segundo componente da célula é um material condutor como contra-eletródo (*Counter Electrode – CE*) e o terceiro componente é um eletrólito suporte, de modo que o processo redox contribua para a transferência de elétrons ao longo do sistema como um todo. É importante ressaltar ainda que esse eletrólito deve ser compatível com a espécie sob investigação (analito) e, portanto, não produza quaisquer efeitos prejudiciais à mesma⁶¹.

Figura 1: Representação esquemática de uma célula fotoeletroquímica.



Fonte: Autor

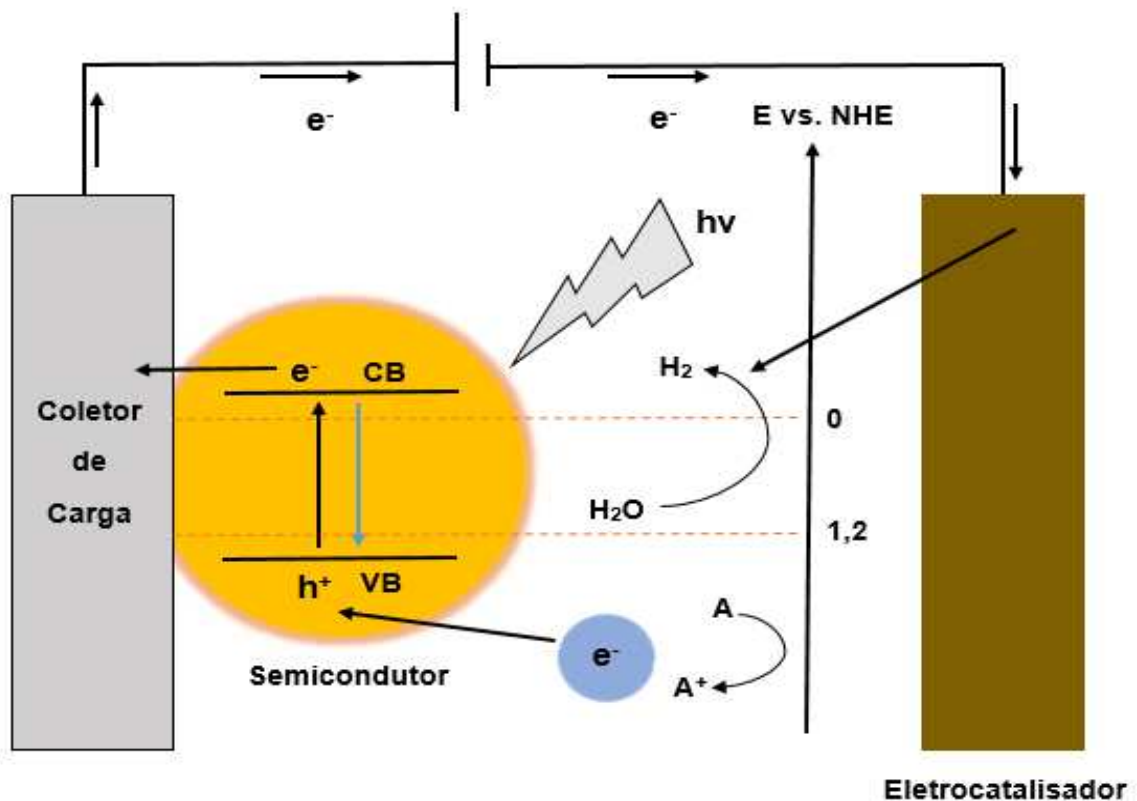
Vale ressaltar que o material fotoativo associado ao WE é o coletor de carga e a transferência de elétrons no sistema se dá via coletor de carga – contra-eletródo. Finalmente, o quarto componente da célula é o eletrodo de referência (*Reference*

Electrode – RE) cujo potencial é fixo e independe da concentração do analito ou demais íons em solução e tem por finalidade o controle do potencial aplicado.

2.1.2.2. Princípio de Funcionamento

De forma geral, a transferência de elétrons na célula fotoeletroquímica ocorre a partir da absorção de energia suficiente para que os elétrons do material fotocatalítico sejam promovidos e desencadeie as reações redox. Como observado na figura 2, com a energia absorvida mediante a radiação luminosa, os elétrons da banda de valência (*valence band – VB*) da espécie fotoativa são promovidos para a banda de condução (*conduction band – CB*) e o elétron é coletado pelo eletrodo de trabalho. Em geral, uma espécie em solução, como um agente redutor, doa elétrons para a lacuna gerada na VB, promovendo dessa forma uma corrente contínua enquanto durar o estímulo luminoso gerador da fotocorrente²¹.

Figura 2: Representação esquemática da geração de fotocorrente.



Fonte: Referência 21

Quando a espécie fotoativa absorve energia suficiente proveniente da radiação eletromagnética, os elétrons na banda de valência saltam para a banda de condução e esse efeito gera na espécie fotoativa a formação do par elétron-lacuna. Essa lacuna gerada na VB do semicondutor pela promoção do elétron excitado à CB tende a recombinar-se com o elétron ejetado se não houver na solução uma espécie que possa mediar essa transferência de elétrons.

Nesse sentido, as lacunas são bons agentes oxidantes, enquanto que o elétron da banda de condução é um bom agente redutor. Esse par e^-_{CB}/h^+_{VB} , portanto, ocasiona a oxidação ou redução da espécie em solução de modo que a fotocorrente gerada mediante a transferência de carga poderá ser anódica ou catódica, a depender da natureza doadora ou aceptora da espécie de sacrifício.

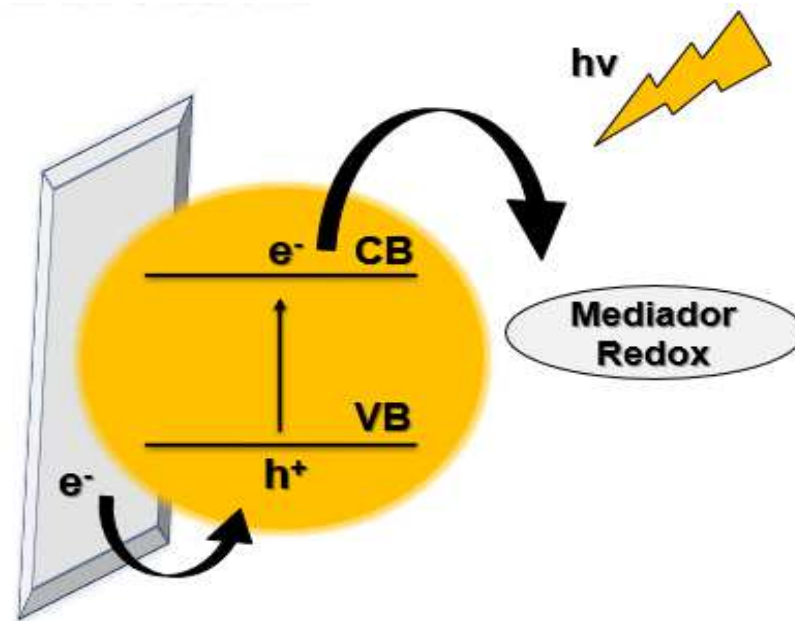
2.1.2.3. Processo de Transferência de Elétrons

A geração de fotocorrente na célula fotoeletroquímica pode ocorrer basicamente através de dois processos. O primeiro conta com a presença de uma espécie em solução como agente redutor, isto é, como doador de elétrons. Nesse caso, o elétron do material fotoativo é promovido para a banda de condução do semicondutor mediante a absorção da luz e o estado excitado do material fotossensível é reduzido ao estado fundamental mediante a oxidação da espécie em solução e, em seguida, o processo ocorre novamente, gerando uma fotocorrente contínua⁵⁷.

Em suma, quando o elétron do material fotocatalítico é excitado e promovido para a banda de condução, a lacuna da banda de valência do semicondutor promove a oxidação da espécie em solução, que contribui com elétrons para a lacuna, e o eletrodo de trabalho coleta os elétrons da CB, gerando uma fotocorrente anódica no sistema, como ilustrado esquematicamente na figura 2.

O segundo processo de transferência de elétrons envolve uma espécie aceitadora em solução. Nesse caso, o elétron da CB do semicondutor é transferido para a espécie em solução e o elétron do WE recombina-se com a lacuna gerada na VB, gerando assim uma fotocorrente catódica no sistema, como ilustra a figura 3.

Figura 3: Esquema ilustrativo de geração de fotocorrente catódica.



Fonte: Autor

Outra maneira pela qual a transferência de carga ocorre no sistema fotoeletroquímico pode ser exemplificada em processos de biorreconhecimento, que envolve a espécie mediadora redox e outra molécula que cause inibição do processo fotoeletroquímico. Numa interação do tipo antígeno e anticorpo, por exemplo, tal processo pode gerar a formação de um complexo com forte caráter eletronegativo, de modo que a transferência de carga no processo fotoeletroquímico é “inibido” no sentido de contribuição de elétrons da espécie de sacrifício (um agente redutor), o que ocasionalmente diminui a resposta fotoeletroquímica^{62,63}.

A magnitude de fotocorrente está relacionada a algumas características importantes, como ao comprimento de onda e intensidade da luz de excitação, a propriedade dos materiais fotocatalíticos, ao tipo e a forma do eletrodo, a amplitude da tensão de polarização e a composição do eletrólito. A detecção de fotocorrente em fotoeletroquímica se dá de forma direta ou indireta e tal como ocorre na eletroquimioluminescência (ECL), que detecta a intensidade da luz, a estimulação e detecção no método fotoeletroquímico ocorre posteriormente à determinação da intensidade da radiação emitida ao sistema⁵⁷.

2.1.3. O Modelo das Bandas de Energia

A descrição do comportamento de materiais semicondutores e isolantes tem por base o modelo de bandas de energia nos sólidos. Uma vez que materiais semicondutores são empregados em sistemas fotoeletroquímicos, o entendimento desse modelo é essencial para a projeção, fabricação, caracterização e uso desses dispositivos.

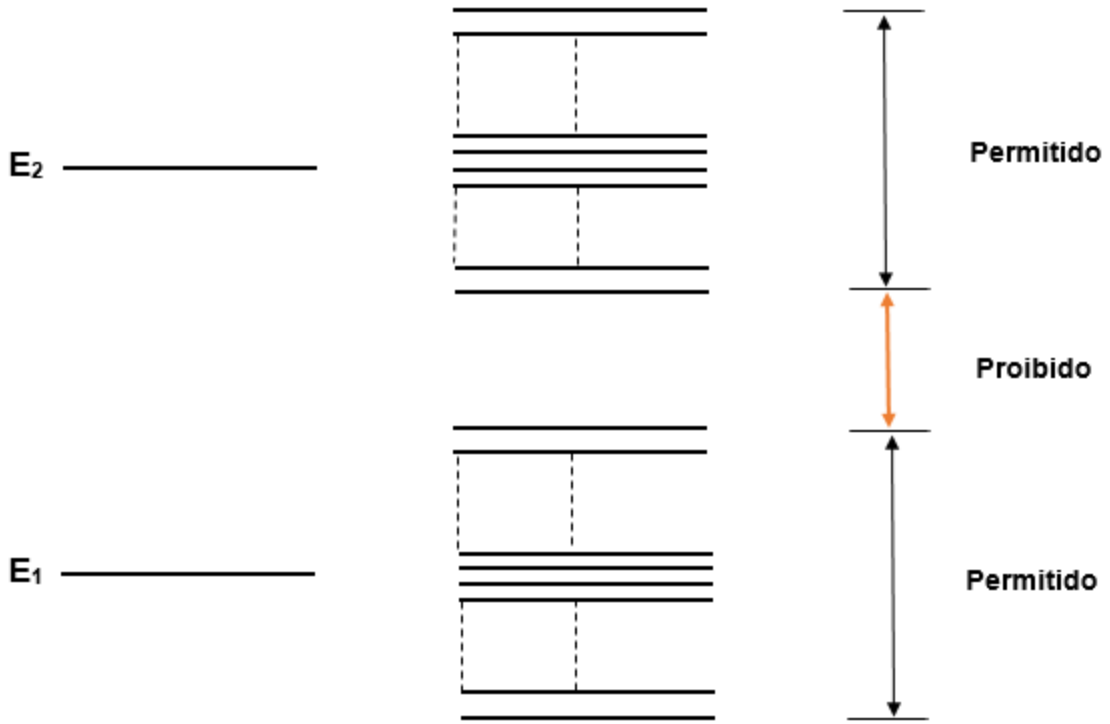
Um dos modelos que propõe a formação de bandas de energia é o modelo de Feynmann, tomando como exemplo básico o átomo de hidrogênio. No caso de materiais sólidos, seus elétrons são distribuídos em níveis discretos de energia e a maneira como esses elétrons se comportam mediante a aplicação de um potencial irá definir sua condutividade elétrica⁶⁴. Portanto, a condutividade elétrica do material depende do número de portadores de carga a partir de uma determinada quantidade de energia fornecida.

2.1.3.1. O Modelo de Feynmann

Para o entendimento do modelo de bandas de energia, admitimos inicialmente dois átomos de hidrogênio e seus respectivos orbitais atômicos. Quando estes átomos se aproximam, ocorre um acoplamento entre os seus estados quânticos, resultando numa divisão de dois novos estados representados por $E_0 - A$ e $E_0 + A$. Isto é, ocorre uma combinação dos seus orbitais atômicos mediante adição e subtração de suas funções de onda^{65,66}.

Um efeito similar acontece quando aproximamos N átomos de quaisquer elementos. Porém, neste caso, os níveis discretos de vários átomos sofrem acoplamento de forma a produzir faixas ou bandas de energias de estados permitidos, como mostrado na figura 4:

Figura 4: Representação esquemática dos níveis discretos de átomos isolados em bandas de energia.



Fonte: Referência 65

Cada banda formada apresenta um número muito grande de estados permitidos e, no caso de semicondutores e isolantes, cada banda está separada da próxima por uma faixa de energia na qual os elétrons não podem popular. Essa região de estados de energia não ocupados por elétrons é denominada de banda proibida, ou *band gap*. Como resultado do acoplamento de N átomos, os elétrons ficam dispostos em bandas de energia, sendo que a banda de energia mais alta na qual todos os níveis estão ocupados por elétrons de valência à temperatura do zero absoluto é a banda de valência e a banda de condução é a região que possui valores de energia características de elétrons livres, isto é, um estado ocupado por elétrons ionizáveis.

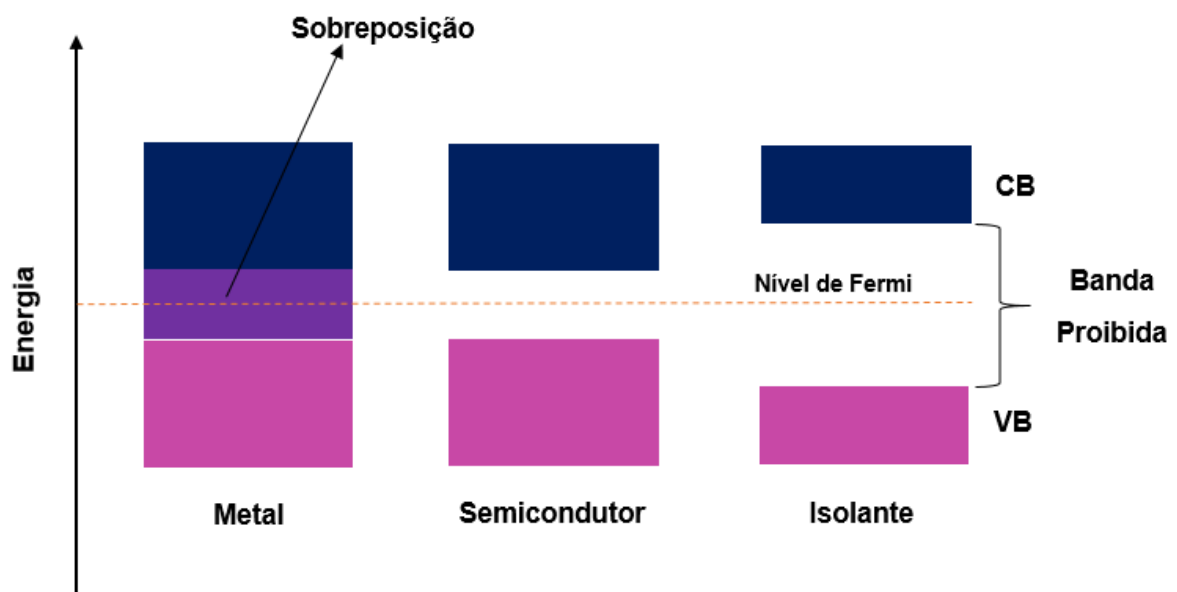
A banda proibida resulta da interação das ondas associadas aos elétrons de condução com os íons da rede cristalina do material⁶⁷. Logo, o comportamento condutor, semiconductor ou isolante do sólido está relacionado à distância em termos de energia entre a VB e CB.

