



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

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE BENSERAZIDA E L-DOPA EMPREGANDO UM
ELETRODO A BASE DE NANOTUBO DE CARBONO E DIAMANTE DOPADO COM
BORO

São Luís - MA

-2018-

ADRIANO ROGERIO SILVA LIMA

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE BENSERAZIDA E L-DOPA EMPREGANDO UM
ELETRODO A BASE DE NANOTUBO DE CARBONO E DIAMANTE DOPADO COM
BORO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Química com área de concentração em Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Santos Damos

São Luís - MA

-2018-

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE BENSERAZIDA E L-DOPA EMPREGANDO UM
ELETRODO A BASE DE NANOTUBO DE CARBONO E DIAMANTE DOPADO COM
BORO

ADRIANO ROGERIO SILVA LIMA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Maranhão como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título
de Mestre em Química com área de concentração
em Analítica.

Aprovado em 09 de março de 2018

Professores da banca:

Prof. Dr. FLÁVIO SANTOS DAMOS (Orientador)

Prof. Dr. EDMAR PEREIRA MARQUES (UFMA)

Prof. Dr. VICTOR ELIAS MOUCHREK FILHO (UFMA)

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Lima, Adriano Rogerio Silva.

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE BENSERAZIDA E L-DOPA
EMPREGANDO UM ELETRODO A BASE DE NANOTUBO DE CARBONO E
DIAMANTE DOPADO COM BORO / Adriano Rogerio Silva Lima. -
2018.

74 p.

Orientador(a): Flávio Santos Damos.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, | São Luís -
MA, 2018.

1. Benserazida. 2. L-dopa. 3. Nanodiamante dopado
com boro. 4. Nanotubo de carbono. 5. Sensor químico. I.
Damos, Flávio Santos. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por estar sempre comigo e pelas oportunidades concedidas.

À minha família por todo apoio, em especial ao meu pai pelos ensinamentos a mim passados.

A minha namorada Carla Cristina Vidal Albuquerque por ser companheira e paciente nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Santos Damos pela paciência, humildade e dedicação. Por sempre está disponível em todos os momentos que precisei.

A Prof. Dr^a. Rita de Cássia Silva Luz por várias considerações que ajudaram de forma efetiva para o cumprimento do presente trabalho.

Meus agradecimentos ao grupo de pesquisa Labs por me acolherem e por me proporcionarem momentos de alegria junto a essa família.

Aos amigos Sakae e Cledivan companheiros de pesquisa que compartilharem seus conhecimentos e os momentos felizes e inesquecíveis proporcionados ao longo dessa caminhada.

Ao Prof. Dr. Hudson Zanin coordenador do grupo de pesquisa “*Carbon Sci-Tech Labs, University of Campinas, Campinas, São Paulo CEP 13083-852, Brazil*” que colaborou de forma efetiva para o desenvolvimento do presente trabalho.

“Eu caminho vivo no meu sonho estrelado”.
Victor Hugo

Resumo

O presente trabalho descreveu a determinação eletrolítica simultânea de benserazida e L-dopa em elétrodo de diamante dotado com boro / Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (BDD-MWCNT / Ti). O eletrodo foi aplicado com sucesso na oxidação eletroquímica simultânea de benserazida e L-dopa, que ocorre a 0,055 mV e 0,250 mV vs Ag / AgCl, respectivamente. As propriedades eletroquímicas e eletroanalíticas do eletrodo BDD-MWCNT / Ti foram investigadas por voltametria cíclica (VC), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), microscopia eletroquímica de varredura (SECM) e voltametria de pulso diferencial (VPD). O eletrodo apresentou menor potencial de eletro-oxidação para L-dopa e benserazida em 0,1 mol L⁻¹ de tampão de fosfato a pH 7,0 enquanto mantinha sua alta sensibilidade. Em condições otimizadas, o eletrodo BDD-MWCNT / Ti apresentou um intervalo de resposta linear de 40 µmol L⁻¹ a 400 µmol L⁻¹ para L-dopa e de 14 µmol L⁻¹ a 136 µmol L⁻¹ para benserazida. O limite de detecção do sensor proposto para L-dopa e benserazida foi de 18 µmol L⁻¹ e 1 µmol L⁻¹, respectivamente. O sensor foi aplicado com sucesso para a determinação seletiva de L-dopa e benserazida em amostras de urina.

Palavras-chave: Nanotubo de carbono / Nanodiamante dopado com boro, L-dopa, Benserazida, Sensor químico

ABSTRACT

The present work describes the simultaneous electroanalytical determination of benserazide and L-dopa on boron-doped diamond / Multi-Walled carbon nanotube electrode (BDD-MWCNT/Ti) electrode. The electrode has been successfully applied to simultaneous electrochemical oxidation of benserazide and L-dopa, which occurs at 0.150 mV and +0.600 mV *vs* Ag/AgCl, respectively. The electrochemical and electroanalytical properties of the BDD-MWCNT/Ti electrode were investigated by cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, scanning electrochemical microscopy, and differential pulse voltammetry. The electrode presented lower electrooxidation potential for both L-dopa and benserazide in 0.1 mol L⁻¹ of phosphate buffer at pH 7.0 while maintaining its high sensitivity. Under optimized conditions, the BDD-MWCNT/Ti electrode presents a linear response range from 40 μmol L⁻¹ to 400 μmol L⁻¹ for L-dopa and from 14 μmol L⁻¹ to 136 μmol L⁻¹ for benserazide. The limit of detection of the proposed sensor for L-dopa and benserazide were 18 μmol L⁻¹ and 1 μmol L⁻¹, respectively. The sensor has been successfully applied for selective determination of L-dopa and benserazide in urine samples and it is very promising for many electroanalytical applications.

Key words: Carbon nanotube, boron doped diamond, L-dopa, benserazide, chemical *sensor*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fórmula estrutural da L-dopa.....	21
Figura 2. Fórmula estrutural da benserazida	22
Figura 3. Representação esquemática de diferentes alótropos de carbono: fulereno; nanotubo de carbono de parede simples (SWCNT); nanotubo de carbono de parede múltipla (MWCNT); diamante; grafite; grafeno respectivamente.....	25
Figura 4. Representação esquemática da célula eletroquímica om três eletrodos.....	38
Figura 5. Curvas de aproximação obtidas por SECM para o eletrodo BDD-MWCNT/Ti em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) contendo 5 mmol L ⁻¹ [Fe (CN) ₆] ³⁻ . A ponta de prova foi polarizada em -200 mV e o substrato foi polarizado nos seguintes sobrepotenciais (1) 50, (2) 100, (3) 150, (4) 200 e (5) 250 mV vs Ag/AgCl. A Figura inserida mostra o gráfico do logaritmo natural da constante de velocidade aparente <i>versus</i> o sobrepotencial aplicado ao substrato obtido para o eletrodo BDD-MWCNT/Ti, eletrodo de carbono vítreo modificado MWCNT e o eletrodo de BDD. A linha mostra o ajuste da teoria Butler-Volmer aos dados obtidos empiricamente.....	45
Figura 6. Circuito equivalente de Randles.....	48
Figura 7. Diagrama de Nyquist para eletrodo BDD-MWCNT/Ti, eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT e eletrodo BDD em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo 5 mmol L ⁻¹ [Fe (CN) ₆] ³⁻	49
Figura 8. Voltamogramas cíclicos para eletrodo BDD-MWCNT/Ti, eletrodo MWCNT/CV e eletrodo BDD em solução tampão de fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) contendo 1 mmol L ⁻¹ de L-dopa e 1 mmol L ⁻¹ de benserazida.	50
Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura de compósito com ampliação diferente de (a) 3k × para (c) ~ 100k ×.	52
Figura 10. Espectros Raman do composto usando excitação verde (514 nm).	53
Figura 11. Influência da solução tampão na resposta voltamétrica do sensor BDD-MWCNT/Ti para L-dopa e benserazida. Medições realizadas em tampão 0,1 mol L ⁻¹ . A figura inserida à Figura 11 mostra a corrente de pico para L-dopa e benserazida em relação à natureza do tampão.	55
Figura 12. Influência do pH da solução tampão na resposta voltamétrica do sensor BDD-MWCNT/Ti para L-dopa e benserazida. A Figura inserida (A) à Figura 12 mostra o efeito do pH no potencial de pico de L-dopa e benserazida e a figura inserida (B) mostra o efeito do pH na corrente de pico de L-dopa e benserazida.....	57