2.1.3.2. A Energia de Fermi

Uma vez que as bandas de energia consistem de espaços ocupados ou de ocupação possível por elétrons, considera-se que há um nível máximo de estados ocupados. Tomando, por exemplo, um sólido metálico com N átomos, com um elétron por átomo, como o sódio, então teremos N elétrons nesse sólido, os quais devem preencher 2 a 2 estados quânticos de menor energia possível e esses elétrons vão ocupando estados distribuídos de forma a preencher os orbitais de energias cada vez maiores. Quando todos os N elétrons estiverem distribuídos em estados permitidos, o último estado ocupado será o limite de níveis ocupados por elétrons, o qual é denominado como nível de Fermi ou energia de Fermi⁶⁸.

Portanto, o nível de Fermi define a fronteira energética entre estados ocupados e desocupados. Esse nível está intimamente ligado às propriedades do material uma vez que a natureza desse material depende da “posição” do nível de Fermi e, portanto, este é um fator que determina as suas propriedades elétricas⁶⁹. A figura 5 mostra esquematicamente a disposição das bandas de valência, de condução e de um possível nível de Fermi nos metais, semicondutores e isolantes:

Figura 5: O nível de Fermi em metais, semicondutores e isolantes.



Fonte: Autor

No caso dos sólidos metálicos, suas bandas são parcialmente preenchidas, em torno de 10 a 90% de sua capacidade, de modo que o nível de Fermi está posicionado na região de sobreposição dessas bandas⁶⁶ e essa sobreposição entre a VB e CB nos metais também está associada ao modelo dos elétrons livres. Como os elétrons de valência são facilmente ionizáveis, uma pequena quantidade de energia é suficiente para promovê-los a níveis mais energéticos e, portanto, numa rede cristalina, esses férmions são facilmente deslocados. Considerando que não existe uma banda de energia proibida nos metais em virtude da sobreposição entre a VB e CB, os materiais metálicos são, por esta razão, bons condutores de eletricidade.

Por outro lado, nos materiais de natureza isolante, o nível de Fermi está no fim de uma banda totalmente preenchida e a banda de condução desse material está distante o suficiente de sua banda de valência, de modo que a energia necessária para promover um elétron da VB para a CB é extremamente alta. Em contraste aos sólidos metálicos, os materiais isolantes têm seus elétrons de valência fortemente atraídos pelo núcleo e como sua última banda totalmente preenchida não está sobreposta com a seguinte, a energia necessária de promoção eletrônica torna improvável um elétron ser ejetado para a banda de condução. Em geral, a energia de *gap* em materiais isolantes é superior a 5 eV⁴².

Finalmente, para semicondutores intrínsecos, o nível de Fermi está a meio caminho entre as bandas de valência e de condução, sendo a VB preferencialmente ocupada pelos elétrons. Porém, o nível de Fermi está a uma distância menor da CB em relação à VB, o que permite que esta banda seja ocupada a partir de energia suficiente fornecida aos férmions^{68,70}. Uma alternativa comum para alterar as propriedades elétricas de semicondutores é a dopagem, na qual a inserção de impurezas doadoras ou aceptoras “desloca” o nível de Fermi para mais próximo da CB ou da VB.

2.1.4. O Efeito da Fotoexcitação na Transferência de Elétrons

A incidência de radiação eletromagnética sobre os materiais fotoativos introduz alterações nas propriedades dos eletrodos e nas reações eletroquímicas.

Essa radiação pode produzir mudanças nos potenciais de circuito aberto e nas características de polarização dos eletrodos.

A fotoexcitação promovida pela radiação pode se dar de duas maneiras. A primeira envolve a fotoexcitação do eletrodo (elétrons em sua camada superficial) e subsequente reação de espécies em solução a partir da fotoexcitação do material e a geração dos portadores de carga no semiconductor incorporado ao eletrodo. O segundo modo com que a reação pode ocorrer é a partir da fotoexcitação de partículas reagentes na solução e sua reação subsequente em um eletrodo não-ativado. Essa fotoexcitação poderá, portanto, gerar uma fotocorrente anódica ou catódica, podendo ser de maneira direta (fotoexcitação do material incorporado ao eletrodo) ou indireta (fotoexcitação de uma espécie fotoativa em solução)^{69,71}.

Quando o elétron é promovido para a banda de condução sob irradiação da luz, é primeiramente de suma importância que haja um método apropriado para suprimir a recombinação do par e^-_{CB}/h^+_{VB} e assim seja gerada fotocorrente no sistema, de modo que este é um fator determinante na escolha do material fotoativo em aplicações analíticas fotoeletroquímicas. Dessa maneira, além da escolha criteriosa da espécie fotocatalítica, é comum o emprego de estratégias de modificação das propriedades desse material visando maior eficiência de conversão fotoelétrica.

A partir do referencial teórico apresentado, fica evidente que os sistemas fotoeletroanalíticos apresentam-se como uma promissora ferramenta para a determinação de espécies químicas e biológicas, tendo em vista que há uma ampla gama de compostos na natureza que podem ser empregadas como moléculas doadoras ou aceptoras. Além disso, como os sistemas fotoeletroquímicos operam de forma que haja uma elevada razão sinal-ruído em virtude da natureza e princípios diferentes da fonte de excitação e do sistema de detecção, bem como há uma gama de materiais fotocatalíticos, o emprego de dispositivos fotoeletroanalíticos apresenta uma excelente alternativa frente às técnicas de custo mais alto como, por exemplo, as cromatográficas e espectroscópicas.

REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA

2.2. Revisão Bibliográfica

Nos últimos anos, a análise fotoeletroquímica por meio de dispositivos sensores tem sido explorada de forma gradativa e tem se apresentado como um método analítico promissor⁷². Levando ainda em consideração a aplicabilidade dos sensores fotoeletroquímicos para a determinação de diversas substâncias, aliada às vantagens desses dispositivos frente a outras técnicas analíticas de custo mais elevado, o emprego de materiais fotocatalíticos para a quantificação de espécies biológicas tem sido gradativamente explorados e, dentre essas moléculas, destacam-se alguns neurotransmissores que podem atuar como biomarcadores no tratamento de algumas doenças⁷³.

Dentre os neurotransmissores que têm despertado o interesse dos pesquisadores nas últimas décadas, as catecolaminas são um importante grupo de neurotransmissores aminérgicos, de modo que a L-DOPA, dopamina, noradrenalina e adrenalina são substâncias características desse grupo de aminas biogênicas. E dentre estas, a adrenalina é uma das catecolaminas mais importantes, tendo em vista que seus níveis no corpo humano afeta uma série de ações no sistema nervoso. Conseqüentemente, a quantificação de adrenalina em amostras biológicas como a urina tem sido de grande interesse em virtude de sua importante atividade biológica.

Nas últimas duas décadas, alguns métodos analíticos foram empregados na quantificação de adrenalina em amostras de urina humana, bem como, mais recentemente, diversos métodos eletroquímicos foram propostos empregando-se vários tipos de materiais baseados de modo geral em medidas voltamétricas.

Em 1995, um método baseado em eletroforese capilar para determinação de adrenalina em amostras de urina foi proposto por Chicharro e colaboradores⁷⁴ e tal metodologia resultou em um limite de quantificação de $10,9 \mu\text{mol L}^{-1}$, mostrando que o método proposto é efetivamente seletivo para adrenalina. Porém, o tempo de análise para cada ensaio de determinação desse neurotransmissor foi de 15 minutos, o que resulta em um longo tempo de análise para uma quantidade expressiva de amostras.

Já em 1999, Hansen e colaboradores⁷⁵ propuseram um método baseado em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção fluorimétrica, que apresentou um limite de detecção de $7,3 \text{ nmol L}^{-1}$ e baseado em duas colunas sequenciais para

purificação da amostra e derivatização do analito. Neste sentido, embora o procedimento proposto tenha se apresentado robusto e reprodutivo, é fundamentado em etapas de modificação química, separação e pré-concentração.

Em 2003, Du e colaboradores⁷⁶ propuseram um sistema de injeção em fluxo e detecção por quimioluminescência para determinação de epinefrina explorando polímeros impressos. O sistema proposto apresentou um limite de detecção de 3 nmol L⁻¹ e um desvio padrão de 5% para medidas sucessivas de epinefrina. O método consistiu de quatro etapas: (1) pré-concentração de epinefrina, (2) remoção de interferentes, (3) detecção por quimioluminescência e (4) lavagem do polímero impresso. O procedimento exigiu 10 minutos na etapa de pré-concentração e leitura, e 3 minutos de limpeza do polímero, perfazendo um mínimo de 13 minutos por análise. Nesse sentido, além do tempo demandado, o método proposto também consiste de etapas rigorosas de preparo da amostra.

Mais recentemente, Altun e colaboradores⁷⁷ propuseram em 2015 um dispositivo microfluídico que trouxe como vantagem sua aplicação em campo (portabilidade), todavia, apresentou elevado limite de detecção para adrenalina (LOD de 54,6 µmol L⁻¹) e um tempo de injeção de amostra de 20 minutos.

Em 2016, Davletbaeva e colaboradores⁷⁸ propuseram um novo método fluorimétrico acoplado a um sistema de injeção sequencial combinado à extração em ponto de nuvem para a determinação de epinefrina em urina humana. Embora o método tenha apresentado excelente detectabilidade, (LOD de 3 pmol L⁻¹), também exigiu a derivatização do analito e etapas de extração prévias à detecção fluorimétrica, tornando o método proposto de difícil miniaturização e contendo várias etapas para sua realização, gerando uma frequência analítica da ordem de 3 medidas por hora.

Diante do exposto, bem como já mencionado anteriormente, embora os métodos analíticos apresentados tenham exibido de maneira geral bons níveis de sensibilidade e seletividade, possuem como desvantagens etapas complexas de preparo, separação e purificação de amostra, além do longo tempo de análise. Diante disso, um grande número de métodos eletroquímicos para a determinação de epinefrina tem sido propostos nos últimos anos baseados em filmes poliméricos, nanotubos de carbono, nanodiamante e monocamadas auto-organizadas⁷⁹⁻¹⁰⁰.

Em 2006, Wang e colaboradores⁷⁹ empregaram monocamadas auto-organizadas à base de ditiotreitol (DTT) e dodecanotiol (DDT) na modificação de um

eletrodo de ouro para a determinação de epinefrina. As características eletroquímicas do eletrodo modificado foram avaliadas por voltametria cíclica utilizando o $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ como sonda redox. O sensor proposto exibiu uma faixa linear de 0,1 a 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de 0,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

No ano seguinte, Jin e colaboradores fabricaram um sensor à base de um eletrodo de grafite impregnado com parafina (PIGE) modificado com poli(rutina-Ru) para a quantificação de adrenalina⁸⁰. A imobilização de rutina à superfície do eletrodo foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FE-SEM), espectro de infravermelho (IR) e espectroeletróquímica de UV in situ. O sensor desenvolvido exibiu um limite de detecção de 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e uma faixa linear de 3 – 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Também em 2007, Li e Lin⁸¹ desenvolveram um biossensor via eletrodeposição de nanoclusters de ouro em um filme de polipirrol ultrafino superoxidado (PPyox), obtendo-se o compósito nano-Au/PPyox como espécie modificadora para o eletrodo de carbono vítreo (nano-Au/PPyox/GCE). O material desenvolvido apresentou uma faixa linear para a adrenalina de 0,3 – 21 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de 0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com uma razão sinal/ruído igual a 3.

Outro método voltamétrico para quantificação de adrenalina foi proposto em 2008 por Aslanoglu e colaboradores, utilizando o eletrodo de carbono vítreo modificado com Poli(1-metilpirrol)⁸². O sensor apresentou uma faixa linear de resposta de 0,75 – 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 0,17 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Já em 2009, Soundappan e Shen-Ming utilizaram o eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme híbrido de platina-ouro nanoestruturado para determinação de adrenalina⁸³. Para avaliar a morfologia do material, o filme foi depositado eletroquimicamente na superfície do eletrodo ITO e verificada por meio da microscopia eletrônica de varredura (SEM) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS). O limite de detecção foi de 57 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e ampla faixa linear (63 – 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Wang e Chen também desenvolveram um polímero como modificador do eletrodo de carbono vítreo⁸⁴. O sensor à base de poli(taurina) exibiu uma faixa linear de 2 – 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Ainda em 2009, Kalimuthu e John⁸⁵ propuseram um método voltamétrico explorando filmes finos de 5-amino-1,3,4-tiadiazol-2-tiol como modificador de um eletrodo de carbono vítreo. O sensor eletroquímico apresentou faixa linear de

resposta entre 40 e 400 nmol L⁻¹ e um limite de detecção de 0,27 nmol L⁻¹ baseado numa razão sinal/ruído igual a 3. Embora o sistema tenha apresentado uma ampla faixa linear, a mensuração amperométrica de epinefrina ocorreu mediante a aplicação de um elevado potencial elétrico (600 mV vs. Ag/AgCl).

Também em 2009, Brondani e colaboradores⁸⁶ desenvolveram um biossensor à base de nanopartículas de platina dispersas em hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazol (Pt-BMI.PF₆) e empregaram a técnica de voltametria de pulso diferencial para determinação de adrenalina, obtendo uma faixa linear de 0,99 – 210 μmol L⁻¹ e limite de detecção de 0,29 μmol L⁻¹.

Bouhouti e colaboradores⁸⁷ introduziram um compósito de grafite em pó modificado com L-cisteína para a determinação de epinefrina. O eletrodo compósito apresentou faixa linear para determinação do neurotransmissor entre 0,1 μmol L⁻¹ a 500 μmol L⁻¹ e um limite de detecção de 87 nmol L⁻¹ sob um potencial aplicado de 277 mV vs. Ag/AgCl.

Já em 2010, Ensafi e colaboradores⁸⁸ empregaram o poli(3,3-bis[N,N-bis(carboximetil)aminometil]-o-cresolsulfonoftaleína) como modificador de eletrodo para determinação de epinefrina. O sensor proposto apresentou faixa linear de resposta entre 0,20 – 175 μmol L⁻¹ e um limite de detecção de 30 nmol L⁻¹ considerando uma razão sinal/ruído igual a 3.

Ainda em 2010, Zare e Nasirizadeh⁸⁹ empregaram o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT/GCE) para a determinação voltamétrica de adrenalina. Apesar do bom limite de detecção (0,02 μmol L⁻¹), o sensor apresentou um baixo intervalo de resposta linear (0,078 – 0,2 μmol L⁻¹).

Moraes e colaboradores⁹⁰ propuseram um sensor para determinação de epinefrina baseado em nanotubos de carbono modificados com ftalocianina de cobalto. O método proposto trouxe como novidade a não necessidade de qualquer etapa prévia de extração, derivatização ou limpeza do sistema de determinação. Contudo, o método proposto apresentou pequena faixa linear (1,33 – 5,5 μmol L⁻¹).

Shahrokhian e Khafaji⁹¹ empregaram o nanodiamante como modificador de eletrodo para o desenvolvimento de um sensor para epinefrina. O sensor eletroquímico proposto apresentou faixa linear de resposta para adrenalina entre 10

nmol L⁻¹ e 10 µmol L⁻¹ e um limite de detecção de 3 nmol L⁻¹ baseado na razão sinal/ruído igual a 3.

No ano seguinte, em 2011, Shahrokhian e Saberi⁹² também empregaram o polipirrol superoxidado e nanotubos de carbono de paredes múltiplas para a determinação de adrenalina. Apesar do alto valor de recuperação obtido para 5 determinações replicatas da catecolamina (96,4%), o sensor apresentou uma pequena faixa linear (0,1 – 8 µmol L⁻¹) e um limite de detecção igual a 0,04 µmol L⁻¹.

Também em 2011, Babaei e colaboradores⁹³ empregaram nanotubos de carbono de parede única para a determinação voltamétrica de adrenalina. O eletrodo de carbono vítreo foi modificado com os nanotubos de carbono/quitosana/líquido iônico (SWCNT-CHIT-IL/GCE). O sensor apresentou uma faixa linear de 1 – 580 µmol L⁻¹ e um limite de detecção 0,09 µmol L⁻¹.

Já em 2012, Tavana e colaboradores⁹⁴ utilizaram o eletrodo de pasta de carbono modificado com brometo de 1-metil-3-butylimidazol (MBIDZ/CPE) para a determinação voltamétrica de epinefrina, obtendo-se um limite de detecção de 0,09 µmol L⁻¹ e faixa linear de 0,3 – 450 µmol L⁻¹.

Justino e colaboradores⁹⁵, em 2013, desenvolveram e aplicaram pela primeira vez monocamadas auto-organizadas mistas na detecção de epinefrina. Os autores desenvolveram um dispositivo capaz de determinar eletroquimicamente a epinefrina mediante a aplicação de pequeno potencial ao eletrodo de trabalho (120 mV vs. Ag/AgCl). Contudo, a faixa linear do dispositivo proposto foi pequena (0,1 a 2 µmol L⁻¹) e o limite de detecção de 0,5 µmol L⁻¹ foi o mais baixo encontrado até então empregando-se monocamadas auto-organizadas.

Gupta e colaboradores⁹⁶ introduziram pela primeira vez um material compósito à base de um semicondutor (ZnO) para determinação de epinefrina. O sensor proposto apresentou limite de detecção de 0,15 µmol L⁻¹ e duas faixas lineares de resposta: (1) 0,4 – 5 µmol L⁻¹ e (2) 5 – 300 µmol L⁻¹. Embora os autores tenham introduzido o uso de um material semicondutor fotoativo, os estudos desenvolvidos foram puramente de natureza eletroquímica, e não fotoeletroquímica.