Figura 13. Influência da concentração da solução tampão na resposta voltamétrica do sensor BDD-MWCNT/Ti para L-dopa e benserazida. Medições realizadas em tampão PBS 0,1 mol L ⁻¹ . A Figura inserida à Figura 13 mostra a corrente de pico para L-dopa e benserazida versus a concentração do tampão.....	58
Figura 14. Voltamogramas de pulso diferencial para soluções de L-dopa e benserazida obtidas em condições otimizadas. A relação entre as concentrações máximas de corrente e fármaco é mostrada na inserção (A) e inserção (B) para benserazida e L-dopa, respectivamente.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades desejadas a um bioeletrodo	30
Tabela 2. Resumo das vantagens e desvantagens de diferentes alótropos de carbono como materiais de eletrodo. Quadrado verde satisfaz os requisitos, quadro amarelo intermediário e vermelho não satisfaz os requisitos.	31
Tabela 3. Comparação dos limites de detecção (LD) obtidos pelo BDD-MWCNT / Ti proposto com outros eletrodos relatados na literatura para a determinação simultâneo de L-dopa e Bzd.	62
Tabela 4. Adição e recuperação de L-Dopa e Benserazida em amostras de urina (n = 3).	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	Microscópio de força atômica.
BDD.....	Diamante dopado com boro
BDD-MWCNT/Ti	Plataforma de titânio modificado com nanotubos de carbono, diamante dopado com boro.
BR.....	Britton-Robinson.
Bzd.....	[D, L-serina-2-(2, 3, 4 – trihidroxifenil) metil], Benserazida.
CQDs	Pontos quântico de carbono
CV.....	Carbono Vítreo.
CVD.....	<i>Chemical vapor deposition.</i>
DMF	Dimetilformamida.
DP	Doença de Parkinson.
DPR	Desvio padrão relativo.
DRX.....	Difração de raio X.
EIE.....	Espectroscopia de impedância eletroquímica.
EM	Eletrodos modificados.
IUPAC	<i>International union of pure and applied chemistry.</i>
LD.....	Limite de detecção.
L-DOPA	[3-(3,4-dihidroxifenil) -l-alanina], Levodopa.
MEV	Microscopia eletrônica de varredura.
MWCNTs	<i>Multi-Walled Nanotubes.</i>
NTCs.....	Nanotubos de carbono.
PBS.....	Tampão fosfato.

pHPotencial hidrogeniônico.

RPM.....Rotação por minuto.

SECMMicroscopia eletroquímica de varredura

SNC Sistema nervoso central.

SWCNTs.....*Single-Walled Nanotubes*.

VAMWCNTNanotubo de carbono de paredes múltiplas verticalmente alinhadas.

VC..... Voltametria cíclica.

VDP Voltametria de pulso diferencial.

LISTA DE EQUAÇÕES

$$Ni_T(L, R_g, \kappa) \sim Ni_T^{Cond}(L+1/k, R_g) + \frac{Ni_T^{Ins}(L, R_g)-1}{(1+2.47R_g^{0.31})(1+L^{0.006R_g+0.113}k^{-0.0236R_g+0.91})} \quad (1)$$

$$Ni_T^{Cond} \sim \alpha(R_g) + \frac{1}{\beta(R_g)} \frac{\pi}{4ArcTan(L)} + (1 - \alpha(R_g) - \frac{1}{2\beta(R_g)}) \frac{2}{\pi} ArcTan(L) \quad (2)$$

$$\alpha(R_g) \sim \ln(2) + \ln(2) \left(1 - \frac{2}{\pi} ArcCos\left(\frac{1}{R_g}\right)\right) - \ln(2) \left[1 - \left(\frac{2}{\pi} ArcCos\left(\frac{1}{R_g}\right)\right)^2\right] \quad (3)$$

$$\beta(R_g) \sim 1 + 0.639 \left(1 - \frac{2}{\pi} ArcCos\left(\frac{1}{R_g}\right)\right) - 0.186 \left[1 - \left(\frac{2}{\pi} ArcCos\left(\frac{1}{R_g}\right)\right)^2\right] \quad (4)$$

$$Ni_T^{Ins} \sim \left[\frac{2.08}{R_g^{0.358}} \left(L - \frac{0.145}{R_g}\right) + 1.585\right] \times \left[\frac{2.08}{R_g^{0.358}} (L - 0.0023R_g) + 1.57 + \frac{\ln(R_g)}{L} + \frac{2}{\pi R_g} \ln\left(1 + \frac{\pi R_g}{2L}\right)\right]^{-1} \quad (5)$$

$$k_{eff} = k^\circ \exp[(1 - \alpha)f(E_s - E^\circ)] \quad (6)$$

$$I / \mu A = 5.632 (\pm 2.241) + 0.598 (\pm 0.026) [Bzd / \mu mol L^{-1}] \text{ para a bzd} \quad (7)$$

$$I / \mu A = 7.236 (\pm 0.478) + 0.100 (\pm 0.002) [L-dopa / \mu mol L^{-1}] \text{ para a L-dopa} \quad (8)$$

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	Levodopa e benserazida: Características, importância e métodos de determinação.	21
2.2	Eletrodos Quimicamente e Fisicamente Modificados.....	24
2.3	Nanomateriais à base de carbono	25
2.4	Materiais híbridos de carbono: Características estruturais, síntese e propriedades.....	28
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo geral.....	35
3.2	Objetivos específicos.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Materiais e reagentes.....	37
4.2	Equipamentos	37
4.3	Procedimentos	38
	Preparo do eletrodo BDD-MWCNT / Ti.....	38
4.3.1	Eletrodos de trabalho.....	39
4.3.2	Otimização dos parâmetros operacionais	40
4.3.3	Otimização dos parâmetros operacionais	40
	4.3.3.1 Estudo do efeito do tipo de tampão empregado sobre a resposta eletroquímica dos analitos de interesse.....	40
	4.3.3.2 Estudo do efeito do pH da solução tampão	40
	4.3.3.3 Estudo do efeito da concentração do tampão	41
	4.3.3.4 Estudo da precisão.....	41
	4.3.3.5 Estudo do efeito de interferentes	41
	4.3.3.6 Aplicação em amostra biológica	41
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Caracterização eletroquímica dos eletrodos BDD-MWCNT/Ti, BDD e MWCNT/CV	44
5.4.5.2	Oxidação de L-dopa e benserazida sobre plataforma baseada em BDD-MWCNT / Ti.....	49
5.4.5.3	Caracterização Morfológica do eletrodo BDD-MWCNT/Ti	51
5.4.5.4	Otimização dos parâmetros eletroanalíticos.....	54
5.4.5.4	Estudo dos tipos de tampões (PBS, MacIlvaine, Britton-Robinson e Hapes).....	54
5.4.5.5	Efeito do pH	55
	Efeito da concentração	57
	Estudo de interferentes	58
	Caracterização analítica.....	59

5.5	Aplicação do BDD-MWCNT/Ti em amostras biológicas e testes de recuperação	62
6	CONCLUSÕES.....	65
7	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	67

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP), também conhecida como degeneração dos neurônios mesencefálicos dopaminérgicos, está associada à perda de dopamina no cérebro (ALEXANDER, 2004); (HOGLINGER *et al.*, 2004). Apesar do fato de que o nível de dopamina no cérebro é de alta importância para a saúde das pessoas, o neurotransmissor dopamina não pode ser administrado diretamente para o tratamento da doença de Parkinson porque não pode atravessar a barreira hematoencefálica (SHEN *et al.*, 2003; HOGLINGER *et al.*, 2004).

Deste modo, uma elevada atenção tem sido dada a L-dopa, um precursor intermediário de dopamina, uma vez que a mesma apresenta maior capacidade de entrar no sistema nervoso central (SHEN *et al.*, 2003). Embora a L-dopa seja um fármaco eficiente para o tratamento de sintomas da doença de parkinson, a maior quantidade administrada de L-dopa é convertida em dopamina na periferia dos lócus no qual deveria agir, fazendo com que apenas uma pequena quantidade de L-dopa adentre efetivamente no cérebro (GOODMAN-HILMAN *et al.* 1996).

A fim de evitar a decomposição rápida de L-dopa à dopamina no tecido periférico pela enzima descarboxilase, o fármaco L-dopa tem sido usualmente administrado combinado a um inibidor de dopa-descarboxilato tal como benserazida, a qual atua bloqueando a principal enzima metabolizadora de L-dopa (POLLERI *et al.* 1980). Por conseguinte, a benserazida aumenta a biodisponibilidade de L-dopa prolongando a resposta clínica do paciente em tratamento com a L-dopa e benserazida combinadas (GREENACRE *et al.*, 1976; KAAKKOLA *et al.*, 1994).

Assim, o interesse na determinação da benserazida e da L-dopa tem aumentado nos dias de hoje, tal que estes compostos têm sido simultaneamente determinados por eletroforese-quimiluminescência (HE *et al.*, 2006) cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LE PAN, *et al.* 2010), espectrofotometria (BLANCO *et al.*, 2000), sistemas eletroquímicos usando calibração multivariada (ZAPATA-URZÚA, *et al.* 2010) e ensaios quimilumimétrico com calibração multivariada (MARQUES *et al.*, 2008). Estes métodos são seletivos e sensíveis à determinação simultânea de benserazida e L-dopa, mas apresentam pelo menos uma das seguintes desvantagens: (1) são de execução demorada de forma a requer usuários com elevado nível de treinamento, e/ou (2) são dispendiosos e envolvem procedimentos complexos ou apresentam alto custo.

Portanto, a determinação simultânea de benserazida e L-dopa por métodos eletroquímicos sem o emprego de tratamento matemático de dados ainda é um tema de desafio, devido até o presente momento à ausência de uma abordagem eletroanalítica para sua determinação simultânea. Tal dificuldade atrelada à determinação simultânea de L-dopa e benserazida está associada a suas estruturas moleculares semelhantes resultando em sobreposição das respostas eletroquímicas quando são empregados os mais variados tipos de eletrodos. Neste sentido, a seguir serão apresentados e discutidos alguns dos materiais de carbono cujas aplicações tem se mostrado promissora no que tange o desenvolvimento de sensores químicos bem como a importância da L-dopa e benserazida.

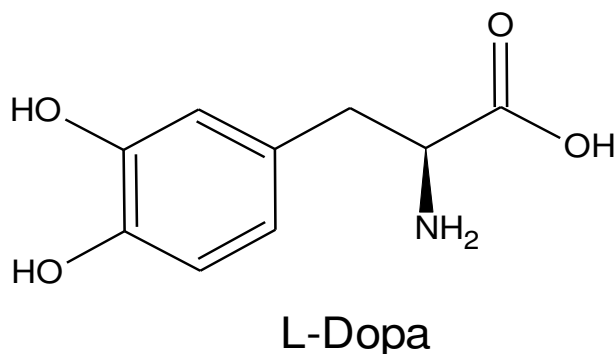
REFERENCIAL TEÓRICO

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Levodopa e benserazida: Características, importância e métodos de determinação.

A L-dopa [3-(3,4-Dihidroxifenil) - L-alanina] (Fig. 1), também conhecida como levodopa, é um importante neurotransmissor pertencente à classe das catecolaminas (SILVA *et al.*, 2006). A L-dopa foi utilizada pela primeira vez em 1967 no tratamento da doença de parkinson (DP). A DP é a segunda doença de caráter neurodegenerativa com maior ocorrência na população com idade acima dos 60 anos totalizando 3,3 % da população do Brasil. Com base neste aspecto, o desenvolvimento de métodos eficazes no combate e monitoramento da doença de parkinson é de suma importância (BARBOSA *et al.*, 2007; (MCCREERY, 2008).

Figura 1. Fórmula estrutural da L-dopa.



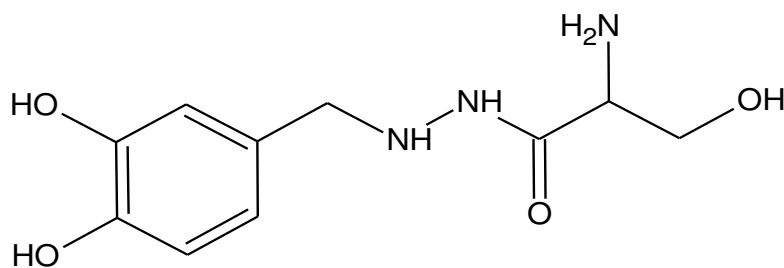
Fonte. Próprio autor

A doença de Parkinson (DP) está associada à perda de dopamina no cérebro (ALEXANDER, 2004; HOGLINGER *et al.*, 2004). A dopamina é uma importante substância que auxilia na comunicação entre as células no sistema nervoso central (SNC), de forma que o tratamento da doença de parkinson está pautado na reposição desta substância ao SNC de modo que o paciente não tenha danos mais graves (YAN *et al.*, 2011). Tendo em vista que a dopamina não chega molecularmente íntegra à região de atuação faz-se necessário a administração de um fármaco precursor como a L-dopa. Contudo, ao entrar em contato com o organismo, a L-dopa pode sofrer descarboxilação e se converte em dopamina antes de chegar ao SNC. Com o propósito de contornar essa dificuldade e minimizar os efeitos colaterais do uso da L-dopa, faz-se necessário o uso de inibidores concomitantemente ao uso da L-dopa (TAKAMURA, 2009; GEORGAKILAS *et al.*, 2012).

Uma vez que a L-dopa é administrada em pacientes, é fundamental o monitoramento de quão seguro e eficiente ela é. Partindo desta premissa, faz-se necessário o uso de várias técnicas que nos permitem identificar e quantificar este fármaco. Podemos encontrar diversos métodos e técnicas para a determinação da L-dopa incluindo-se a espectrofotometria no ultravioleta e visível (GHANEAN e AFJEH, 2018), a cromatografia líquida de alta eficiência (CHEN, D. Y. *et al.*, 2018) bem como mais recentemente os métodos eletroanalíticos (BARRAGAN *et al.*, 2018). Estes últimos métodos têm sua aplicabilidade à determinação de L-dopa devido a presença de grupos hidroxilas na sua estrutura ligados a um anel benzênico, indicando assim que esta substância é eletroativa a baixos potenciais elétricos sobre os mais variados tipos de eletrodos via sua eletro-oxidação (SILVA *et al.*, 2006).

A benserazida (Bzd) (D, L-serina-2-[2,3,4 (trihidroxifenil) metil] hidrazida) (Fig. 2) é um fármaco muito utilizado em conjunto com a levodopa para o tratamento clínico da doença de Parkinson uma vez que a dopamina não pode ser utilizada na sua forma pura para o tratamento da doença de Parkinson já que grande parte do medicamento não atravessa a barreira hematoencefálica (CHEN, H. *et al.*, 2018). A levodopa administrada por via oral converte-se em dopamina no cérebro pela ação da enzima descarboxilase. No entanto, a maior quantidade de levodopa é convertida em dopamina no tecido periférico e uma pequena quantidade de levodopa entra no cérebro (HERZ *et al.*, 2016). Dentre os aspectos positivos no emprego de fármacos combinados de L-dopa e benserazida está a menor quantidade necessária de L-dopa nos medicamentos propostos, o que tem permitido a minimização de efeitos colaterais (AJAYAN, 1999; FOULADGAR, 2016; KAROUSIS *et al.*, 2016).

Figura 2. Fórmula estrutural da benserazida



Benserazida

Fonte. Próprio autor

Assim como observado para a L-dopa, existem diversos métodos para a determinação individual da benserazida em formulações farmacêuticas. Dentre os métodos existentes podemos citar os métodos eletroforéticos (ATA *et al.*, 2018), espectrofotométricos (ALULA *et al.*, 2018), baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (CHEN, D. Y. *et al.*, 2018), quimiluminescentes e métodos eletroanalíticos (AJAYAN, 1999; GEORGAKILAS *et al.*, 2015). Dentre os métodos citados anteriormente, os métodos eletroanalíticos tem recebido grande atenção devido a sua alta sensibilidade, baixo custo, precisão, exatidão, fácil manuseio e etc. (MCCREERY, 2008; TAKAMURA, 2009).