Em 2014, Sochr e colaboradores⁹⁷ empregaram o nanodiamante dopado com boro para a determinação de epinefrina em amostras de urina humana, obtendo um limite de detecção de 0,21 µmol L⁻¹ e faixa linear de 0,7 – 60 µmol L⁻¹.

Em 2015, Fazio e colaboradores⁹⁸ introduziram o grafeno como plataforma para a determinação eletroquímica de epinefrina. A plataforma desenvolvida

empregou um material compósito à base de SnO₂ e grafeno e apresentou um limite de detecção de 17 nmol L⁻¹ e uma faixa linear de 0,5 – 200 µmol L⁻¹. Embora um novo tipo de material de carbono tenha sido introduzido na construção da plataforma, o sensor proposto apresentou uma faixa linear de resposta na região micromolar.

Em 2016, Canevari e colaboradores⁹⁹ introduziram pontos quânticos de carbono (C-dots) como agentes de modificação de eletrodo para determinação eletroquímica de epinefrina. Embora um material de grande potencial para aplicações fotoeletroquímicas tenha sido introduzido no desenvolvimento da nova plataforma, a determinação de epinefrina se deu através da oxidação eletroquímica do analito.

Por fim, também em 2016, Bavandpour e colaboradores¹⁰⁰ aplicaram um eletrodo de pasta de carbono modificado com brometo de 1,3-dipropilimidazol e CuFe₂O₄ (CuFe₂O₄/ILs/CPE) para quantificação de adrenalina. O sensor desenvolvido apresentou um limite de detecção de 0,07 µmol L⁻¹ e ampla faixa linear (0,1 – 400 µmol L⁻¹).

Diante do exposto, fica evidente o interesse pelo desenvolvimento de métodos para a determinação de epinefrina em urina humana, especialmente os eletroquímicos, os quais têm despertado grande interesse da comunidade científica nacional e internacional. O interesse pelo emprego de sensores eletroquímicos para determinação de espécies biológicas tem por base algumas características inerentes a estes dispositivos, como a portabilidade e baixo custo, que habilita parcialmente os sistemas eletroquímicos para aplicação em campo.

Em contrapartida, os sistemas eletroquímicos empregados na determinação de epinefrina em urina ainda apresentam algumas limitações, como a falta de detectabilidade e/ou insuficiente faixa de leitura linear para a quantificação dessa catecolamina. Diante disso, o desenvolvimento de métodos de determinação de epinefrina que agreguem as características dos sistemas eletroquímicos e que habilitem a determinação em campo é um ramo científico de ampla capacidade de avanço.

Sendo a fotoeletroquímica uma área que vem sendo gradativamente explorada nos últimos anos e por agregar várias das mais atrativas propriedades dos sistemas eletroquímicos, além da elevada relação sinal/ruído devido aos diferentes princípios de excitação e detecção da espécie investigada¹⁰¹, os sensores

fotoeletroquímicos aparecem como promissores candidatos para a quantificação de adrenalina em amostras biológicas. Apesar dos aspectos desvantajosos quanto à aplicabilidade desses tipos de sensores, as estratégias empregadas na minimização de tais problemas são, em geral, contornáveis.

Dentre os pontos desvantajosos dos sensores fotoeletroquímicos, um dos maiores problemas consiste no emprego do material fotoativo e sua capacidade de conversão fotoelétrica a partir de uma determinada quantidade de energia proveniente da fonte de excitação. Como já mencionado anteriormente, a detecção de espécies biológicas a partir de dispositivos fotoeletroanalíticos requer uma faixa de frequência da radiação na região do visível. Logo, a espécie fotoativa a ser empregada deve ter uma boa eficiência de conversão fotoelétrica nessa região do espectro.

Tendo em vista que o TiO_2 em sua forma anatase é um dos materiais mais aplicados em sistemas fotoeletroquímicos, além de células fotovoltaicas e em fotocatalise^{102,103}, estratégias de sensibilização desse semicondutor são exploradas, uma vez que o TiO_2 apresenta algumas limitações como fotocatalisador, o que inclui uma considerável taxa de recombinação dos portadores de carga fotogerados e um valor de *band gap* de 3,22 eV, o que limita esse semicondutor à absorção na região do UV²³. Além disso, o TiO_2 apresenta uma baixa mobilidade eletrônica e lenta cinética de lacunas na banda de valência¹⁰². Por fim, para a determinação de espécies biológicas como a adrenalina, tais desvantagens do material fotoativo impossibilita a quantificação da catecolamina, uma vez que na região do UV essa espécie sofre eventual degradação¹⁰⁴.

Nesse sentido, diversas estratégias têm sido desenvolvidas a fim de melhorar a performance fotoeletroquímica do TiO_2 na região do visível. Dentre as estratégias propostas, inclui-se a dopagem¹⁰⁵, o emprego de nanopartículas metálicas¹⁰⁶, complexos TCNX²⁹, QDs³⁰ e espécies de reconhecimento biológico¹⁰⁷.

Adicionalmente, a sensibilização de TiO_2 por complexos do tipo tetratiofulvaleno tem se apresentado promissor, uma vez que esses compostos são espécies orgânicas que recentemente vem sendo exploradas no desenvolvimento de DSSCs³⁶ e são por natureza fortes doadores de elétrons- π , o que tem atraído grande interesse também no desenvolvimento de diversos dispositivos, além dos sensores³¹⁻³⁵.

Por outro lado, a aplicação de corantes à base de TTF como agente de sensibilização ainda é pequena em virtude desse corante absorver energia na região do UV, bem como apresenta níveis de energia do HOMO muito altas e, com isso, sua regeneração após a injeção de elétrons é termodinamicamente desfavorável¹⁰⁸ e nesse sentido, estratégias para melhorar a absorção de TTF na região do visível são exploradas. A obtenção de conjuntos doadores-aceptores rígidos e planos por anulação de TTF a partes aceitadoras através de uma reação de base de *Schiff* é uma das maneiras de melhorar essa eficiência e tal método é empregado para DSSCs¹⁰⁹.

Para estimar os níveis de energia HOMO e LUMO do TTF, as propriedades eletroquímicas e ópticas são de primordial importância. A partir dessas propriedades, é possível avaliar as possibilidades de dois processos os quais consistem na injeção de elétrons fotoexcitados do corante para a banda de condução do material fotocatalítico e a regeneração da espécie sensibilizadora, de modo que a eficiência de conversão fotoelétrica depende, em suma, dessas duas condições.

Embora o tetratiofulvaleno absorva luz na região do UV, suas propriedades podem ser facilmente ajustadas por um design molecular adequado, possibilitando assim uma melhor absorção de luz na região visível do espectro. Além disso, o TTF apresenta uma boa alternativa como agente de sensibilização quando comparado a complexos metálicos como os de rutênio que, embora sejam mais eficientes, são escassos, além da toxicidade do material e etapas complexas de síntese e purificação. Em contrapartida, o TTF é um corante orgânico livre de metal de baixo custo, não tóxico e pode absorver radiação na região do visível uma vez que seu design molecular seja devidamente projetado.

Outra maneira pela qual esses compostos de TTF são explorados é através de estudos de eventos de transferência de carga em Tetratiofulvalenos de conjugação π -extendida (ex-TTF)³⁶. Essas espécies anexadas a fulerenos e nanotubos de carbono de parede única possibilita a obtenção de um arranjo molecular o qual é capaz de proporcionar um impedimento estérico, anulando assim a auto agregação do sensibilizador. Nesse sentido, o ex-TTF ligado a um semicondutor transfere elétrons excitados para a banda de condução da espécie fotocatalítica e um mediador redox regenera rapidamente o sensibilizador oxidado, evitando sua redução pelo elétron injetado.

Portanto, dentre as vantagens concernentes ao TTF, sua flexibilidade química é um dos pontos mais expressivos, uma vez que essa característica permite a ligação de vários substituintes R de forma simétrica e assimétrica, permitindo a integração de porções de TTF em várias arquiteturas moleculares e ajuste fino de seus potenciais de oxidação e propriedades relacionadas à doação de elétrons¹¹⁰.

Embora não existam ainda muitos trabalhos relatados na literatura sobre corantes derivados de TTF aplicados em análise fotoeletroquímica, sua aplicação como agente sensibilizador é um recurso viável uma vez que estratégias para alterar suas propriedades variam bastante, e dessa forma é possível obter estruturas que absorvam fótons na região do visível, bem como podem apresentar níveis de energia do HOMO termodinamicamente mais estáveis.

Finalmente, incorporando o TTF a um material fotocatalítico como o TiO_2 , a eficiência de conversão fotoelétrica pode ser melhorada de maneira significativa na região visível do espectro, além do emprego do DNA à plataforma fotoeletroquímica como alternativa para promover estabilidade ao fotossensor proposto e, dessa maneira, tornar viável a quantificação de adrenalina em amostras de urina humana.

Neste contexto, fica evidente que o desenvolvimento de um sensor fotoeletroquímico para a determinação de epinefrina explorando TiO_2 sensibilizado com um derivado de TTF, suportado sob a plataforma de ss-DNA, capaz de absorver radiação na região do visível, se apresenta como uma oportunidade pioneira no que tange o desenvolvimento de um novo sensor com propriedades únicas.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver um sensor fotoeletroquímico empregando o eletrodo de óxido de estanho e índio (ITO) modificado com DNA e nanopartículas de TiO_2 sensibilizadas com BEDT-TTF, e aplicá-lo para a determinação de adrenalina em amostras de urina humana.

3.2. Objetivos Específicos

- Preparar as espécies modificadoras à base de TiO_2 , BEDT-TTF e DNA, imobilizá-las sobre a superfície do eletrodo de trabalho e verificar sua atividade fotoeletroquímica frente ao analito de interesse;
- Verificar a resposta fotoeletroquímica do sensor frente às variáveis: (1) tipo de solução tampão, (2) pH e (3) potencial aplicado ao substrato, a fim de identificar a condição otimizada do processo de conversão fotoelétrica;
- Avaliar a potencialidade dos dispositivos otimizados em termos de sensibilidade, faixa linear de resposta, estabilidade, detectabilidade, entre outras;
- Aplicar o sensor fotoeletroquímico BEDT-TTF/DNA/ TiO_2 /ITO em amostras de urina humana.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

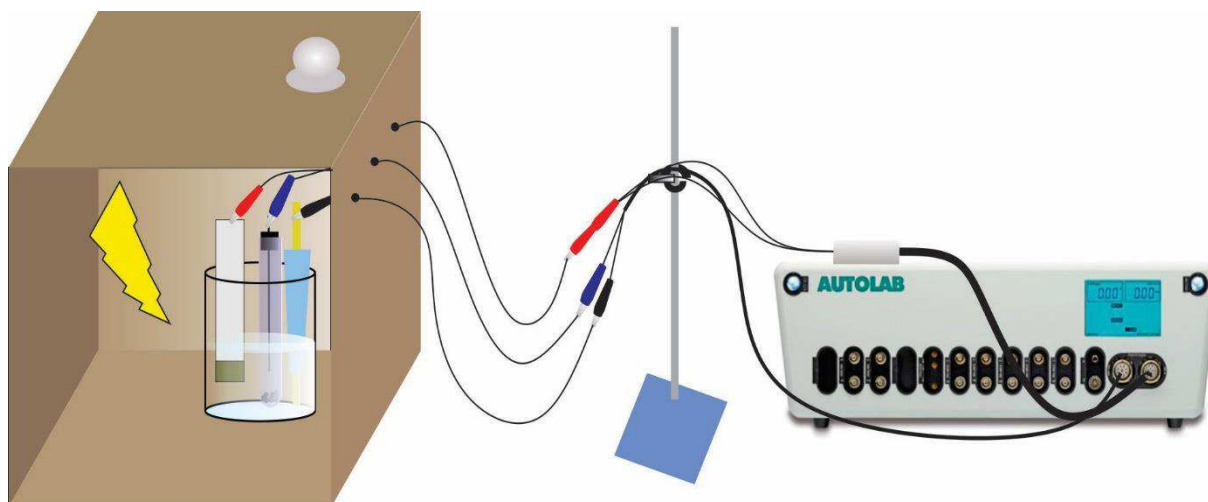
4.1. Equipamentos e Reagentes

Todos os produtos químicos utilizados foram de elevado grau de pureza, de modo que não foram necessárias etapas adicionais de purificação. O BEDT-TTF, o ácido desoxirribonucleico dupla hélice (ds-DNA), adrenalina e lâminas de vidro com revestimento de óxido de estanho dopado com índio (ITO) foram adquiridos da *Sigma Aldrich* (Saint Louis, USA). O 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfônico (HEPES), ácido bórico, ácido cítrico, ácido fosfórico e fosfato mono e dibásico de sódio (Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4) foram adquiridos da *Synth* (São Paulo, Brasil) e todas as soluções foram preparadas com água purificada num sistema OS100LXE da *Companhia GEHAKA* (Gehaka Ltd., São Paulo, Brasil). Por fim, o pH das soluções tampão foi determinado com um analisador Q400AS QUIMIS pH/Ion.

O dióxido de titânio anatase (TiO_2), com tamanho nominal de partícula de 25 nm e o ds-DNA, com razão de absorvância de UV ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) de 1,9 também foram adquiridos da *Sigma Aldrich*. O ds-DNA adquirido e utilizado no presente trabalho foi isolado na forma de dupla hélice contendo cadeia de nucleotídeos constituída por cerca de 41,9% molar de guanina e citosina (G-C) e 58,1% molar de adenina e timina (A-T).

As medidas fotoeletroanalíticas foram realizadas com um equipamento Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 128N B.V., Utrecht, Holanda, controlado pelo software GPES. Todas as medidas fotoeletroanalíticas foram realizadas num sistema de três eletrodos posicionados, utilizando-se uma caixa para o controle da incidência de luz na célula fotoeletroquímica, conforme esquematizado na figura 6. As medições foram realizadas utilizando uma lâmpada de LED comercial de 20 W como fonte de energia de irradiação, com emissão entre 380 e 680 nm de comprimento de onda.

Figura 6: Esquema ilustrativo de montagem da célula fotoeletroquímica para a realização das medidas amperométricas



Fonte: Autor

Como eletrodo de trabalho, foi utilizada uma lâmina de ITO com resistividade superficial entre $8\text{-}12 \Omega \text{ sq}^{-1}$ com uma área delimitada de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$ e $1,1 \text{ nm}$ de espessura, bem como de transmitância nominal de 84% (nominal a 550 nm). As medições fotoeletroquímicas foram realizadas por iluminação frontal, de modo que a distância entre a fonte de excitação e a célula fotoeletroquímica foi de aproximadamente 6 cm . O eletrodo de ouro foi empregado como contra-eletrodo e $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{saturado})}$ como eletrodo de referência.

4.2. Procedimentos Experimentais

4.2.1. Limpeza do Eletrodo ITO

Para a construção do sensor fotoeletroquímico BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO, primeiramente foi realizada a limpeza do eletrodo de trabalho. Para isso, a lâmina de vidro foi submetida a lavagem em água sob ultrassom e novamente lavada com etanol e água destilada para remover qualquer espécie previamente adsorvida na superfície do mesmo. Em seguida, a lâmina de ITO foi devidamente seca e sua área ativa foi devidamente delimitada utilizando, para isso, uma fita adesiva Scotch®.

4.2.2. Construção do sensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO

A funcionalização de superfície do eletrodo de trabalho foi realizada seguindo-se estratégias de modificação e imobilização da espécie fotocatalítica, conforme dados relatados na literatura¹¹¹, e o preparo das espécies modificadoras se deu em duas etapas. Primeiramente, foi preparada uma suspensão de TiO₂ em dimetilformamida (DMF), de modo que 50 mg do TiO₂ foi pesado em uma balança analítica SHIMADZU, modelo AUY220, e posteriormente disperso em 1 mL de DMF com a ajuda de lavadora ultrassônica, obtendo-se assim a dispersão 1.

Posteriormente, 5 mg do complexo BEDT-TTF foi pesado e disperso em solução aquosa de ss-DNA e a mistura resultante foi agitada e aquecida em chapa aquecedora a 70°C por duas horas, obtendo-se a dispersão 2. Ressalta-se que o preparo da solução de ss-DNA foi feito a partir da solução de ds-DNA, mediante aquecimento da dupla fita a 90°C durante duas horas.

Após o preparo das dispersões 1 e 2, o lado condutor da lâmina de vidro foi definido com o auxílio de um voltímetro e em seguida, a área ativa do eletrodo foi delimitada com fita adesiva Scotch®, com auxílio de uma régua para obter a área de 0,5 cm².

A modificação do eletrodo também se deu em duas etapas. Primeiramente, 10 µL da suspensão de TiO₂/DMF foi adicionada à superfície delimitada da lâmina e em seguida levada à chapa aquecedora a 280°C em torno de 2 a 3 minutos. Após esta etapa, o eletrodo de ITO modificado com TiO₂/DMF foi deixado para resfriar à temperatura ambiente.

Na segunda etapa de modificação da superfície do ITO, 10 µL do compósito BEDT-TTF/DNA foi adicionado ao eletrodo ITO/TiO₂ e posteriormente levado a aquecimento em torno de 80°C. Finalmente, o eletrodo BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO foi novamente resfriado à temperatura ambiente e em seguida utilizado para a realização das medidas fotoeletroquímicas.

4.3. Preparo de Soluções

4.3.1. Soluções Tampão

Para avaliação das influências das soluções tampão na resposta do sensor fotoeletroanalítico, foram preparadas as seguintes soluções: tampão fosfato, HEPES e Britton-Robson, todas com quantidades de 100 mL, concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0.

A solução tampão fosfato foi preparada a partir do fosfato monobásico de sódio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), sendo pesado 1,38 g do sólido, adicionado em um béquer e dissolvido em água destilada. O pH da solução foi devidamente ajustado para 7,0 a partir de adições de NaOH com o auxílio de medidor de pH previamente calibrado. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e aferido com água destilada. Após este procedimento, o tampão foi transferido para um recipiente apropriado, rotulado e guardado para a realização posterior das medidas.

Semelhantemente, o tampão HEPES foi preparado, pesando-se 2,38 g do sólido, transferido para um béquer e dissolvido em água. A solução teve seu pH ajustado para 7,0 a partir de adições de NaOH. Finalmente, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e aferido com água.

Para o preparo do tampão Britton-Robson, foram utilizadas as soluções de ácido bórico, ácido acético e ácido fosfórico, todas previamente preparadas a uma concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para o preparo de 25 mL de ácido bórico, foi pesado 0,155 g do sólido e dissolvido com água destilada. Para o preparo da solução de ácido acético, 143 μL do ácido foram dissolvidos em água e o volume de solução aferido para 25 mL, e para o ácido fosfórico, 130 μL do ácido foram adicionados em água e o volume aferido para 25 mL. Finalmente, as três soluções foram colocadas em um béquer de 150 mL e o pH ajustado com solução de NaOH até o valor 7,0.

4.3.2. Adrenalina e Espécies Interferentes

A solução de adrenalina foi preparada a partir do sal bitartarato de epinefrina ($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_3 \cdot \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$), pesando-se 1 mg do sólido e solubilizado em tampão fosfato na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0. Além disso, com o intuito de avaliar o efeito de

possíveis substâncias interferentes no desempenho fotoeletroquímico do sensor proposto, foram também preparadas as seguintes soluções: ácido ascórbico, ácido barbitúrico, ácido fólico, ácido úrico, glicose e ureia. Todas as soluções foram preparadas na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ para um volume total da célula fotoeletroquímica de 5 mL no qual as medidas foram posteriormente realizadas.

4.4. Preparo e análise das amostras de urina

A fim de avaliar a aplicabilidade do sensor fotoeletroquímico em amostras reais, foram coletadas duas amostras de urina humana em tubos de plástico e a cada uma foi adicionado HCl na concentração de 6 mol L^{-1} , a fim de resultar em soluções com 1% do ácido¹¹². As amostras acidificadas foram centrifugadas por 30 minutos, com 6 intervalos de 5 minutos, a 2500 rpm^{78} . O sobrenadante foi filtrado com papel de filtro comum e então diluído em 10 vezes com tampão fosfato na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e em pH 7,0. Posteriormente, a solução foi transferida para a célula fotoeletroquímica para ser analisada com o sensor fotoeletroquímico em triplicata. Finalmente, o método de adição de padrão foi usado para a determinação de adrenalina nas amostras de urina.

Em cada amostra, foram realizados dois procedimentos de adição de padrão. Na amostra A, o primeiro procedimento consistiu da adição de $500 \mu\text{L}$ da amostra acidificada e $4,25 \text{ mL}$ do tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0. A primeira adição de padrão foi de $250 \mu\text{L}$ (solução 1 mmol L^{-1} de epinefrina) e a primeira medida foi feita. Em seguida, mais três adições de $50 \mu\text{L}$ do padrão foram realizadas. No segundo procedimento, a mesma quantidade de amostra e tampão foram adicionados à célula, todavia a primeira adição de padrão foi de $50 \mu\text{L}$ e posteriormente mais três adições de $50 \mu\text{L}$ do padrão foram realizadas nas medidas.

Na amostra B, o primeiro procedimento consistiu da adição de $500 \mu\text{L}$ da amostra acidificada e $4,25 \text{ mL}$ do tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0. A primeira adição de padrão foi $25 \mu\text{L}$ (solução 1 mmol L^{-1} de epinefrina) e, posteriormente, mais três adições de $50 \mu\text{L}$ do padrão foram feitas. No segundo procedimento, $500 \mu\text{L}$ da amostra e $4,25 \text{ mL}$ do tampão fosfato foram adicionados à célula e a primeira adição de padrão foi de $10 \mu\text{L}$ e, em seguida, mais três adições de $50 \mu\text{L}$ do padrão foram realizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

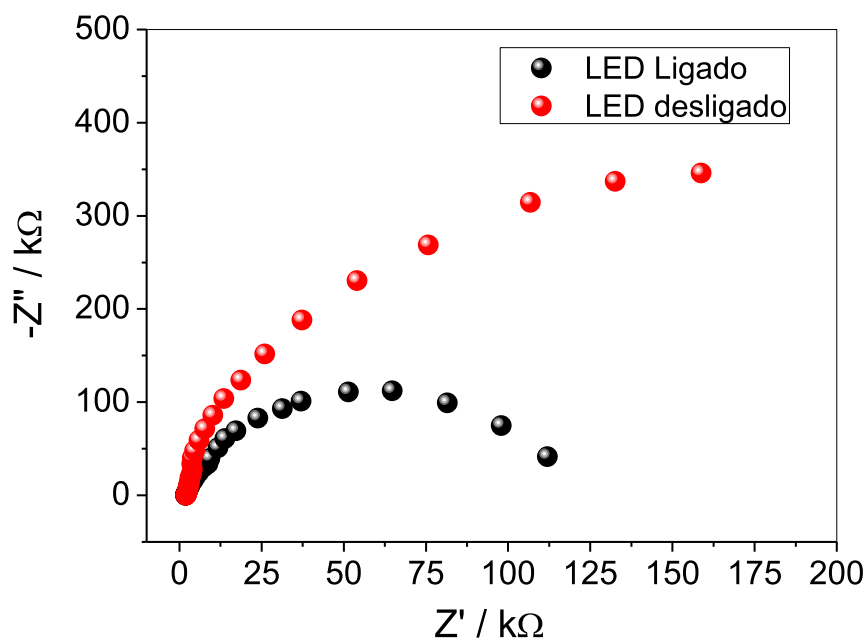
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da plataforma fotoeletroquímica por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

Com o propósito de avaliar os efeitos da incidência de radiação proveniente da lâmpada de LED sobre o comportamento do transporte de carga na plataforma fotoeletroquímica, foram realizados estudos por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). As medidas realizadas com o material compósito BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO foram feitas nas condições de incidência e sem incidência da lâmpada de LED.

A figura 7 mostra os espectros de impedância obtidos com o eletrodo modificado com o material compósito, medidos em solução aquosa de Na₂SO₄ a uma concentração de 0,1 mol L⁻¹ e obtidos no intervalo de frequência compreendido entre 10⁵ e 10⁻² Hz.

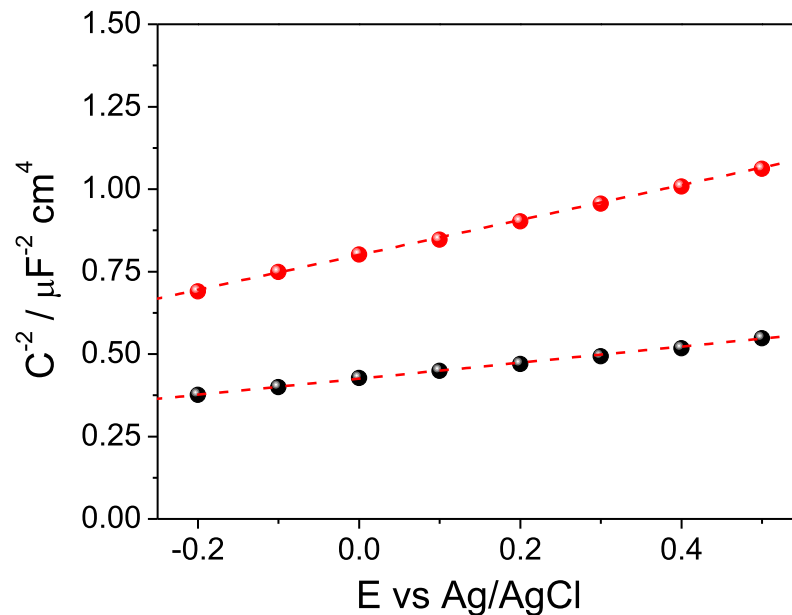
Figura 7: Diagrama de Nyquist obtidos para BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO em solução aquosa 0,1 mol L⁻¹ de Na₂SO₄ sob condições de potencial de circuito aberto na presença (círculos pretos) e ausência (círculos em vermelho) de iluminação proveniente de luz LED.



Conforme pode ser observado, o material compósito apresentou uma menor resistência à transferência de carga sob irradiação de luz LED na região do visível em comparação às condições de não incidência de LED, sugerindo que há uma melhor separação de portadores de carga sob iluminação de luz LED visível, conforme o esperado.

Para avaliar a concentração de portadores de carga (N_D) bem como o potencial de banda plana (E_{fb}), foram realizadas análises de Mott-Schottky para as plataformas TiO_2/ITO e BEDT-TTF/DNA/ TiO_2/ITO . Neste sentido, a capacitância desenvolvida na interface fotoeletrodo-eletrólito na célula fotoeletroquímica foi medida em função do potencial aplicado ao eletrodo em condições de ausência de luz e à temperatura ambiente (figura 8).

Figura 8: Gráfico de Mott-Schottky (C^{-2} vs E) obtido para TiO_2/ITO (círculos em vermelho) e BEDT-TTF/DNA/ TiO_2/ITO (círculos pretos) a uma frequência de 10 kHz.



A capacitância medida para a interface fotoeletrodo-eletrólito foi tratada de acordo com a equação de Mott-Schottky¹¹³:

$$\frac{1}{C^2} = \frac{2}{N_D e \epsilon_0 \epsilon} \left(E - E_{fb} - \frac{kT}{e} \right) \quad (1)$$

Onde C é a capacitância associada às cargas de superfície do semicondutor, N_D é a densidade de portadores eletrônicos, e representa a carga fundamental eletrônica, ϵ_0 é a permissividade elétrica no vácuo, ϵ é a permissividade elétrica relativa do semicondutor, E é o potencial aplicado ao substrato, E_{fb} é o potencial de banda plana, T é a temperatura e k representa a constante de Boltzmann.

Os coeficientes angulares dos gráficos de Mott-Schottky para TiO_2/ITO (círculos em vermelho) e $\text{BEDT-TTF/DNA/TiO}_2/\text{ITO}$ (círculos pretos) foram positivos, indicando que as amostras são condutores tipo-n. A análise dos gráficos de Mott-Schottky foi realizada mediante a extrapolação da variável C^{-2} para 0, que resultou em valores de potencial de banda plana (E_{fb}) de -1,4 V vs. Ag/AgCl para o $\text{BEDT-TTF/DNA/TiO}_2/\text{ITO}$ (círculos pretos) e de -0,9 V vs. Ag/AgCl para o TiO_2/ITO (círculos em vermelho).

O potencial de banda plana de um semicondutor é igual à energia do nível de Fermi sob condições de banda plana. De forma geral, quando um eletrodo de natureza semicondutora tipo-n é imerso em uma solução eletrolítica, uma junção semicondutor-eletrólito se forma e uma curvatura de banda se desenvolve devido o nivelamento dos níveis de Fermi em ambos os lados da junção.

O potencial de banda plana (E_{fb}) é o potencial (vs. Ag/AgCl) no qual a curvatura da banda é cessada. Quando o potencial aplicado ao WE modificado com a espécie fotossensível é mais positivo que o E_{fb} , a condição de depleção se desenvolve de forma a gerar um campo elétrico para a separação dos portadores de cargas fotogeradas no processo fotoeletroquímico.

Assim sendo, valores mais negativos do potencial de banda plana para semicondutores tipo-n implica numa separação de portadores de carga fotogerados em baixos valores de potencial aplicado (em termos de largura da camada de depleção na junção fotoeletrodo-eletrólito) e, portanto, esses portadores de carga podem participar ativamente das reações fotoeletroquímicas. Conforme pode ser visto, o $\text{BEDT-TTF/DNA/TiO}_2/\text{ITO}$ apresentou potencial de banda plana mais negativo que o valor apresentado pelo TiO_2/ITO .

Logo, o valor mais negativo de E_{fb} para o material compósito indica que a sensibilização do TiO_2 com o complexo BEDT-TTF/DNA melhora a capacidade desse semicondutor em separar os portadores de carga fotogerados devido a

maiores tempos de vida eletrônicos, separações do par e^-_{CB}/h^+_{VB} mais rápidas e maiores velocidades de transferência dos elétrons fotogerados.

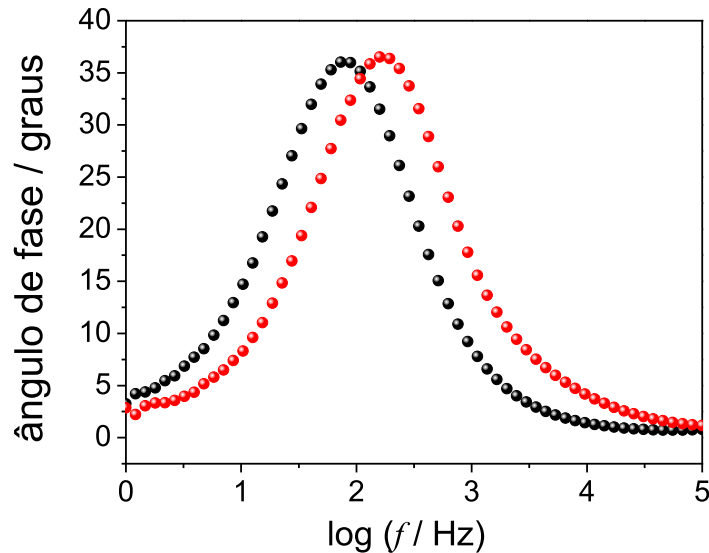
Nesse sentido, a densidade de portadores de carga N_D foi calculada a partir dos gráficos de Mott-Schottky apresentados na figura 8, mediante o emprego da seguinte equação¹¹³:

$$N_D = \frac{2}{e\epsilon_0\epsilon} \left(\frac{dE}{d(C^{-2})} \right) \quad (2)$$

Onde $e = 1,6 \times 10^{-19}$ C, $\epsilon_0 = 8,86 \times 10^{-12}$ F m⁻¹, e $\epsilon = 18$. Os valores de N_D para o TiO₂/ITO e para o compósito BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO foram $2,73 \times 10^{19}$ cm⁻³ e $8,82 \times 10^{19}$ cm⁻³, respectivamente. Conseqüentemente, o maior valor de N_D para o BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO está de acordo com a menor resistência à transferência de carga e, conseqüentemente, transferência eletrônica de carga mais rápidas, levando a sistemas fotoeletroquímicos de maior performance. Além disso, como a densidade de portadores de carga é proporcional ao inverso da inclinação da reta, $\left(\frac{dE}{d(C^{-2})}\right)$, o maior valor de N_D para o material compósito reflete a menor inclinação da reta para o BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO, em comparação ao TiO₂/ITO.

Com o propósito de avaliar o tempo de vida do elétron em cada material, foram realizadas medidas de ângulo de fase em função da frequência para o TiO₂/ITO e BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO (figura 9).

Figura 9: Ângulo de fase em função da frequência obtidos para TiO₂/ITO (círculo preto) e BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO (círculo vermelho) em KCl 0,1 mol L⁻¹ e ácido ascórbico 0,02 mol L⁻¹.



A figura 9 apresenta um máximo para ambos os materiais fotoativos na frequência referente ao máximo tempo de vida do elétron, os quais foram obtidos mediante o emprego da seguinte equação¹¹⁴:

$$\tau_e = 1/(2\pi f_{max}) \quad (3)$$

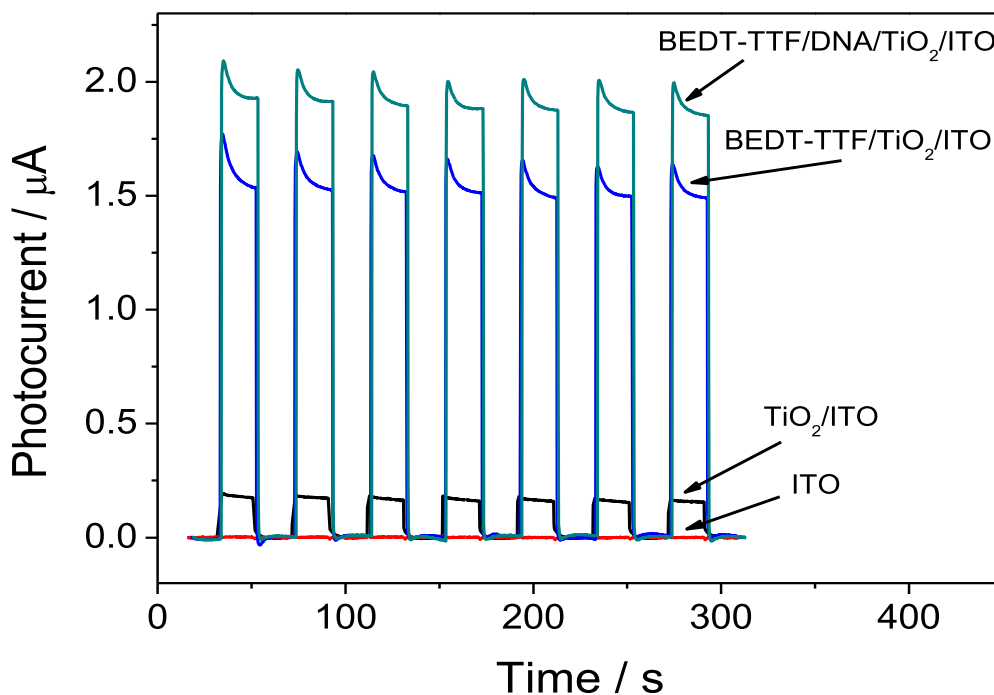
Onde τ_e representa o tempo de vida do elétron e f_{max} é a frequência na qual o ângulo de fase alcança seu máximo.