Por sua vez, a determinação simultânea de L-dopa e benserazida tem sido explorada em menor extensão do que a determinação individual destas espécies. Até a presente data foram relatados métodos baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (SAGAR e SMYTH, 2000), espectrofotometria (DAMIANI *et al.*, 2005), e eletroforese capilar-quimiluminescência (HE *et al.*, 2007) para a determinação simultânea de levodopa e benserazida em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos.

No entanto, esses métodos ainda sofrem com algumas desvantagens como: alto custo instrumental, necessidade de grande número de etapas preparativas, baixa sensibilidade, necessitam de solventes orgânicos, dentre outras. Como a benserazida e a L-dopa apresentam grupos eletroativos que podem ser oxidados, o uso de técnicas eletroquímicas tem se tornado promissoras para a caracterização e determinação da levodopa e benserazida (ZAPATA-URZÚA *et al.*, 2010). No entanto, até a presente data não foram propostas metodologias eletroquímicas que não exijam procedimentos adicionais para a determinação simultânea desses compostos, o que está diretamente atrelado às características estruturais e respostas eletroquímicas semelhantes que estas moléculas apresentam sobre os mais variados materiais usados para a confecção de eletrodos.

Dentre as alternativas promissoras aplicáveis à determinação de substâncias empregando métodos eletroanalíticos, destacam-se os eletrodos quimicamente modificados (ZAPATA-URZÚA *et al.*, 2010). Os eletrodos modificados (EM) têm recebido enorme atenção desde 1979 devido à sua elevada sensibilidade e seletividade aos analitos de interesse em comparação aos eletrodos não-modificados. Adicionalmente, a oxidação de inúmeras espécies sobre a superfície de eletrodos convencionais (Au, Pt e eletrodo de carbono vítreo) ocorre em elevados potenciais e produz baixas densidades de corrente devido à baixa taxa de transferência de elétrons (ZHENG *et al.*, 2017).

Segundo Palakollu e colaboradores (2017), a maioria dos eletrodos convencionais apresenta uma taxa de transferência de elétrons lenta para a determinação da L-dopa. Além disso, o produto de oxidação da L-dopa também adsorve gradualmente sobre a superfície dos eletrodos não-modificados.

Portanto, a determinação eletroquímica da L-dopa na presença de interferentes é muito difícil sobre os materiais de eletrodo convencionais. Além disso, os eletrodos convencionais apresentam baixa seletividade e reprodutibilidade para esse tipo de analito. Para superar este problema, a modificação da superfície de eletrodos com materiais catalíticos é um dos melhores conceitos na área de métodos aplicáveis à eletroanalítica.

De forma geral, a modificação dos eletrodos corrige várias desvantagens comumente observadas nos eletrodos convencionais tal que age em favor da diminuição do potencial de oxirredução necessário e a facilitação da transferência de elétrons nos sistemas que envolvem reações redox. Atualmente, diferentes tipos de materiais, incluindo polímeros condutores nanoestruturados modificados com óxido de cobre (SHEIKH-MOHSENI *et.al*, 2016), nanobastões de óxido de zinco (ZnO) (MOLAAKBARI *et al.*, 2014), nanocompósitos à base de óxido de grafeno e óxido de zinco (GO/ZnO) (BEITOLLAHI *et.al*, 2016), poli (cloridrato de alilamina) (TAKEDA *et al.*, 2016), nanopartículas de ouro e de paládio (REZAEI *et al.*, 2016), entre outros, foram utilizados para a quantificação de L-dopa e da benserazida.

Deste modo, o grande avanço no desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados tem contribuído imensamente com o desenvolvimento de dispositivos integrados, como é o exemplo da classe dos sensores químicos. Nas últimas décadas as pesquisas voltadas ao desenvolvimento de eletrodos quimicamente ou fisicamente modificados vêm crescendo de forma acelerada devido à vasta aplicação destes dispositivos na área da saúde, indústria e ambiental. Dentre as características desejáveis a estes sistemas analíticos destacam-se a elevada sensibilidade, seletividade e estabilidade (KIZEK, *et al* 2012).

2.2 Eletrodos Quimicamente e Fisicamente Modificados

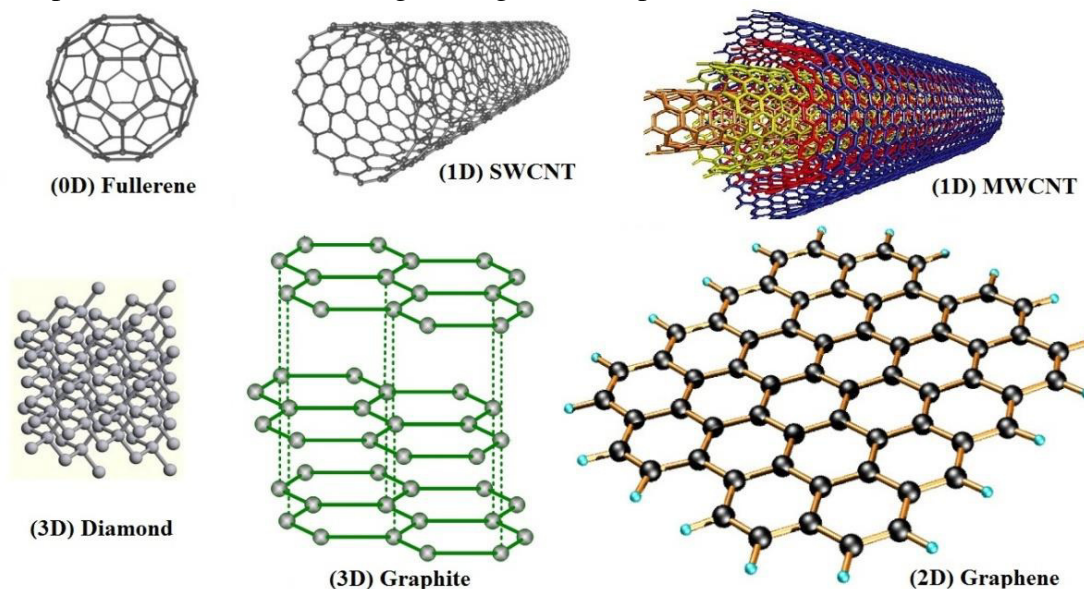
A modificação de eletrodos com fins eletroanalíticos remonta dos anos 70 e tem sido realizada de duas principais formas: quimicamente e fisicamente (MURRAY *et al.*, 1987). Desde então, a comunidade científica mundial tem dedicado um grande interesse ao desenvolvimento de eletrodos modificados explorando os mais variados materiais. Com consequência observou-se um grande interesse na aplicação de nanomateriais de

carbono tem sido crescente no que tange o desenvolvimento de eletrodos modificados tendo em vista que estes materiais apresentam propriedades únicas, incluindo elevada razão área/volume, alta condutividade, baixa resistência à transferência de carga e baixo custo. (GREENSHIELDS. 2011). A seguir é apresentada uma breve abordagem de aspectos importantes associados à descoberta, propriedades e aplicações em eletroanálise destes materiais.

2.3 Nanomateriais à base de carbono

O carbono é um dos elementos mais abundantes do universo, sendo este a base para a formação de uma variedade de compostos tanto orgânicos quanto inorgânicos. Essas formações só são possíveis tendo em vista algumas características inerentes a este elemento tais como seus tipos de hibridização (sp , sp^2 e sp^3) que permitem que o mesmo possa se organizar de diversas formas estruturais (Fig 3) (GEORGAKILAS *et al.*, 2015). Por muito tempo achava-se que o diamante e o grafite eram as únicas formas alotrópicas do carbono, porém em 1985 Kroto e colaboradores descobriram uma nova forma alotrópica de carbono denominada de fulereno (SALVADORI, *et al.*, 2008).

Figura 3. Representação esquemática de diferentes alotropos de carbono: fulereno; nanotubo de carbono de parede simples (SWCNT); nanotubo de carbono de parede múltipla (MWCNT); diamante; grafite; grafeno respectivamente.