Conforme pode ser observado na figura 9, os valores de frequência nos quais os gráficos de ângulo de fase vs. frequência atingem um máximo são 63 Hz para o TiO₂/ITO e 200 Hz para o BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO e isso corresponde a um aumento no tempo de vida do elétron de 253 μ s para 796 μ s. Do exposto, o aumento no tempo de vida do elétron no BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO está associado com uma menor taxa de recombinação e, conseqüentemente, habilita o material proposto a uma maior separação de portadores de carga foto gerados.

5.2. Características fotoeletroquímicas do Sensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂

Para avaliar o desempenho fotoeletroquímico do sensor composto BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO, foram realizadas medidas cronoamperométricas na célula fotoeletroquímica contendo a solução de adrenalina na concentração de 1 mmol L⁻¹, preparada em tampão fosfato pH 7,0 e sob um potencial aplicado de 0,25 V. A resposta amperométrica do sensor composto foi comparada com a resposta do ITO, TiO₂/ITO e BEDT-TTF/TiO₂/ITO com a luz LED ligada e desligada no intervalo de 300 segundos, sendo 20 segundos o intervalo para incidência e não incidência de luz LED (figura 10). Os valores de fotocorrente obtidos para cada um dos fotossensores foram: 0,0011 ± 0,0002 μA para o ITO; 0,17 ± 0,01 μA para o TiO₂/ITO; 1,69 ± 0,05 μA para o BEDT-TTF/TiO₂/ITO; e 1,91 ± 0,02 μA para o composto BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO.

Figura 10: Resposta de fotocorrente do BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO (1), BEDT-TTF/TiO₂/ITO (2), TiO₂/ITO (3) e ITO (4). Experimentos realizados em solução tampão fosfato (pH 7,0) contendo 1 mmol L⁻¹ de adrenalina e potencial aplicado de 0,25 V vs. Ag/AgCl_(saturado).



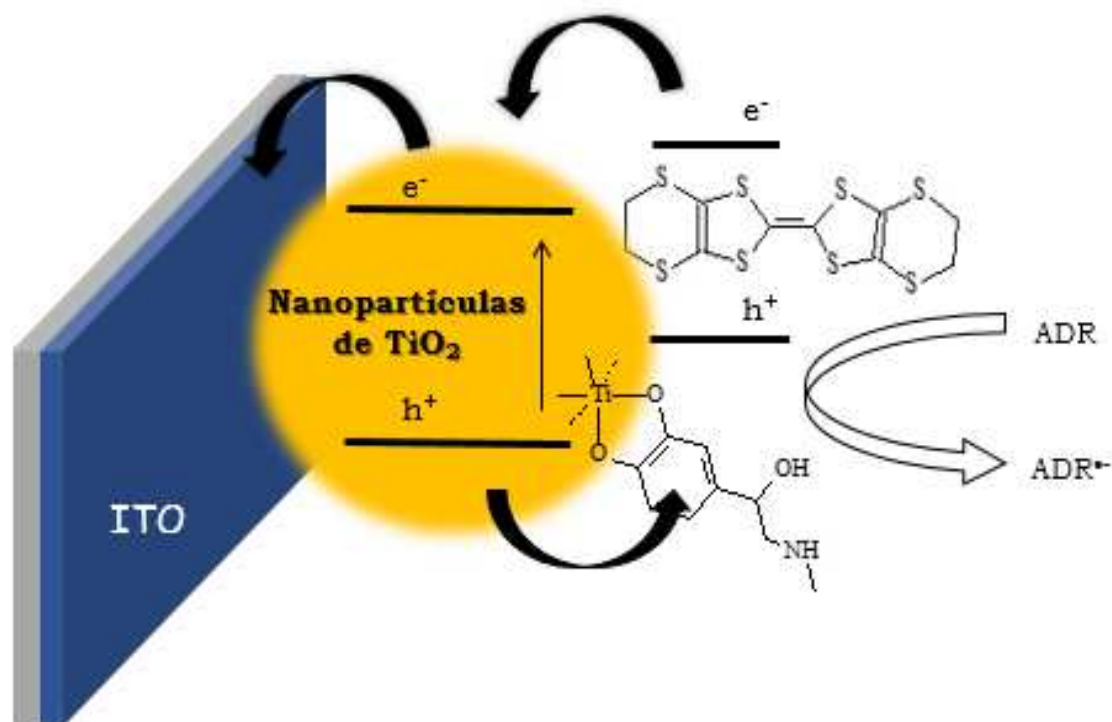
Como pode ser observado, o fotossensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO exibiu um maior valor médio de fotocorrente para sete medições realizadas. O fotossensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO apresentou um valor de fotocorrente para a adrenalina cerca de 11 vezes maior em comparação ao TiO₂/ITO. Adicionalmente, o BEDT-TTF/TiO₂/ITO também apresentou uma resposta considerável de fotocorrente quando comparado ao TiO₂/ITO. Isso indica que o BEDT-TTF apresenta uma forte capacidade de sensibilização do TiO₂, de forma a possibilitar um aumento na eficiência de fotogeração de elétrons e lacunas do material, melhorando assim a sua eficiência fotoeletroquímica.

A presença do DNA ocasionou uma resposta de fotocorrente maior e mais estável para oxidação da adrenalina com o BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO em relação ao BEDT-TTF/TiO₂/ITO. Neste caso, o caráter negativo do DNA devido aos grupos fosfatos em suas cadeias pode favorecer a interação entre o fotocatalisador e a molécula de adrenalina, uma vez que no valor de pH investigado a epinefrina está positivamente carregada. Portanto, o bom desempenho do BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO em relação ao BEDT-TTF/TiO₂/ITO pode estar associado à capacidade do DNA em formar filmes biocompatíveis e estáveis, melhorando a estabilidade e sensibilidade da plataforma.

O esquema reacional proposto para a oxidação fotoeletroquímica da adrenalina é apresentado na figura 11. Sob irradiação da luz de LED, o complexo BEDT-TTF adsorvido nas nanopartículas de TiO₂ pode absorver a luz tal que os elétrons do corante são excitados e promovidos do orbital molecular ocupado de mais alta energia (*Highest Occupied Molecular Orbital – HOMO*) ao orbital molecular desocupado de mais baixa energia (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital – LUMO*).

O complexo BEDT-TTF apresenta uma banda de absorção na região visível do espectro eletromagnético com um máximo cerca de 460 nm, cujo valor está compreendido dentro da faixa de comprimento de onda para a lâmpada de LED utilizada (380 a 680 nm), justificando a sua capacidade para captar fótons a partir da lâmpada de LED¹¹⁵. O elétron excitado pode então ser transferido para a banda de condução do TiO₂ e finalmente ser transferido para o eletrodo ITO para originar a fotocorrente.

Figura 11: Esquema reacional proposto para a detecção fotoeletroanalítica de adrenalina.



Por outro lado, a adição de adrenalina à célula fotoeletroquímica contribui para uma melhor separação espacial de cargas foto geradas, tendo em vista que as lacunas provenientes do TiO_2 podem deslocar-se para a molécula de adrenalina por uma possível formação de complexos de superfície entre esse neurotransmissor e as nanopartículas de TiO_2 , suprimindo assim a recombinação do par $e^-_{\text{CB}}/h^+_{\text{VB}}$ e, conseqüentemente, melhorando o desempenho fotoeletroquímico do composto para a oxidação de adrenalina.

Concomitantemente, o elétron no estado LUMO do corante é transferido para a banda de condução das nanopartículas do TiO_2 e as lacunas no estado HOMO promovem a oxidação da adrenalina. Além disso, a adrenalina pode atuar como um eliminador de lacunas geradas nas nanopartículas de TiO_2 , melhorando a separação espacial de carga nas bandas de valência e condução das nanopartículas desse semicondutor.

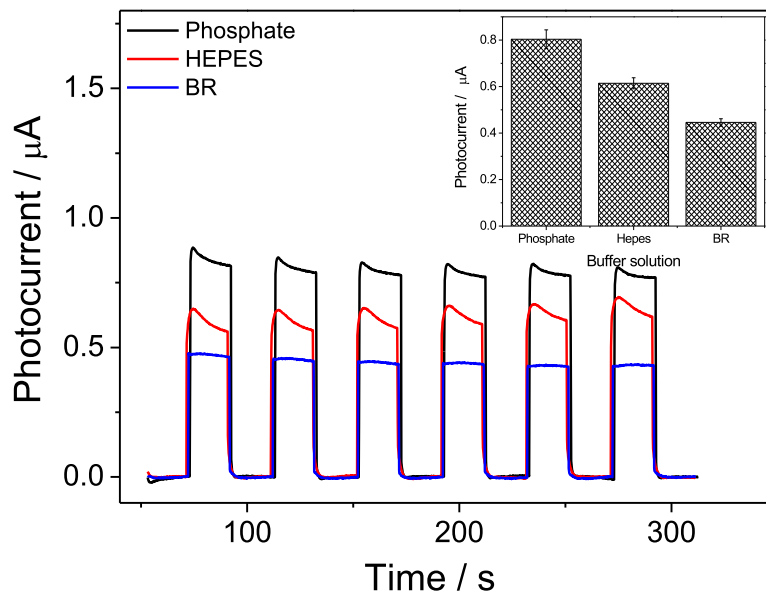
5.3. Otimização da Resposta do Sensor Fotoeletroanalítico BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO

Com o intuito de definir parâmetros experimentais para a melhor resposta fotoeletroquímica do sensor, foi avaliada a influência da solução tampão, pH da solução e o potencial aplicado ao sensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO. Dessa maneira, para avaliar a resposta de fotocorrente, a resposta amperométrica foi registrada em intervalos de tempo em que a luz de LED foi ligada e desligada.

Inicialmente, foram investigados os efeitos do tipo de solução tampão sobre a fotocorrente obtida para a oxidação da adrenalina com o sensor composto BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO. A figura 12 mostra a resposta do fotoeletrodo modificado com BEDT-TTF/DNA/TiO₂ para a adrenalina em diferentes soluções tampão: (1) fosfato, (2) HEPES e (3) Britton-Robson. Todas as soluções foram preparadas de forma que tivessem o mesmo pH (7,0) e a mesma concentração (0,1 mol L⁻¹).

Figura 12: Influência da solução tampão na resposta do fotosensor para adrenalina a 100 μmol L⁻¹. As medidas foram realizadas em solução tampão fosfato, HEPES e Britton-Robson 0,1 mol L⁻¹ e um potencial aplicado 0,25 V vs.

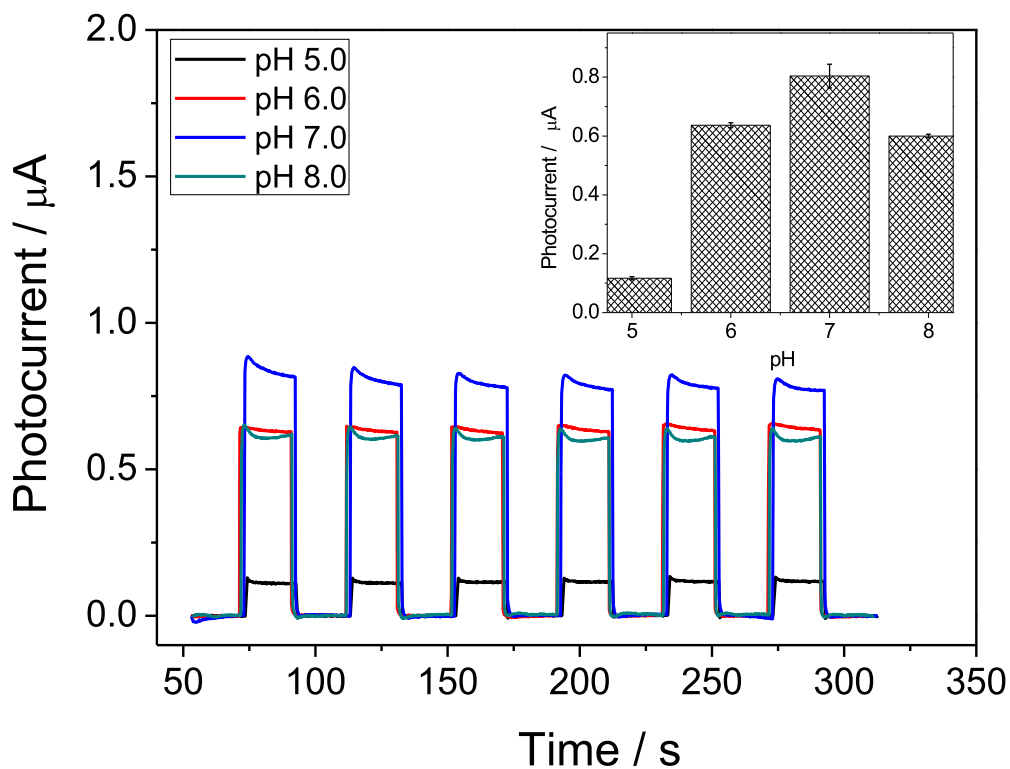
Ag/AgCl_(saturado).



Os valores de fotocorrente para $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de adrenalina no fotoeletrodo modificado com BEDT-TTF/DNA/ TiO_2 no tampão fosfato, HEPES e Britton-Robson foram $0,80 \pm 0,04 \mu\text{A}$, $0,61 \pm 0,02 \mu\text{A}$ e $0,45 \pm 0,02 \mu\text{A}$, respectivamente. A melhor resposta do sensor para a adrenalina foi obtida em solução tampão fosfato, o que pode ser justificado pela alta mobilidade iônica dos íons fosfato e sódio, possibilitando um melhor transporte de carga na solução, de forma a favorecer a compensação de carga durante a oxidação da adrenalina. Nesse sentido, a solução tampão fosfato foi escolhida para todos os demais experimentos.

Em seguida, a resposta do sensor fotoeletroquímico BEDT-TTF/DNA/ TiO_2 para adrenalina foi investigado em tampão fosfato com variação de pH de 5,0 a 8,0 sob a aplicação de um potencial de $0,25 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{saturado})}$ (figura 13).

Figura 13: Influência do pH da solução sobre a resposta do fotosensor para $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de adrenalina. As medidas foram realizadas em solução tampão fosfato na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e potencial aplicado de $0,25 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{saturado})}$.

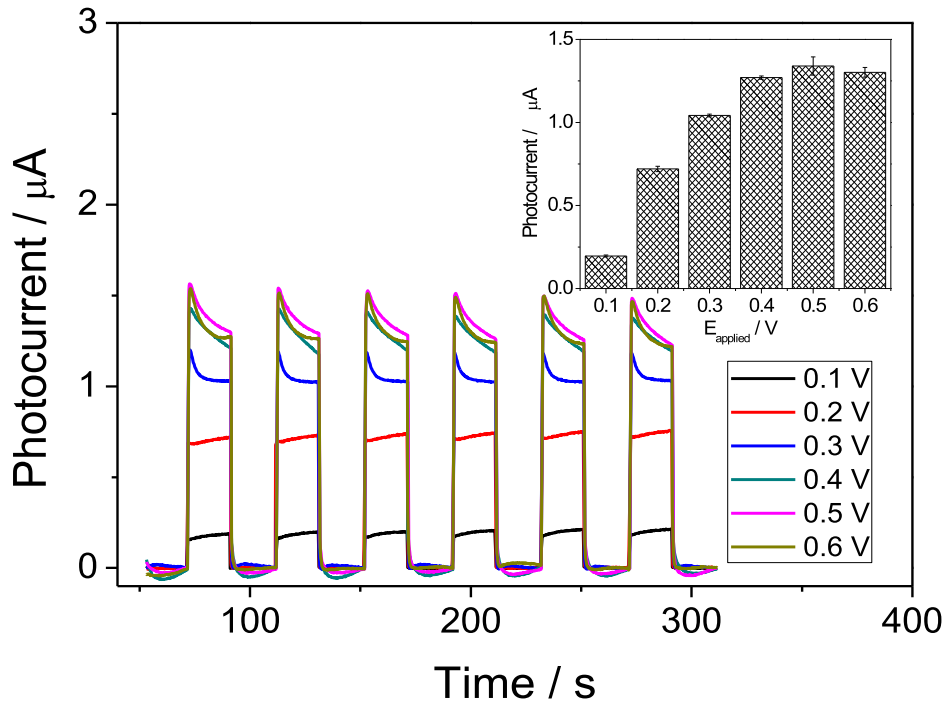


A fotocorrente para oxidação da adrenalina sobre o sensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO foi crescente do pH 5,0 para o pH 7,0. As alterações no pH da solução podem afetar significativamente as energias relativas dos estados excitados do sensibilizador e dos estados aceitadores de ITO e, conseqüentemente, a variação do pH pode promover alterações nas fotocorrentes obtidas. Uma explicação que pode ser sugerida para o aumento da fotocorrente com o pH entre 5,0 e 7,0 é o possível aumento nos níveis de energia LUMO do corante com o aumento do pH da solução, de forma a favorecer a geração de fotocorrente anódica¹¹⁶.