Fonte: (Zarbin, 2013; Atta et al., 2015)

A partir dos anos 60 até a década de 80 houve uma predominância no uso de eletrodos de grafite dentre os materiais de carbono para o desenvolvimento de sistemas

eletroanalíticos (BARENDRECHT, 1961; ELVING e SMITH, 1960). Na década seguinte, o uso do carbono vítreo e o diamante dopado com boro foram introduzidos e, tendo em vista o baixo custo do carbono vítreo, estes passaram a ser extremamente empregados no desenvolvimento de sensores químicos e eletrodos modificados (MURRAY, 1980). Por sua vez, as propriedades únicas do eletrodo de diamante dopado com boro o tornaram um grande atrativo no desenvolvimento de sistemas eletroanalíticos (SWAIN e RAMESHAM, 1993). Os eletrodos de diamante possuem uma baixa capacitância de dupla camada (ZANIN *et al.*, 2014) e uma resistência de polarização relativamente alta para a oxidação da superfície de forma que os mesmos podem ser empregados para a oxidação de espécies em potenciais relativamente altos se comparados ao grafite pirolítico e carbono vítreo.

A descoberta dos fulerenos por Kroto e Smalley em 1985 estimulou o interesse de diversos pesquisadores ao redor do mundo e houve início a uma corrida em busca da descoberta e entendimento das propriedades desse novo alótropo de carbono. Esta busca de conhecimento científico na fronteira do conhecimento referente a estes materiais teve como um dos ápices a publicação de lijima em 1991 referente à descoberta dos nanotubos de carbonos, o que revolucionou o que se conhecia sobre o carbono.

Os nanotubos de carbono (NTCs) são nanoestruturas à base de carbono que podem apresentar formações de paredes únicas (SWCNTs), ou de paredes múltiplas (MWCNTs) (Fig. 3) e no geral são formados por folhas de grafeno enrolados em forma de cilindros. Essas estruturas em geral apresentam dimensões abaixo de 100 nm (CAPEK, 2009). Segundo a literatura, uma das classes mais promissoras dos nanomateriais é representada pelos nanotubos de carbono. Uma vez que estes materiais demonstraram possuir propriedades eletrônicas, térmicas e mecânicas superiores para aplicações em várias áreas.

Deste modo, os nanomateriais a base de carbono tem sido cada vez mais utilizados na confecção de diferentes dispositivos como: emissores de elétrons para motores (SURIANI *et al.*, 2015), sensores de gases (KORPOSH *et al.*, 2018) e sensores biológicos (LIU, W. L. *et al.*, 2018), pontas para microscópio de força atômica (AFM) dentre outras (FILHO, A.G.S. 2007; BUSSY *et al.*, 2013). Os nanomateriais à base de carbono fornecem os blocos de construção necessários para circuitos eletrônicos e oferecem novas oportunidades para a miniaturização de chips, para as tecnologias de semicondutores e a fabricação de dispositivos, incluindo transistores e sensores. Além disso, são materiais ideais para a preparação de dispositivos nanoeletrônicos e

nanosensores devido às propriedades elétricas únicas, excelentes propriedades electrocatalíticas, alta estabilidade química e maior área superficial específica dos nanotubos (CAPEK, 2009).

Os avanços nos estudos sobre os nanomateriais de carbono resultaram em uma nova classe de nanomateriais, denominada de pontos quânticos de carbono (CQDs). Os pontos quânticos de carbono (CQDs, do inglês *carbon quantum dots*) tratam-se classe de nanomateriais de carbono com tamanhos próximos a 10 nm, cuja descoberta foi feita durante a purificação de nanotubos de carbono de parede única através da eletroforese em 2004 (LI *et al.*, 2012). No geral os CQDs apresentam diversas características atrativas incluindo elevada condutividade elétrica, alta estabilidade química, compatibilidade ambiental, absorção óptica de banda larga, baixa toxicidade, forte fotoluminescência e propriedades ópticas, além de apresentarem baixo custo (NAMDARI *et al.*, 2017).

Posteriormente, em 2010, Novoselov e Geim isolaram pela primeira vez o grafeno de forma a abrir uma nova perspectiva no uso de materiais à base de carbono. Idealmente, o grafeno consiste em uma folha planar de átomo de carbono sp^2 (Fig 3) de forma a apresentar uma razão área superficial / volume extremamente alta tendo em vista que ambos os lados do sistema planar estão disponíveis. De forma similar aos nanotubos de carbono, os materiais à base de grafeno possuem excelentes propriedades eletrônicas, mecânicas, elétricas e ópticas e uma superfície “quimicamente ajustável” que os tornaram atraentes candidatos para diversas aplicações, que vão desde os compósitos e a eletrônica até a nanomedicina (BUSSY *et al.*, 2013).

Consequentemente, as descobertas dos fulerenos, nanotubos de carbono, grafeno e pontos quânticos de carbono têm aberto uma nova era no que tange aplicações de nanomateriais de carbono e dentre estes os nanotubos de carbono e o grafeno têm sido os mais explorados em aplicações eletroquímicas até então. Segundo a plataforma de pesquisa *web of science*, no período compreendido entre 2007 e 2016 foram publicados 722 artigos a respeito dos nanotubo de carbono e do grafeno enquanto que, no mesmo período, foram encontrados apenas 2 artigos a respeito dos fulereno e pontos quânticos de carbono (Destacando aqui, que só foram contabilizados os nanomateriais (citados anteriormente, utilizados para aplicações eletroquímicas).

Estas duas nanoestruturas à base de carbono apresentam propriedades e características estruturais que são extremamente desejáveis para aplicações electroanalíticas tais como excelente processabilidade química, grande número de grupos em suas superfícies, grande exposição de planos edge e basais, elevada razão

área/volume, vários métodos de síntese e purificação, entre outras (CHEN *et al.*, 2012). Contudo, as aplicações de nanotubos de carbono e o grafeno ao desenvolvimento de plataformas para determinação de compostos de interesse em geral são feitas de forma que os nanomateriais originalmente produzidos sofrem extensiva aglomeração de forma a terem suas propriedades eletroquímicas e eletroanalíticas suprimidas (PENG *et al.*, 2012). Adicionalmente, os materiais de carbono previamente descritos apresentam cada um deles propriedades que são únicas e características de suas estruturas de forma que a combinação destes materiais aparece como uma atrativa forma produzir sistemas de maior performance eletroanalítica.

O desenvolvimento de novas estruturas à base de nanomateriais de carbono para aplicações no desenvolvimento de sistemas eletroanalíticos tem sido crescente, embora ainda muito pouco explorado. Partindo desta premissa, a seguir são apresentadas as características estruturais, métodos de síntese e propriedades de materiais híbridos nanoestruturados e organizados à base de carbono.

2.4 Materiais híbridos de carbono: Características estruturais, síntese e propriedades.

Os nanomateriais baseados na integração de nanotubos de carbono e alguns outros compostos têm recebido recentemente um grande destaque na comunidade científica uma vez que as propriedades observadas individualmente nestes materiais são, em geral, melhoradas como resultado do sinergismo entre eles. Dentre os aspectos citados acima podemos citar os polímeros condutores, mediadores redox e nanopartículas metálicas que tem sido integrados aos nanotubos de carbono (CAPEK, 2009).

Essas nanoestruturas compostas podem ser usadas para a construção de eletrônicos e nanodispositivos, pois os revestimento de materiais de carbono com materiais orgânicos, metálicos e os próprios alótropos de carbono podem otimizar as propriedades destes materiais (CAPEK, 2009). Apesar dos alótropos do carbono, de modo individual, apresentarem muitas vantagens em seu uso no que tange a determinação de vários analitos e terem boa estabilidade, ainda existe algumas limitações atreladas a esse tipo de material.

Partindo destas limitações vários pesquisadores vêm tentando combinar de forma controlada diferentes alótropos de carbono para obter as propriedades desejadas às suas aplicações (SAINIO *et al.*, 2015). A estratégia por trás da criação desses materiais híbridos é integrar as espécies constituintes mediante a utilização de diversos processos

de crescimento. Assim sendo, uma simples pipetagem de solução aquosa de NTCs em cima do eletrodo de carbono vítreo não necessariamente pode produzir materiais híbridos de carbono (LAURILA *et al.*, 2017).