Por outro lado, a resposta do BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO para adrenalina decresceu do pH 7,0 para o pH 8,0 (figura 13), o que pode ser explicado devido à possível decomposição do catecolaminérgico em valores de pH mais altos¹¹⁷. Portanto, as medidas subseqüentes foram realizadas em solução tampão fosfato e em pH 7,0.

Com o propósito de avaliar o efeito do potencial elétrico aplicado sobre a resposta do fotossensor para adrenalina (figura 14), foram realizadas medidas em tampão fosfato pH 7,0 (0,1 mol L⁻¹) em potencial compreendidos entre 0,1 V e 0,6 V. A resposta fotoeletroquímica do BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO para adrenalina foi $0,21 \pm 0,01$, $0,72 \pm 0,01$, $1,04 \pm 0,02$, $1,27 \pm 0,01$, $1,34 \pm 0,05$ e $1,30 \pm 0,03$ para os potenciais aplicados de 0,1 V; 0,2 V; 0,3 V; 0,4 V; 0,5 V; e 0,6 V, respectivamente.

Figura 14: Influência do potencial aplicado para 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de adrenalina. As medidas foram realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} e pH 7,0.



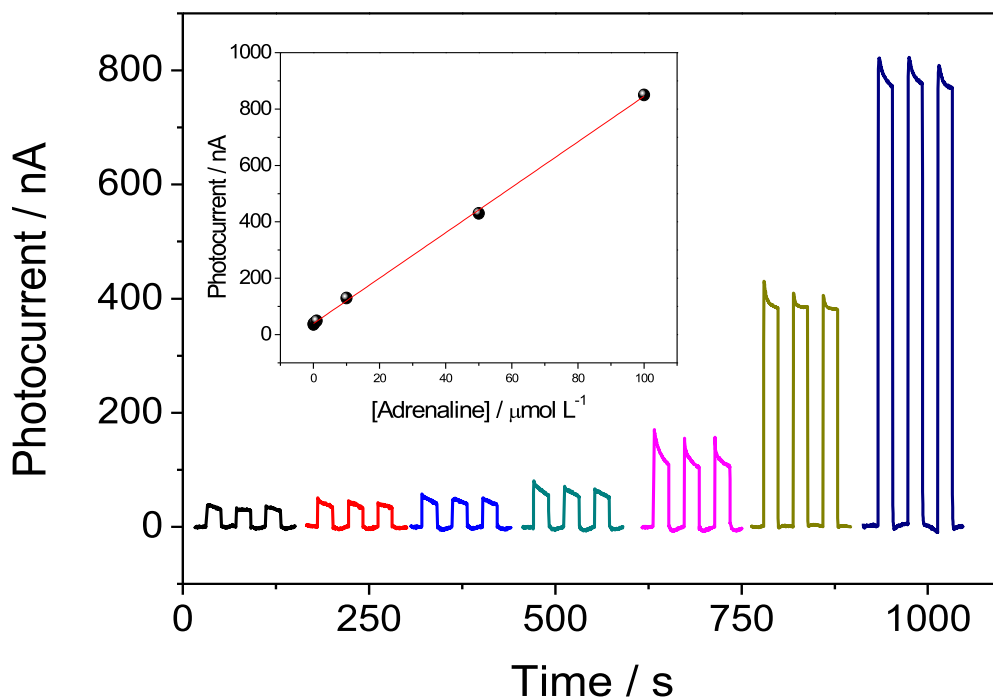
Como pode ser observado, a resposta fotoeletroquímica do sensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO para adrenalina exibiu um alto crescimento até ao potencial aplicado de 0,4 V. O potencial aplicado na célula fotoeletroquímica afeta a dobradura de banda e o alinhamento ao nível de Fermi, isto é, o valor do potencial de banda plana do material. Como o TiO₂ é um semicondutor tipo n, um potencial de junção se forma entre o TiO₂ e a solução eletrolítica e uma curvatura de banda se desenvolve devido ao nivelamento dos níveis de Fermi. Desse modo, é possível que a partir do valor de potencial 0,4 V, não haja mais alterações significativas da dupla camada elétrica e o efeito sobre o potencial de banda plana seja atingido, cessando assim a curvatura de banda⁷⁰.

Desse modo, as medidas com o sensor fotoeletroquímico proposto foram realizadas em solução tampão fosfato a 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) e sob um potencial aplicado de 0,4 V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{saturado})}$ para todas as determinações subsequentes de adrenalina.

5.4. Desempenho Analítico do Sensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO

Uma vez definidas as melhores condições experimentais para a determinação de epinefrina, foi avaliada a resposta amperométrica do fotossensor nas condições otimizadas. A figura 15 mostra o desempenho fotoeletroanalítico do sensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO sob um potencial aplicado de 0,4 V para adições sucessivas de adrenalina, em concentração 0,1 mol L⁻¹ da solução tampão fosfato (pH 7,0) e em intervalos de 20 segundos com e sem incidência de luz LED, totalizando um tempo máximo de 140 segundos:

Figura 15: Fotocorrentes do sensor fotoeletroquímico obtidos sobre condições otimizadas para adrenalina em intervalos de concentração entre 0,01 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (curva analítica inserida).



O sensor fotoeletroquímico exibiu um intervalo de resposta linear para a adrenalina entre 10 nmol L⁻¹ e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, que pode ser expresso de acordo com a seguinte equação (curva inserida: figura 15):

$$I_{\text{fotocorrente}} \text{ (nA)} = (25 \pm 3) + (8,1 \pm 0,1) [\text{ADR}] \text{ (}\mu\text{mol L}^{-1}\text{)} \quad (4)$$

Com um coeficiente de correlação de 0,999 (para $n = 7$).

O limite de detecção (LOD) para a epinefrina foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{LOD} = 3 \sigma_{bl} / \text{inclinação} \quad (5)$$

Sendo σ_{bl} o desvio padrão da resposta amperométrica obtida de 10 medidas em replicata da solução sem o analito (branco), e a inclinação é a sensibilidade do fotossensor analítico, sendo o valor de LOD encontrado de 1 nmol L^{-1} para a adrenalina. O LOD e o intervalo de resposta linear para a determinação de adrenalina foram comparados com os melhores sensores eletroquímicos reportados na literatura até então (tabela 1)⁷⁹⁻¹⁰⁰:

Tabela 1: Comparação de alguns parâmetros analíticos do fotossensor proposto para determinação de adrenalina frente a outras técnicas eletroquímicas

Eletrodo	Técnica	Faixa Linear / ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD / ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
DTT-DDT/AuNP/AuE	CV	0,1 – 8	0,06	79
PR/PIGE	DPV	3 – 90	0,8	80
Au/PP/GCE	DPV	0,3 – 21	0,03	81
Poly(methyl-Py)/GCE	SWV	0,75 – 200	0,17	82
Pt-AuNPs/GCE	DPV	63 – 400	57	83
P(tau)/GCE	DPV	2 – 600	0,3	84
p-ATT/GCE	CV	0,04 – 0,4	0,00027	85
PtNP/BMI.PF ₆ /LAC/CPE	SWV	0,99 – 210	0,29	86
Grafite	CV	0,1 – 150	0,087	87
PBCACPM/GCE	CV/DPV	0,2 – 175	0,03	88
HT/MWCNT/GCE	DPV	0,078 – 0,2	0,02	89
CoPc/MWCNT	DPV	1,33 – 5,5	0,156	90
PIGE	CV/LSV	0,01 – 10	0,003	91
PP/MWCNT/GCE	DPV	0,1 – 8	0,04	92
CHIT/IL/SWCNT/GCE	DPV	1 – 580	0,09	93
IL/CNT/CPE	DPV	0,3 – 450	0,09	94
4NTP/4MBA	SECM/EIS	0,1 – 2	0,5	95
ZnO/NPs/IL/CPE	CV	0,4 – 5 / 5 – 300	0,15	96
BDDFE	SWV	0,7 – 60	0,21	97
SnO ₂ /grafeno	XRD/TEM/XPS	0,5 – 200	0,017	98
GCE/C-dots	DPV	0,05 – 2	0,0061	99
CuFe ₂ O ₄ /IL _s /CPE	SWV	0,1 – 400	0,07	100
BEDT-TTF/DNA/TiO ₂ /ITO	PEC	0,01 – 100	0,001	Este Trabalho

DTT: Ditiotreitól; **DDT:** Dodecanotíol; **AuNPs:** Nanopartículas de ouro; **AuE:** Eletrodo de ouro; **PR:** Poli(rutina-Ru); **PIGE:** Eletrodo de grafite impregnado com parafina; **PP:** Polipirrol; **GCE:** Eletrodo de carbono vítreo; **Poly(methyl-Py):** Poli(metil-pirrol); **Pt-AuNPs:** Nanopartículas de platina-ouro; **P(tau):**

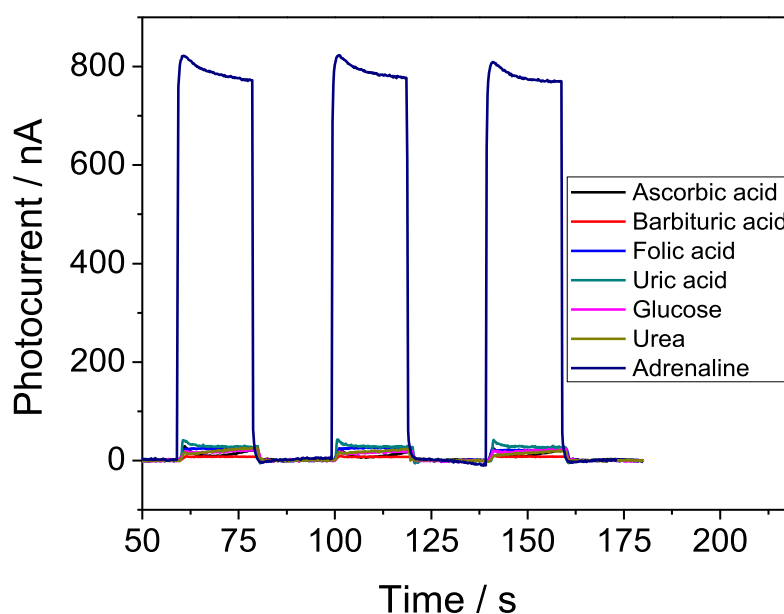
Poli(taurina); **p-ATT**: 5-amino-1,3,4-tiadiazol-2-tiol; **PtNPs**: Nanopartículas de platina; **BMI.PF₆**: Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazol; **LAC**: Lacase; **CPE**: Eletrodo de pasta de carbono; **PBCACPM**: poli(3,3'-bis[N,N-bis(carboximetil)aminometil]-o-cresolsulfoneftaleína); **HT**: Hematoxilina; **MWCNT**: Nanotubos de carbono de paredes múltiplas; **CoPc**: Ftalocianina de cobalto; **CHIT**: Quitosana; **IL**: Líquido iônico; **SWCNT**: Nanotubos de carbono de parede única; **CNT**: Nanotubos de carbono; **4NTP**: 4-nitrotiofenol; **4MBA**: Ácido 4-mercaptobenzóico; **BDDFE**: Eletrodo de película de diamante dopado com boro; **C-dots**: Pontos quânticos de carbono; **BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO**: Eletrodo ITO modificado com DNA e nanopartículas de TiO₂ sensibilizadas com bis(etilenoditio)tetratiofulvaleno.

Como pode ser observado, o sensor fotoeletroanalítico BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO exibiu um intervalo de resposta linear de quatro ordens de magnitude e um limite de detecção de 1 nmol L⁻¹, que são tão bons quanto os melhores sensores eletroquímicos para a determinação de adrenalina. A precisão das medidas usando o sensor fotoeletroquímico BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO foi investigado por meio de estudos repetitivos em 10 dias diferentes bem como 10 medidas realizadas no mesmo dia.

O desvio padrão relativo para 10 determinações de 100 µmol L⁻¹ para adrenalina, realizada no mesmo dia, foi de 3% enquanto que, para 10 determinações de 100 µmol L⁻¹ de adrenalina em 10 dias diferentes, o desvio padrão relativo foi de 5,3%. Portanto, este conjunto de resultados indica uma elevada precisão em termos de repetibilidade e reprodutibilidade das medidas obtidas utilizando o sensor fotoeletroanalítico BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO.

A fim de avaliar a seletividade do fotossensor proposto, investigou-se a influência de agentes interferentes potenciais, que estão comumente presentes na urina humana. A figura 16 mostra a resposta amperométrica do sensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO para a adrenalina bem como para as espécies interferentes, todas preparadas nas mesmas condições para adrenalina (100 µmol L⁻¹).

Figura 16: Fotocorrente obtida para o sensor fotoeletroquímico proposto em relação às várias substâncias interferentes em comparação com a obtida para adrenalina sobre condições otimizadas a potencial aplicado de 0,4 V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{saturado})}$. A concentração de todas as espécies foi fixada a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Assim, foram investigados os efeitos das substâncias frequentemente encontradas em amostras de urina, como ácido ascórbico, ácido úrico, ureia, glicose, ácido fólico e ácido barbitúrico na resposta do sensor fotoeletroanalítico BEDT-TTF/DNA/ TiO_2 /ITO. Soluções de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ destes compostos foram preparados nas mesmas condições de adrenalina (solução tampão fosfato na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0) a quatro concentrações diferentes. A resposta de fotocorrente de espécies estranhas foi monitorada e comparada com o sinal obtido para adrenalina.

A variação na resposta do fotossensor foi avaliada por amperometria sob as condições de luz em intervalos de 20 segundos com LED ligado/desligado, totalizando um tempo de 140 segundos, sob o potencial aplicado de $+0,4 \text{ V vs. Ag}/\text{AgCl}_{(\text{saturado})}$. Foi interessante notar que altas concentrações desses compostos interferentes exibiram resposta fotoeletroquímica muito baixa sob as mesmas condições de adrenalina (figura 16).

A estabilidade do sensor fotoeletroquímico foi avaliada pelas sucessivas medidas de fotocorrente do sensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO a 100 µmol L⁻¹ de adrenalina em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,0. Após 10 medidas, a fotocorrente apresentou uma diminuição de apenas 6% em relação à primeira medição de fotocorrente, o que mostra a eficiente capacidade de adsorção do material compósito à superfície do eletrodo.

5.5. Aplicação do sensor fotoeletroanalítico BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO em amostras de urina humana

O método de adição de padrão foi aplicado para análise de amostras de urina humana com pequenas adições de adrenalina para avaliar a utilidade prática do sensor fotoeletroquímico proposto. Os resultados médios de três medições repetidas de adrenalina com o sensor fotoeletroanalítico BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO estão resumidos na tabela 2:

Tabela 2: Valores de recuperação de ADR obtidos para duas amostras de urina humana (n = 5).

Amostras	[ADR] adicionada / (µmol L ⁻¹)	[ADR] encontrada* / (µmol L ⁻¹)	Recuperação / (%)
A	0	0,032 ± 0,005	-
	0.5	0,48 ± 0,2	96 ± 0,10
	5	5,30 ± 0,1	106 ± 0,40
B	0	0,045 ± 0,009	-
	10	10,4 ± 0,10	104 ± 0,20
	50	49,2 ± 0,3	98 ± 0,10

* ADR (adrenalina) encontrada significa a diferença da ADR total medida e a ADR adicionada em amostras de urina.

Os valores de recuperação entre 96 e 106% utilizando o sensor fotoeletroanalítico BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO indicam que não há interferências

significativas da matriz da urina humana, bem como o método é suficientemente preciso e adequado para a quantificação de adrenalina. Tendo em conta que o sensor proposto exibiu uma gama de resposta linear mais larga e um LOD mais baixo em comparação com os sensores eletroquímicos anteriormente relatados, é rentável e apresenta uma aplicabilidade eficiente para a determinação de adrenalina em amostras de urina humana. Neste sentido, o sensor proposto pode ser aplicado diretamente na determinação de adrenalina em amostras de urina sem preparação prévia ou separação mais complexa.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O preparo das espécies modificadoras bem como sua imobilização à superfície do eletrodo de trabalho se mostrou simples e eficaz. A suspensão de TiO_2 em DMF foi uma melhor alternativa de preparo em comparação à suspensão em água, uma vez que o processo adsortivo dessa suspensão na lâmina de ITO se mostrou mais susceptível à dessorção, conseqüentemente comprometendo a reprodutibilidade nas medidas. Adicionalmente, a incorporação do BEDT-TTF/DNA à superfície do eletrodo foi eficiente e sua capacidade de absorção na região do visível garantiu o bom desempenho analítico do fotossensor proposto.