Segundo Laurila e colaboradores (2017) existem algumas características e requisitos que os materiais devem cumprir para serem usados como sensores e biossensores. Na tabela 1 são mostrados alguns desses requisitos. Por sua vez, para fins comparativos são apresentadas algumas características comumente observadas para os alótropos de carbono (Tabela 2).

Tabela 1. Propriedades desejadas a um bioeletrodo

Propriedade física ou química	Características desejáveis
Revestimento duro, denso e uniforme	Quimicamente inerte e livre de poros
Pequena rugosidade superficial	Relação sinal/ruído elevada e pequena capacitância a dupla camada
Robustez mecânica	Os eletrodos são implantáveis
Sítios ativos de superfície	Transferência de elétrons facilitada nesses sítios
Alta condutividade	A transferência de elétrons através do eletrodo deve ser fácil
Biocompatibilidade	Não causem reações como corpo estranho e sejam resistentes à bioincrustação
Resistência à corrosão	Não liberem produtos de dissolução ou lixiviação no organismo
Padronização	Possibilidade de fabricar estruturas de superfície sob medida

Fonte: (LAURILA *et al.*, 2017)

Tabela 2. Resumo das vantagens e desvantagens de diferentes alótropos de carbono como materiais de eletrodo. Quadrado verde satisfaz os requisitos, quadro amarelo intermediário e vermelho não satisfaz os requisitos.

Propriedade física ou química	DLC	Grafeno	CNT	BDD	Fibra de carbono
Revestimento duro, denso e uniforme	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde
Pequena rugosidade superficial	Verde	Verde	Vermelho	Amarelo	Vermelho
Robustez mecânica	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde
Sítios ativos de superfície	Vermelho	Vermelho	Verde	Amarelo	Amarelo
Alta condutividade elétrica	Vermelho	Verde	Verde	Amarelo	Verde
Biocompatibilidade	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Amarelo
Resistência à corrosão	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Verde
Padronização	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Vermelho

*BDD-Diamante dopado com boro, *CNT-Nanotubo de carbono, *DLC-Filmes finos de carbono com diamantes

Fonte: (LAURILA *et al.*, 2017)

Como se pode observar na tabela 2, nenhum dos alótropos pode satisfazer simultaneamente todos os requisitos listados na Tabela 1. Entretanto, se analisarmos a

lista de propriedades nas tabelas, sempre há um alótropo de carbono que atende algumas das propriedades listadas. Deste modo ao se combinar diferentes alótropos de carbono podemos obter materiais híbridos que ofereçam todas as propriedades desejadas (SAINIO, PALOMÄKI, RHODE, *et al.*, 2015; SAINIO, PALOMÄKI, TUJUNEN, *et al.*, 2015).

Com o intuito de produzir materiais híbridos à base de carbono vários estudos têm sido focados na síntese destes nanocompósitos. Zhang e colaboradores (2015) relataram em seus estudos que uma diversidade de pesquisadores em todo o mundo vem tentando sintetizar vários tipos de materiais híbridos a base de carbono pelo método de crescimento do nanotubo e oxido de grafeno pelo método de deposição química de vapor (CVD) (TAI *et al.*, 2018), oxirredução do grafite (ROZMANOWSKI e KRAWCZYK, 2018), dentre outros. Dentre os métodos citados anteriormente, a técnica de deposição química de vapor (CVD do inglês *chemical vapor deposition*) é a mais utilizada para a preparação de materiais híbridos em laboratório e na indústria devido à mesma apresentar uma série de vantagens que não são observadas nas outras técnicas incluindo o baixo custo na produção em larga escala (PLESKOV *et al.*, 2016). Como é relatado em vários trabalhos, o método de produção dos materiais híbridos influencia diretamente nas propriedades do mesmo incluindo a alta qualidade no que tange pureza, propriedades condutoras e estabilidade (ZHANG *et al.*, 2015).

Em geral, existe vários materiais híbridos a base de carbono como por exemplo, os nanotubo de carbono com os metais de transições (NOSEK *et al.*, 2018), os nanotubos de carbono com materiais orgânicos ou inorgânicos (LIU, Z. Y. *et al.*, 2018) e os híbridos de carbono com diferente alótropos de carbono (SANTOS *et al.*, 2017). Dentro desta última classificação podemos destacar os seguintes híbridos: Grafeno / Nanotubo de carbono (GRAFENO / MWCNT), Filmes finos de carbono com diamantes / Nanotubo de carbono (DLC / MWCNT) dentre outros. Estes materiais são classificados como promissores para aplicações em diversas áreas, dando destaque neste trabalho para as aplicações eletroanalíticas.

Para à aplicação eletroanalítica os sensores híbridos de alótropos de carbono em geral apresentam as seguintes características, (i) um dos alótropos se comporta como um substrato biocompatível e inerte, enquanto que o outro, (ii) apresenta propriedades mais eletroquimicamente ativas. Ao integrar estas duas formas de carbono de maneira controlada, podemos garantir que as interações elétricas e mecânicas entres os alótropos será firme e estável para à aplicação desejável. Além disso, a geometria da estrutura

resultante poderá favorecer o aumento da sensibilidade para o analito desejado (LAURILA *et al.*, 2017).

Como relatou Sainio e colaboradores (2015) em seu estudo, os eletrodos à base de carbono híbrido em geral apresentam uma larga faixa de potencial e um excelente favorecimento da cinética de transferência de elétrons, deste modo permitindo a análise eletroquímica eficiente de alguns compostos como por exemplo a dopamina. Além disso, os eletrodos híbridos são capazes de facilmente distinguir os picos de oxidação do ácido ascórbico e da dopamina tornando os eletrodos candidatos promissores para aplicações bioquímicas.

Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo geral, aplicar um eletrodo híbrido de carbono para a determinação simultânea de benserazida e L-dopa por voltametria de pulso diferencial explorando uma plataforma de titânio modificado com nanotubos de carbono / nanodiamante dopado com boro (BDD-MWCNT/Ti).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar simultaneamente benserazida e L-dopa por voltametria de pulso diferencial explorando uma plataforma de titânio modificada com nanotubos de carbono e nanodiamantes dopado com boro (BDD-MWCNT/Ti).

3.2 Objetivos específicos

- Analisar o comportamento eletroquímico do eletrodo de BDD-MWCNT/Ti por voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria de pulso diferencial frente à benserazida e L-dopa;
- Estudar a influência dos tipos de tampões, concentrações, pH e velocidade de varredura sobre o comportamento eletroquímico dos analitos sobre o eletrodo de BDD-MWCNT / Ti e estudo das concentrações;
- Avaliar a viabilidade da determinação simultânea dos dois analitos estudados sem que haja interferência da resposta de um dos analitos sobre o outro empregando o eletrodo de BDD-MWCNT/Ti;
- Avaliar a determinação simultânea dos dois analitos de interesse frente aos interferentes: ácido ascórbico, ácido úrico, ácido fólico, ácido barbitúrico, ureia e glicose;
- Determinação da L-dopa e benserazida em amostra de urina.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e reagentes

Todos os reagentes utilizados para realizar as experiências apresentadas neste trabalho foram de grau analítico e utilizados como recebidos sem que fossem aplicadas etapas de purificação adicionais. Benserazida, ferricianeto de potássio e L-dopa foram adquiridos a Sigma-Aldrich. Fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, cloreto de potássio, sulfato de sódio, hidróxido de sódio, ácido clorídrico e hidróxido de sódio foram adquiridos da Vetec Química Fina LTDA (Brasil). Todas as soluções foram preparadas com água purificada em um sistema OS100LXE da GEHAKA Company (Gehaka Ltd. São Paulo, SP, Brasil).

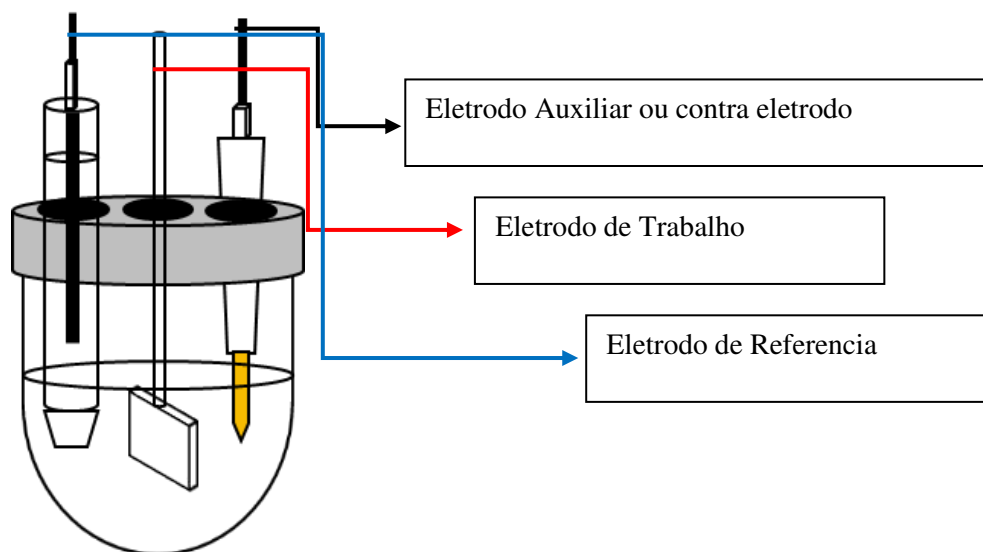
4.2 Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram feitas utilizando-se um potenciostato/galvanostato Autolab[®] modelo PGSTAT 128N da *Eco Chemie* (Utrecht, Netherlands) integrado a um microcomputador que possui uma interface contendo o *software* GPES 4.9 para controle dos parâmetros na realização dos experimentos bem como para a aquisição de dados. As respostas eletroquímicas de corrente de pico e potenciais elétricos aplicados foram obtidas através das técnicas de voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VDP) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

O pH das soluções tampões foram medidos utilizando-se um medidor de pH modelo DM-20 (Digimed, São Paulo, Brasil). Na determinação da massa, no preparo das soluções, foi utilizada uma balança analítica com precisão de 0,1 mg, modelo AY220 (Marte, Santa Rita do Sapucaí/MG, Brasil).

Usou-se também uma célula eletroquímica de vidro com um volume de 10 mL com uma tampa de teflon que apresenta três aberturas, por onde são inseridos os eletrodos utilizados na pesquisa, eletrodos estes que são: Eletrodo de trabalho (carbono vítreo modificado com nanotubo de carbono de paredes múltiplas, diamante dopado com boro (BDD) e titânio modificado com nanotubos de carbono/nanodiamante dopado com boro (BDD-MWCNT/Ti)), Eletrodo de Referência (prata cloreto de prata Ag/AgCl (KCl saturado)) e o Eletrodo Auxiliar (ouro (Au)) (Fig. 4).

Figura 4. Representação esquemática da célula eletroquímica com três eletrodos



Fonte. Próprio autor

4.3 Procedimentos

Preparo do eletrodo BDD-MWCNT / Ti

4.3.1

As placas de BDD-MWCNT/Ti foram preparados em duas etapas. Na primeira etapa, nanotubos de carbono de paredes múltiplas foram crescidos de forma alinhada verticalmente (VAMWCNT) sobre substratos de titânio seguindo o procedimento descrito por (ZANIN *et al.*, 2014). Resumidamente, os filmes VAMWCNT foram produzidos usando a tecnologia CVD assistido por plasma de micro-ondas (SILVA, et al. 2014) em substrato de titânio (Ti) previamente cobertos com uma camada de Ni de 10 nm. Após um processo de redução sob aquecimento, a camada de Ni forma nanopartículas que promovem o crescimento do material de carbono. O crescimento dos VAMWCNT foi realizado durante 1 min sob fluxo de CH_4 a 14 sccm, 800 °C e uma pressão do reator de 30 torr.

Após a etapa de crescimento, as amostras de VAMWCNT foram então submetidas à eletro-pulverização com uma suspensão de nanodiamantes de 5 nm de diâmetro em metanol, o que fez com que os nanotubos previamente alinhados formassem microestruturas com suas pontas unidas produzindo microestruturas tridimensionais (3D). O material modificado com os nanodiamantes foram submetidos a um reator de filamento quente usando 5% de CH_4/H_2 com diborano (B_2H_6) como fonte de boro, fazendo com que a microestrutura fosse revestida com uma camada fina (0,25 μm) de cristais de BDD.

Ressalta-se que a síntese citada anteriormente, juntamente com as caracterizações apresentadas foram realizadas junto ao grupo de pesquisa do Professor Dr Hudson Zanin, professor este que colaborou de forma efetiva para o desenvolvimento do presente trabalho.

Eletrodos de trabalho

4.3.2 As placas de (BDD-MWCNT/Ti), cedidas pelo Professor Hudson Zanin, foram adaptadas de modo que as mesmas pudessem ser utilizadas como eletrodo de trabalho. Para fins de comparação preparou-se uma dispersão de nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) constituída de 2 mg de MWCNT disperso em 500 μ L de dimetilformamida (DMF) e este, por sua vez, foi depositado sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo (CV) (10 μ L). Adicionalmente foi adquirido um eletrodo comercial de diamante dopado com boro (BDD) também com fins comparativos. Após a definição dos três eletrodos de trabalho deu-se início aos estudos para a determinação do melhor eletrodo de trabalho.

Montou-se a célula eletroquímica (Fig 4) constituída com os seguintes eletrodos: eletrodo de trabalho (eletrodos de carbono vítreo com sua superfície recoberta com nanotubo de carbono de paredes múltiplas, eletrodo de BDD-MWCNT/Ti ou diamante dopado com boro e o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)), um eletrodo de referência de prata cloreto de prata (Ag/AgCl) e um eletrodo auxiliar de ouro (Au).

Para as medidas eletroquímicas de avaliação cinética eletrônica e avaliação de resposta eletroquímica foram utilizadas soluções de ferricianeto de potássio ($K_3 [Fe(CN)_6]$). Para tal foi utilizado um bipotenciostato Autolab modelo PGSTAT 128N equipado com modulo analisador de resposta em frequência para a realização dos estudos de voltametria cíclica e impedância eletroquímica. Para os estudos de microscopia eletroquímica de varredura, o bipotenciostato foi acoplado ao sistema de posicionamento da Sensolytics (Bochum, Alemanha).

Os estudos de voltametria cíclica foram realizados à diferentes velocidades de varredura: 10 mV, 25 mV, 50 mV, 75 mV, 100 mV, 150 mV e 200 mV. As medidas de impedância eletroquímica foram realizadas no intervalo de frequência compreendido entre 10^5 e 10^{-2} Hz e o potencial *dc* foi calculado com base nos dados provenientes dos ensaios de voltametria cíclica.

Otimização dos parâmetros operacionais

4.3.3.1 Estudo do efeito do tipo de tampão empregado sobre a resposta eletroquímica dos analitos de interesse.

4.3.3 Inicialmente, foram feitos os cálculos necessários para o preparo das referidas soluções tampão de posse das referidas massas e estas por sua vez foram dissolvidas em 50 mL de água destilada de forma a preparar-se todos os tampões na concentração 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,0 (PBS, Britton-Robinson, Hepes e McIlvane). Posterior ao preparo dos tampões, montou-se uma célula eletroquímica (Fig 6) que foi apropriadamente conectada ao potenciostato e devidamente preenchida com os tampões para a realização dos estudos de voltametria de pulso diferencial (VPD).

Os ensaios eletroquímicos de VPD foram realizados para os tampões PBS, Hepes, McIlvane e Britton-Robinson no intervalo de potencial aplicado ao eletrodo de trabalho entre -300 mV e +300 mV. Previamente aos ensaios eletroquímicos adicionou-se 50 µl e 100 µl de soluções *stock* de benserazida e L-dopa na concentração de 1 mmol L⁻¹ e posteriormente foram feitas as respectivas análises eletroquímicas com à aplicação da técnica de voltametria de pulso diferencial (VDP).

4.3.3.2 Estudo do efeito do pH da solução tampão

Para desenvolver esta etapa da pesquisa, inicialmente foram feitos cálculos com o intuito de determinar as massas que seriam necessárias na formulação das soluções de benserazida e L-dopa bem como dos sais para o preparo dos tampões em diferentes valores de pH. Após a pesagem das espécies de interesse, as mesmas foram dissolvidas em soluções tampão fosfato (PBS) 0,1 mol L⁻¹ em diferentes valores de pH (5,0, 6,0, 7,0 e 8,0) para a realização dos estudos necessários.