A otimização dos principais parâmetros experimentais foi realizada com o intuito de determinar as melhores condições para a determinação de adrenalina e assim tornar possível a aplicação do sensor BEDT-TTF/DNA/ TiO_2 /ITO em amostras reais de urina humana. A escolha do tampão fosfato como parâmetro se deu devido à sua alta mobilidade iônica favorecendo a foto-geração de elétrons e lacunas, refletindo na melhor resposta de fotocorrente em comparação ao tampão HEPES e Britton-Robson.

Em relação à escolha do valor de pH da solução tampão fosfato, o pH próximo ao valor fisiológico sugere a excelente interação entre o fotocatalisador e o analito, uma vez que a adrenalina está positivamente carregada, favorecendo a contribuição de elétrons para as lacunas geradas nos níveis de energia HOMO do BEDT-TTF e, portanto, favorecendo a eficiência de transferência de elétrons. Por fim, a escolha do potencial aplicado de 0,4 V demonstrou o máximo efeito de potencial elétrico para a resposta do fotossensor, sugerindo um máximo efeito sobre o alinhamento dos níveis de Fermi em ambos os lados da junção semicondutor-eletrólito.

O fotossensor proposto exibiu um excelente valor de limite de detecção, além da ampla faixa linear, alta estabilidade e repetibilidade para a determinação de adrenalina. Portanto, o sensor proposto se mostra eficiente para a detecção de baixas quantidades de adrenalina em amostras de urina humana, além de ser eficiente na aplicação em larga escala para a detecção do hormônio adrenérgico.

O sensor fotoeletroquímico BEDT-TTF/DNA/ TiO_2 /ITO foi capaz de determinar a epinefrina a 0,4 V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{saturado})}$ sem a interferência de ácido ascórbico, ácido úrico, ureia, glicose, ácido fólico e ácido barbitúrico. Tal resultado

pode se explicar pelo fato de que estas substâncias em iguais condições para a epinefrina estão carregadas negativamente. Portanto, a elevada fotocorrente para a adrenalina não traz interferências significativas da matriz da urina humana a qual comumente apresenta os interferentes mencionados.

Finalmente, através do método de adição de padrão, o sensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO foi capaz de determinar adrenalina nas duas amostras de urina humana acidificadas a 1% de HCl, sem etapas prévias de preparo ou separação mais complexa da amostra. Além disso, os valores de recuperação entre 96 e 106% confirmam que não há interferências significativas de espécies comumente encontradas na urina. Logo, o sensor BEDT-TTF/DNA/TiO₂/ITO pode ser aplicado na determinação da catecolamina em amostras reais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o Sistema nervoso**. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2002.
2. KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
3. WONG, D. Epinephrine biosynthesis: hormonal and neural control during stress. **Cellular and Molecular Neurobiology**, Vol. 26, 2006, p. 889-898.
4. MACHIDA, M.; MIURA, S.; MATSUO, K.; ISHIKURA, H.; SAKU, K. Effect of intravenous adrenaline before arrival at the hospital in out-of-hospital cardiac arrest. **Journal of Cardiology**, Vol. 60, No. 6, 2012, p. 503.
5. ZARE, H. R.; GHANBARI, Z.; NASIRIZADEH, N.; BENVID, A. Simultaneous determination of adrenaline, uric acid, and cysteine using bifunctional electrocatalyst of ruthenium oxide nanoparticles. **Comptes Rendus Chimie**, Vol. 16, No. 3, 2013, p. 287-295.
6. TAVANA, T.; KHALILZADEH, M. A.; KARIMI-MALEH, H.; ENSAFI, A. A.; BEITOLLAHI, H.; ZAREYEE, D. Sensitive voltammetric determination of epinephrine in the presence of acetaminophen at a novel ionic liquid modified carbon nanotubes paste electrode. **Journal of Molecular Liquids**, Vol. 168, 2012, p. 69-74.
7. GOODALL, Mc C.; STONE, C.; HAYNES Jr, B. W. Urinary Output of Adrenaline and Noradrenaline in Severe Thermal Burns. **Annals of Surgery**, Vol. 145, No. 4, 1957, p. 479-487.
8. SZEAPONIK, J.; MÖLLER, B.; PFEIFFER, D.; LISDAT, F.; WOLLENBERGER, U.; MAKOWER, A.; SCHELLER, F. W. Ultrasensitive bienzyme sensor for adrenaline. **Biosensors & Bioelectronics**, Vol. 12, No. 10, 1997, p. 47-52.

9. ADENIYI, W. K.; WRIGHT, A. R. Novel fluorimetric assay of trace analysis of epinephrine in human serum. **Spectrochimica Acta, Part A**, Vol. 74, 2009, p. 1001-1004.
10. BULATOV, A. V.; PETROVA, A. V.; VISHNIKIN, A. B.; MOSKVIN, A. L.; MOSKVIN, L. N. Stepwise injection spectrophotometric determination of epinephrine. **Talanta**, Vol. 96, 2012, p. 62-67.
11. RAUM, W. J. Enzymatic radioimmunoassay of epinephrine, norepinephrine, metanephrine, and normetanephrine. **Methods in Enzymology**, Vol. 142, 1987, p. 550-71.
12. GYLLENHAAL, O.; JOHANSSON, L.; VESSMAN, J. Gas chromatography of epinephrine and norepinephrine after derivatization with chloroformates in aqueous media. **Journal of Chromatography A**, Vol. 190, 1980, p. 347-357.
13. CARRERA, V.; SABATER, E.; VILANOVA, E.; SOGOROB, M. A. A simple and rapid HPLC-MS method for the simultaneous determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine: application to the secretion of bovine chromaffin cell cultures. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Vol. 847, No. 2, 2007, p. 88-94.
14. LI, T.; WANG, Z.; XIE, H.; FU, Z. Highly sensitive trivalent copper chelate-luminol chemiluminescence system for capillary electrophoresis detection of epinephrine in the urine of smoker. **Journal of Chromatography. B, analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Vol. 911, No. 12, 2012, p. 1-5.
15. RAUM, W. J. Methods of plasma catecholamine measurement including radioimmunoassay. **The American Journal of Physiology**, Vol. 247, 1984, p. E4-12.

16. DING, M.; ZHOU, Y.; LIANG, X.; ZOU, H.; WANG, Z.; WANG, M.; MA, J. An electrochemical sensor based on graphene/poly(brilliant cresyl blue) nanocomposite for determination of epinephrine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Vol. 763, 2016, p. 25-31.
17. DORRAJI, P. S.; JALALI, F. Novel sensitive Electrochemical sensor for simultaneous determination of epinephrine and uric acid by using a nanocomposite of MWCNTs-chitosan and gold nanoparticles attached to thioglycolic acid. **Sensors & Actuators B**, Vol. 200, 2014, p. 251-258.
18. THOMAS, T.; MASCARENHAS, R. J.; D'SOUZA, O. J.; DETRICHE, S.; MEKHALIF, Z.; MARTIS, P. Pristine multi-walled carbon nanotubes/SDS modified carbon paste Electrode as an amperometric sensor for epinephrine. **Talanta**, Vol. 125, 2014, p. 352-360.
19. ZHANG, X.; XU, F.; ZHAO, B.; JI, X.; YAO, Y.; WU, D.; GAO, Z.; JIANG, K. Synthesis of CdS quantum dots decorated graphene nanosheets and non-enzymatic photoelectrochemical detection of glucose. **Electrochimica Acta**, Vol. 133, 2014, p. 615-622.
20. SHEN, Q.; JIANG, J.; LIU, S.; HAN, L.; FAN, X.; FAN, M.; FAN, Q.; WANG, L.; HUANG, W. Facile synthesis of Au-SnO₂ hybrid nanospheres with enhanced photoelectrochemical biosensing performance. **Nanoscale**, Vol. 6, 2014, p. 6315-6321.
21. DEVADOSS, A.; SUDHAGAR, P.; TERASHIMA, C.; NAKATA, K.; FUJISHIMA, A. Photoelectrochemical Biosensors: New insights into promising photoelectrodes and signal amplification strategies. **Journal of Photochemistry and Photobiology, C**, Vol. 24, 2015, p. 43-63.
22. ZHAO, W-W.; XU, J-J.; CHEN, H-Y. Photoelectrochemical aptasensing. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 82, 2016, p. 307-315.

23. ETACHERI, V.; DI VALENTIN, C.; SCHNEIDER, J.; BAHNEMANN, D.; PILLAI, S. C. Visible-light activation of TiO₂ photocatalysts: Advances in theory and experiments. **Journal of Photochemistry and Photobiology, C**, Vol. 25, 2015, p. 1-29.
24. OKOTH, O. K.; YAN, K.; LIU, Y.; ZHANG, J. Graphene-doped Bi₂S₃ nanorods as visible-light photoelectrochemical aptasensing platform for sulfadimethoxine detection. **Biosensors & Bioelectronics**, Vol. 86, No. 15, 2016, p. 36-42.
25. NETO, S. Y.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S. Visible LED light photoelectrochemical sensor for detection of L-DOPA based on oxygen reduction on TiO₂ sensitized with iron phthalocyanine. **Electrochemistry Communications**, Vol. 62, 2016, p. 1-4.
26. NETO, S. Y.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S. Photoelectroanalytical Sensor Based on TiO₂ Nanoparticles/Copper Tetrasulfonated Phthalocyanine for Detection of Dopamine Exploiting Light Emitting Diode Irradiation. **Electroanalysis**, Vol. 28, 2016, p. 2087-2092.
27. WANG, Y.; WANG, W.; WANG, S.; CHU, W.; WEI, T.; TAO, H.; ZHANG, C.; SUN, Y. Enhanced photoelectrochemical detection of L-cysteine based on the ultrathin polythiophene layer sensitized anatase TiO₂ on F-doped tin oxide substrates. **Sensors and Actuators, B**, Vol. 232, 2016, p. 448-453.
28. WEI, M.; WAN, J.; HU, Z.; PENG, Z.; WANG, B. Enhanced photocatalytic degradation activity over TiO₂ nanotubes co-sensitized by reduced graphene oxide and copper(II)meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphyrin. **Applied Surface Science**, Vol. 377, 2016, p. 149-158.
29. MONTEIRO, T. O.; NETO, S. Y.; DAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S. Development of a photoelectrochemical sensor for detection of TBHQ antioxidant based on LiTCNE-TiO₂ composite under visible LED light. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Vol. 774, 2016, p. 36-41.

30. PANG, X.; PAN, J.; WANG, L.; REN, W.; GAO, P. WEI, Q. DU, B. CdSe quantum dot-functionalized TiO₂ nanohybrids as a visible light induced photoelectrochemical platform for the detection of proprotein convertase subtilisin/kexin type 6. **Biosensors & Bioelectronics**, Vol. 71, 2015, p. 88-97.
31. ZAMFIR, L-G.; ROTARIU, L.; BALA, C. Acetylcholinesterase biosensor for carbamate drugs based on tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane/ionic liquid conductive gels. **Biosensors & Bioelectronics**, Vol. 46, 2013, p. 61-67.
32. NISHIDA, Y.; ISONO, T.; UEDA, A.; MORI, H. Uniaxial Strain Effect of the Moderately Dimerized Molecular Conductor β -(meso-DMBEDT-TTF)₂PF₆. **European Journal of Inorganic Chemistry**, Vol. 24, 2014, p. 3845-3849.
33. NISHIJO, J.; ENOMOTO, M. A Series of Weak Ferromagnets Based on a Chromium-Acetylide-TTF Type Complex: Correlation of the Structures and Magnetic Properties and Origin of the Weak Ferromagnetism. **Inorganic Chemistry**, Vol. 52, No. 22, 2013, p. 13263- 13268.
34. KONUMA, T.; AKUTAGAWA, T.; YUMOTO, T.; NAKAMURA, T.; KAWAMATA, J.; INOUE, K.; NAKAMURA, T.; TACHIBANA, H.; MATSUMOTO, M.; IKEGAMI, H.; HORIUCHI, S.; YAMOCHI, H.; SAITO, G. Charge-transfer interactions and non-linear optical properties of tetrathiafulvalene-based Langmuir-Blodgett films. **Thin Solid Films**, Vol. 327-329, 1998, p. 348-352.
35. KOO, M. H.; YOON, H. H. Fabrication of Carbon Nanotubes and Charge Transfer Complex-Based Electrodes for a Glucose/Oxygen Biofuel Cell. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Vol. 13, 2013, p. 7434-7438.
36. WENGER, S.; BOUIT, P-A.; CHEN, Q.; TEUSCHER, J.; DI CENSO, D.; HUMPHRY-BAKER, R.; MOSER, J-E.; DELGADO, J. L.; MARTIN, N.; ZAKEERUDDIN, S. M.; GRÄTZEL, M. Efficient Electron Transfer and Sensitizer Regeneration in Stable π -Extended Tetrathiafulvalene-Sensitized Solar Cells. **Journal of the American Chemical Society**, Vol. 132, No. 14, 2010, p. 5164-5169.

37. THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, Vol.16, 2001, p. 121-131.
38. HULANICKI, A.; GLAB, S.; IGMAN, F. Chemical sensors: Definitions and classification. **Pure & Applied Chemistry**, Vol. 63, No. 9, 1991, p. 1247-1250.
39. EIRAS, J. A. Materiais Piezoelétricos. In: _____. Grupo de Cerâmicas Ferroelétricas. Departamento de Física – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
40. CARVALHO, R. M.; RATH, S.; KUBOTA, L. T. SPR – Uma nova ferramenta para biossensores. **Química Nova**, Vol. 26, No. 1, 2003, p. 97-104.
41. O' BRIEN, M. J.; PÉREZ-LUNA, V. H.; BRUECK, S. R. J.; LÓPEZ, G. P. A surface plasmon resonance array biosensor based on spectroscopic imaging. **Biosensors & Bioelectronics**, Vol. 16, 2001, p. 97-108.
42. PINTO, L. F. T.; ALBUQUERQUE, R. O. **Eletrônica: eletrônica analógica**. Volume 2. São Paulo: Fundação Padre Anchieta, 2011.
43. BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: Fundamentals and Applications**, John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2001.
44. LIU, Y.; JIA, S.; GUO, L-H. Development of microplate-based photoelectrochemical DNA biosensor array for high throughput detection of DNA damage. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Vol. 161, 2012, p. 334-340.
45. CHEN, J.; ZHAO, G-C. A novel signal-on photoelectrochemical immunosensor for detection of alpha-fetoprotein by in situ releasing electron donor. **Biosensors and Bioelectronics**, Vol. 98, 2017, p. 155-160.

46. ZHANG, N.; RUAN, Y-F.; MA, Z-Y.; ZHAO, W-W.; XU, J-J.; CHEN, H-Y. Simultaneous photoelectrochemical and visualized immunoassay of β -human chorionic gonadotrophin. **Biosensors and Bioelectronics**, Vol. 85, 2016, p. 294-299.
47. BEQUEREL, E.; ACAD, C. R. **Sciences**, Vol. 9, 1839, p. 145-149.
48. YANG, J.; WANG, B.; LIU, Y.; WANG, K.; XING, W.; LIU, C. Enhancement of photovoltaic performance of photoelectrochemical biofuel cells by β -functionalized porphyrin sensitizers. **Journal of Power Sources**, Vol. 248, 2014, p. 660-667.
49. MEZIANI, D.; ABDMEZIEM, K.; BOUACIDA, S.; TRARI, M. Photoelectrochemical and physical characterizations of a new single crystal POM-based material: Application in photocatalysis. **Journal of Molecular Structure**, Vol. 1125, 2016, p. 540-545.
50. LEE, C-T.; CHIU, Y-S. Photoelectrochemical passivated ZnO-based nanorod structured glucose biosensors using gate-recessed AlGaIn/GaN ion-sensitive field-effect-transistors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Vol. 210, 2015, p. 756-761.
51. WANG, G-L.; LIU, K-L.; DONG, Y-M.; WU, X-M.; LI, Z-J.; ZHANG, C. A new approach to light up the application of semiconductor nanomaterials for photoelectrochemical biosensors: Using self-operating photocathode as a highly selective enzyme sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, Vol. 62, 2014, p. 66-72.
52. LIANG, Y.; GUAN, Z-C.; WANG, H-P.; DU, R-G. Enhanced photoelectrochemical anticorrosion performance of WO_3/TiO_2 nanotube composite films formed by anodization and electrodeposition. **Electrochemistry Communications**, Vol. 77, 2017, p. 120-123.
53. ZHANG, N.; ZHANG, L.; RUAN, Y-F.; ZHAO, W-W.; XU, J-J.; CHEN, H-Y. Quantum-dots-based photoelectrochemical bioanalysis highlighted with recent examples. **Biosensors and Bioelectronics**, Vol. 94, 2017, p. 207-218.

54. HAN, Z.; LUO, M.; CHEN, L.; CHEN, J.; LI, C. A photoelectrochemical immunosensor for detection of α -fetoprotein based on Au-ZnO flower-rod heterostructures. **Applied Surface Science**, Vol. 402, 2017, p. 429-435.
55. ZHAO, W-W.; XU, J-J.; CHEN, H-Y. Photoelectrochemical enzymatic biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, Vol. 92, 2017, p. 294-304.
56. YANG, Y.; HU, W. Bifunctional polydopamine thin film coated zinc oxide nanorods for label-free photoelectrochemical immunoassay. **Talanta**, Vol. 166, 2017, p. 141-147.
57. ZHANG, Z-X.; ZHAO, C-Z. Progress of Photoelectrochemical Analysis and Sensors. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, Vol. 41, No. 3, 2013, p. 436-444.
58. TURNER, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, Vol. 42, 2013, p. 3184-3196.
59. ZHANG, L.; MOHAMED, H. H.; DILLERT, R.; BAHNEMANN, D. Kinetics and mechanisms of charge transfer process in photocatalytic systems: a review. **Journal of Photochemistry and Photobiology C**, Vol. 13, 2012, p. 263-276.
60. MANZHOS, S.; JONO, R.; YAMASHITA, K.; FUJISAWA, J-I.; NAGATA, M.; SEGAWA, H. Study of interfacial charge transfer bands and electron recombination in the surface complexes of TCNE, TCNQ and TCNAQ with TiO₂. **Journal of Physical Chemistry C**, Vol. 115, 2011, p. 21487-21493.
61. ZHAO, W-W.; XU, J-J.; CHEN, H-Y. Photoelectrochemical bioanalysis: the state of the art. **Chemical Society Reviews**, Vol. 44, 2015, p. 729-741.
62. PETRIK, N. G.; KIMMEL, G. A.; SHEN, M.; HENDERSON, M. A. Quenching of electron transfer reactions through coadsorption: A study of oxygen photodesorption from TiO₂ (110). **Surface Science**, Vol. 652, 2016, p. 183-188.

63. ZHU, H.; FAN, G-C.; ABDEL-HALIM, E. S.; ZHANG, J-R.; ZHU, J-J. Ultrasensitive photoelectrochemical immunoassay for CA19-9 detection based on CdSe@ZnS quantum dots sensitized TiO₂NWs/Au hybrid structure amplified by quenching effect of Ab₂@V²⁺ conjugates. **Biosensors and Bioelectronics**, Vol. 77, 2016, p. 339-346.
64. FEYNMAN, R. P.; LEIGHTON, R. B.; SANDS, M. **Lições de Física**. Edição definitiva, Vol. 3. California Institute of Technology – 2005. Tradução: Bookman – Porto Alegre, 2008.
65. CALLISTER Jr, W. D. **Introdução à Ciência e Engenharia de Materiais**. Editora LTC, 2000.
66. EISBERG, R.; RESNICK, R. **Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas**. Editora CAMPUS, 23ª Tiragem. Universidade da Califórnia, Santa Bárbara, 1994.
67. KITTEL. C. **Introdução à Física do Estado Sólido**. 8ª edição, Universidade da Califórnia, Berkelev – 2005. Tradução: Instituto Militar de Engenharia, 2006.
68. BAGOTSKY, V. S. **Fundamentals of Electrochemistry**. 2nd ed. Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry. Russian Academy of Sciences. Moscow, Russia, 2006.
69. SHI, H.; ZHAO, G.; LIU, M.; ZHU, Z. A novel photoelectrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer modified TiO₂ nanotubes and its highly selective detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Electrochemistry Communications**, Vol. 13, 2011, p. 1404-1407.
70. BOCKRIS, J. O'M.; REDDY, A. K. N. **Modern Electrochemistry – Electrodeics in Chemistry, Engineering, Biology, and Environmental Science**. 2nd ed. Kluwer Academic Publishers, New York, 2004.

71. MAGDZIARZ, A.; COLMENARES, J. C. In Situ Coupling of Ultrasound to Electro- and-Photo-Deposition Methods for Materials Synthesis. **Molecules**, Vol. 216, No. 22, 2017, p. 1-22.

72. BU, Y.; AO, J-P. A Review on Photoelectrochemical Cathodic Protection Semiconductor Thin Films for Metals. **Green Energy and Environment**, Vol. 16, 2017, p.1-51.

73. RIBEIRO, J. A.; FERNANDES, P. M. V.; PEREIRA, C. M.; SILVA, F. Electrochemical sensors and biosensors for determination of catecholamines neurotransmitters: A review. **Talanta**, Vol. 160, 2016, p. 653-679.

74. CHICHARRO, M.; ZAPARDIEL, A.; BERMEIO, E.; PEREZ-LOPEZ, J. A.; HERNANDEZ, L. Direct Determination of Ephedrine Alkaloids and Epinephrine in Human Urine by Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of Liquid Chromatography**, Vol. 18, 1995, p. 1363-1381.

75. HANSEN, A. M.; KRISTIANSEN, J.; NIELSEN, J. L.; BYRIALSEN, K.; CHRISTENSEN, J. M. Validation of a high performance liquid chromatography analysis for the determination of noradrenaline and adrenaline in human urine with on-line sample purification. **Talanta**, Vol. 50, 1999, p. 367-379.

76. DU, J.; SHEN, L.; LU, J. Flow injection chemiluminescence determination of epinephrine using epinephrine-imprinted polymer as recognition material. **Analytica Chimica Acta**, Vol. 489, 2003, p. 183-189.

77. ALTUN, M.; CAKAL, C.; CAGLAR, P. The development of methacrylic acid based monolithic discs used in the microfluidic chips for application in the determination of catecholamines. **Sensors and Actuators B**, Vol. 208, 2015, p. 164-172.

78. DAVLETBAEVA, P.; FALKOVA, M.; SAFONOVA, E.; MOSKVIN, L.; BULATOV, A. Flow method based on cloud point extraction for fluorometric determination of epinephrine in human urine. **Analytica Chimica Acta**, Vol. 911, 2016, p. 69-74.

79. WANG, L.; BAI, J.; HUANG, P.; WANG, H.; ZHANG, L.; ZHAO, Y. Self-assembly of gold nanoparticles for the voltammetric sensing of epinephrine. **Electrochemistry Communications**, Vol. 8, No. 6, 2006, p. 1035-1040.
80. JIN, G. P.; CHEN, Q-Z.; DING, Y-F.; HE, J-B. Electrochemistry behavior of adrenalin, serotonin and ascorbic acid at novel poly rutin modified paraffin-impregnated graphite electrode. **Electrochimica Acta**, Vol. 52, No. 7, 2007, p. 2535-2541.
81. LI, J.; LIN, X. Q. Electrodeposition of gold nanoclusters on overoxidized polypyrrole film modified glassy carbon electrode and its application for the simultaneous determination of epinephrine and uric acid under coexistence of ascorbic acid. **Analytica Chimica Acta**, Vol. 596, No. 2, 2007, p. 222-230.
82. ASLANOGLU, M.; KUTLUAY, A.; KARABULUT, S.; ABBASOGLU, S. Voltammetric Determination of Adrenaline Using a Poly(1-Methylpyrrole) Modified Glassy Carbon Electrode. **Journal of the Chinese Chemical Society**, Vol. 55, 2008, p. 794-800.
83. SOUNDAPPAN, T.; SHEN-MING, C. Applications of nanostructured Pt-Au hybrid film for the simultaneous determination of catecholamines in the presence of ascorbic acid. **Journal of Solid State Electrochemistry**, Vol. 13, No. 3, 2009, p. 445-453.
84. WANG, Y.; CHEN, Z. Z. A novel poly(taurine) modified glassy carbon electrode for the simultaneous determination of epinephrine and dopamine. **Colloids and Surfaces B: Bio interfaces**, Vol. 74, No. 1, 2009, p. 322-327.
85. KALIMUTHU, P.; JOHN, S. A. Simultaneous determination of epinephrine, uric acid and xanthine in the presence of ascorbic acid using an ultrathin polymer film of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-thiol modified electrode. **Analytica Chimica Acta**, Vol. 647, 2009, p. 97-103.

86. BRONDANI, D.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on platinum nanoparticles dispersed in ionic liquid and laccase for determination of adrenaline. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Vol. 140, 2009, p. 252-259.
87. EL BOUHOUTI, H.; NARANJO-RODRÍGUEZ, I.; HIDALGO-HIDALGO de CISNEROS, J. L.; EL KAOUTIT, M.; TEMSAMANI, K; R.; BOUCHTA, D.; AGUILERA, L. M. C. Electrochemical behaviour of epinephrine and uric acid at a Sonogel-Carbon L-Cysteine modified electrode. **Talanta**, Vol. 79, 2009, p. 22-26.
88. ENSAFI, A. A.; REZAEI, B.; ZARE, S. Z. M.; TAEI, M. Simultaneous determination of ascorbic acid, epinephrine, and uric acid by differential pulse voltammetry using poly (3,3'-bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]-o-cresolsulfonephthalein) modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B**, Vol. 150, 2010, p. 321-329.
89. ZARE, H. R.; NASIRIZADEH, N. Simultaneous determination of ascorbic acid, adrenaline and uric acid at a hematoxylin multi-wall carbon nanotube modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Vol. 143, No. 2, 2010, p. 666-672.
90. MORAES, F. C.; GOLINELLI, D. L. C.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S. Determination of epinephrine in urine using multi-walled carbon nanotube modified with cobalt phthalocyanine in a paraffin composite electrode. **Sensors and Actuators B**, Vol. 148, 2010, p. 492-497.
91. SHAHROKHIAN, S.; KHAF AJ, M. Application of pyrolytic graphite modified with nano-diamond/graphite film for simultaneous voltammetric determination of epinephrine and uric acid in the presence of ascorbic acid. **Electrochimica Acta**, Vol. 55, 2010, p. 9090-9096.
92. SHAHROKHIAN, S.; SABERI, R-S. Electrochemical preparation of over-oxidized polypyrrole/multi-walled carbon nanotube composite on glassy carbon electrode and its applications in epinephrine determination. **Electrochimica Acta**, Vol. 57, 2011, p. 132-138.

93. BABAEI, A.; BABAZADEH, M.; AFRASIABI, M. A Sensitive Simultaneous Determination of Adrenalin and Paracetamol on a Glassy Carbon Electrode Coated with a Film of Chitosan/Room Temperature Ionic Liquid/Single-Walled Carbon Nanotubes Nanocomposite. **Chinese Journal of Chemistry**, Vol. 29, No. 10, 2011, p. 2157-2164.
94. TAVANA, T.; KHALILZADEH, M. A.; KARIMI-MALEH, H.; ENSAFI, A. A.; BEITOLLAHI, H.; ZAREYEE, D. Sensitive voltammetric determination of epinephrine in the presence of acetaminophen at a novel ionic liquid modified carbon nanotubes paste electrode. **Journal of Molecular Liquids**, Vol. 168, 2012, p. 69-74.
95. JUSTINO, D. D.; LAGE, A. L. A.; SOUTO, D. E. P.; DA SILVA, J. V.; DOS SANTOS, W. T. P.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S. Study of the effects of surface pKa and electron transfer kinetics of electroactive 4-nitrothiophenol/4-mercaptobenzoic acid binary SAM on the simultaneous determination of epinephrine and uric acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Vol. 703, 2013, p. 158-165.
96. GUPTA, V. K.; SADEGHI, R.; KARIMI, F. A novel electrochemical sensor based on ZnO nanoparticle and ionic liquid binder for square wave voltammetric determination of droxidopa in pharmaceutical and urine samples. **Sensors and Actuators B**, Vol. 186, 2013, p. 603-609.
97. SOCHR, J.; SVORC, L.; RIEVAJ, M.; BUSTIN, D. Electrochemical determination of adrenaline in human urine using a boron-doped diamond film electrode. **Diamond & Related Materials**, Vol. 43, 2014, p. 5-11.
98. FAZIO, E.; LAVANYA, M.; NERI, F.; BONAVITA, A.; LEONARDI, S. G.; NERI, G.; SEKAR, C. Simultaneous electrochemical determination of epinephrine and uric acid in the presence of ascorbic acid using SnO₂/graphene nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B**, Vol. 221, 2015, p. 1412-1422.

99. CANEVARI, T. C.; NAKAMURA, M.; CINCOTTO, F. H.; DE MELO, F. M.; TOMA, H. E. High performance Electrochemical sensors for dopamine and epinephrine using nanocrystalline carbon quantum dots obtained under controlled chronoamperometric conditions. **Electrochimica Acta**, Vol. 209, 2016, p. 464-470.
100. BAVANDPOUR, R.; KARIMI-MALEH, H.; ASIF, M.; GUPTA, V. K.; ATAR, N.; ABBASGHORBANI, M. Liquid phase determination of adrenaline uses a voltammetric sensor employing CuFe_2O_4 nanoparticles and room temperature ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, Vol. 213, 2016, p. 369-373.
101. ZHU, C.; YANG, G.; LI, H.; DU, D.; LIN, Y. Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Nanomaterials and Nanostructures. **Analytical Chemistry**, Vol. 87, 2015, p. 230-249.
102. FUJISHIMA, A.; ZHANG, X.; TRYK, D. A. TiO_2 photocatalysis and related surface phenomena. **Surface Science Reports**, Vol. 63, No. 12, 2008, p. 515-582.
103. DAGHRIR, R.; DROGUI, P.; ROBERT, D. Modified TiO_2 for environmental photocatalytic applications: a review. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Vol. 52, 2013, p. 3581-3599.
104. OKOTH, O. K.; YAN, K.; LIU, Y.; ZHANG, J. Graphene-doped Bi_2S_3 nanorod as visible-light photoelectrochemical aptasensing platform for sulfadimethoxine detection. **Biosensors & Bioelectronics**, Vol. 86, 2016, p. 636-42.
105. MORA, N. D. Materiais Semicondutores. In: **Apostila de Materiais Elétricos**. Centro de Engenharias e Ciências Exatas – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Foz do Iguaçu, 2010.
106. De JONG, W. H.; BORM, P. JÁ. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**, Vol. 3, No. 2, 2008, p. 133-149.

107. ZHU, Y-C.; XU, F.; ZHANG, N.; ZHAO, W-W.; XU, J-J.; CHEN, H-Y. DNA sequence functionalized with heterogeneous core-satellite nanoassembly for novel energy-transfer-based photoelectrochemical bioanalysis. **Biosensors and Bioelectronics**, Vol. 91, 2017, p. 293-298.
108. AMACHER, A.; YI, C.; YANG, J.; BIRCHER, M. P.; FU, Y.; CASCELLA, M.; GRÄTZEL, M.; DECURTINS, S.; LIU, S-X. A quinoxaline-fused tetrathiafulvalene-based sensitizer for efficient dye-sensitized solar cells. **Chemical Communication**, Vol. 50, 2014, p. 6540-6542.
109. GUÉGANO, X.; KANIBOLOTSKY, A. L.; BLUM, C.; MERTENS, S. F.; LIU, S-X.; NEELS, A.; HAGEMANN, H.; SKABARA, P. J.; LEUTWYLER, WANDLOWSKY, S. T.; HAUSER, A.; DECURTINS, S. Pronounced Electrochemical Amphotericity of a Fused Donor-Acceptor Compound: A Planar Merge of TTF with a TCNQ Type Bithienoquinoxaline. **Chemistry – A European Journal**, 2009, Vol. 15, No. 1, p. 63-66.
110. AZOV, V. A. Recent advances in molecular recognition with tetrathiafulvalene-based receptors. **Tetrahedron Letters**, Vol. 57, 2016, p. 5416-5425.
111. DAHL, M.; LIU, Y.; YIN, Y. Composite Titanium Dioxide Nanomaterials. **Chemical Reviews**, Vol. 114, No. 19, 2014, p. 9853-9889.
112. BAVANDPOUR, R.; KARIMI-MALEH, H.; ASIF, M.; GUPTA, V. K.; ATARE, N.; ABBASGHORBANIF, M. Liquid phase determination of adrenaline uses a voltammetric sensor employing CuFe₂O₄ nanoparticles and room temperature ionic liquids **Journal of Molecular Liquids**, Vol. 213, 2016, p. 369-373.
113. HU, Z.; XU, M.; SHEN, Z.; YU, J. J. A nanostructured chromium(III) oxide/tungsten(VI) oxide p–n junction photoanode toward enhanced efficiency for water oxidation. **Journal of Materials Chemistry A**, Vol. 3, 2015, p. 14046-14053.

114. LI, D.; FENG, Y.; ZHOU, L.; YE, Z.; WANG, J.; YING, Y.; RUAN, C.; WANG, R.; LI, Y. Label-free capacitive immunosensor based on quartz crystal Au electrode for rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Analytica Chimica Acta**, Vol. 687, No. 1, 2011, p. 89-96.

115. SHEN, Y.; COSQUER, G.; BREEDLOVE, B. K.; YAMASHITA, M. Hybrid Molecular Compound Exhibiting Slow Magnetic Relaxation and Electrical Conductivity. **Magnetochemistry**, Vol. 44, 2016, p. 1.

116. MOHANRAJ, V.; JAYAPRAKASH, R.; CHANDRASEKARAM, J.; ROBERT, R.; SANGAIYA, P. Influence of pH on particle size, band gap and activation energy of CdS nanoparticles synthesized at constant frequency ultrasonic wave irradiation. **Materials Science in Semiconductor Processing**, Vol. 66, 2017, p. 131-139.

117. THURLKILL, R. L.; GRIMSLEY, G. R.; SCHOLTZ, J. M.; PACE, C. N. Hydrogen Bonding Markedly Reduces pK of Buried Carboxyl Groups in Proteins. **Journal of Molecular Biology**, Vol. 362, No. 3, 2006, p. 594-604.