A seguir, a célula eletroquímica de 10 mL e portando três eletrodos foi montada empregando-se um eletrodo de referência de Ag/AgCl, um eletrodo auxiliar de ouro (Au) e o eletrodo de trabalho (BDD-MWCNT/Ti) acoplado. O procedimento para o estudo do efeito do pH das soluções tampão sobre a resposta eletroquímica dos analitos de interesse foi realizado da seguinte forma: adicionou-se 5 ml da solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (foram testados os diferentes tampões de diferentes valores de pH) na célula eletroquímica e posteriormente a esta adição foi adicionada mais 50 µl de benserazida e 100 µl L-dopa nas concentrações apropriadas e, após montado todo o sistema eletroquímico, deu-se início ao estudo de voltametria de pulso diferencial.

4.3.3.3 Estudo do efeito da concentração do tampão

Após os cálculos para a produção dos tampões fosfato em diferentes concentrações ($0,025 \text{ mol L}^{-1}$, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$), o sistema eletroquímico foi montado empregando-se uma célula de 10 mL e 3 (três) eletrodos. Os eletrodos utilizados foram: eletrodo de referência (Ag/AgCl), eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho (BDD/MWCNT/Ti) acoplado a um potenciostato e controlado por um microcomputador. Por fim, adicionou-se 5 mL da solução tampão PBS pH 7,0 (uma concentração por vez) na célula, 50 μl de benserazida e 100 μl de L-dopa e deu-se início ao estudo de voltametria de pulso diferencial.

4.3.3.4 Estudo da precisão

Para desenvolver esta etapa da pesquisa, inicialmente foram feitos cálculos com o intuito de determinar as massas que seriam necessárias na formulação da solução de benserazida e L-dopa de modo que suas concentrações finais de cada analito fossem $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. O procedimento envolvido nos ensaios seguiu as seguintes etapas: (1) adicionou-se 5 mL de uma solução tampão PBS de pH 7,0 a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; (2) adicionou-se uma alíquota de 50 μL e 100 μL de benserazida e L-Dopa, respectivamente na concentração de 1 mmol L^{-1} ; (3) montagem do conjunto eletroquímico junto ao potenciostato; (4) realizou-se os estudos eletroquímicos empregando-se a técnica de voltametria de pulso diferencial; (5) repetiu-se as etapas citadas acima num intervalo de 10 (dez) dias seguidos com aquisição de dez medidas diariamente.

4.3.3.5 Estudo do efeito de interferentes

Para o desenvolvimento desta etapa os interferentes testados foram o ácido ascórbico, ácido barbitúrico, ácido fólico, ureia, glicose e ácido úrico tendo em vista que estão frequentemente presentes em amostras de urina. Foram preparadas soluções dos interferentes em concentrações 10 (dez) vezes superiores às concentrações dos analitos benserazida e L-dopa. Após o preparo das soluções citadas acima e a montagem do sistema eletroquímico deu-se início ao estudo de voltametria de pulso diferencial. Repetiu-se o procedimento individualmente para cada um dos 6 interferentes.

4.3.3.6 Aplicação em amostra biológica

Esta etapa foi realizada mediante o recolhimento de uma certa quantidade de urina em tubos de plásticos com o propósito de se realizar um pré-tratamento na amostra.

O pré-tratamento da amostra seguiu as seguintes etapas: (1) aos tubos contendo a urina foi adicionado ácido clorídrico (HCl) na concentração de 6 mol L^{-1} de modo que formasse soluções com 1% de HCl; (2) após as amostras serem acidificadas as mesmas foram centrifugadas por 30 minutos a 2500 rpm e (3) posteriormente ao processo de centrifugação, filtrou-se o sobrenadante e em seguida diluiu-se a amostra 10 vezes com uma solução tampão fosfato (pH 7,0) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A solução formada foi transferida para uma célula eletroquímica para ser analisada. Procedeu-se com as seguintes etapas:

- Primeiramente adicionou-se 4,25 mL da solução tampão PBS;
- Em seguida adicionou-se 0,5 mL da amostra;
- E, por afim, adicionou-se quantidades apropriadas de L-dopa e benserazida à amostras.

Após a primeira adição do analito, realizou-se a primeira varredura de voltametria de pulso diferencial e então foram conduzidas adições sucessivas do analito com o propósito de produzir as adições de padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

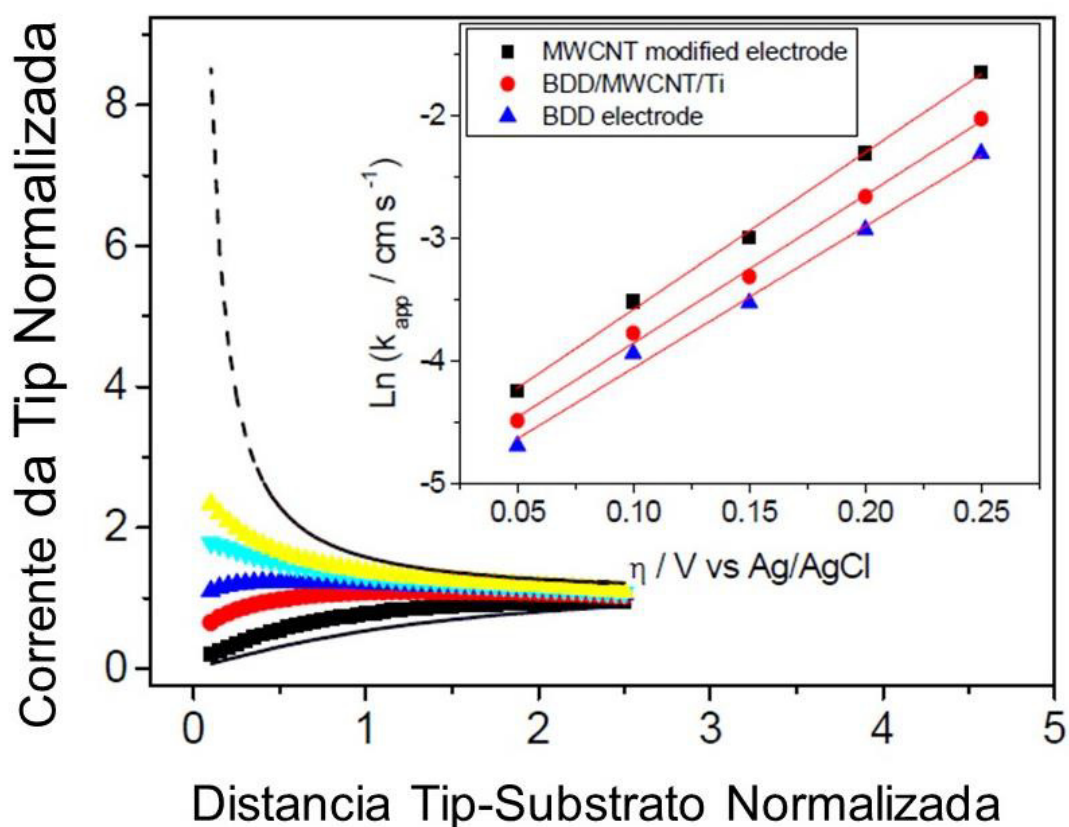
5.1 Caracterização eletroquímica dos eletrodos BDD-MWCNT/Ti, BDD e MWCNT/CV

Com o propósito de avaliar comparativamente a cinética de uma reação eletroquímica de uma molécula padrão sobre a superfície dos eletrodos de BDD-MWCNT/Ti, diamante dopado com boro (BDD) e o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT, utilizou-se uma sonda redox de ferricianeto de potássio. A constante aparente de transferência heterogênea de elétrons e a resistência à transferência de cargas foram avaliadas por microscopia eletroquímica de varredura (SECM) e espectroscopia de impedância eletroquímica, respectivamente.

Na Figura 5 são apresentadas as curvas de corrente normalizada em função da distância normalizada. As curvas de aproximação foram realizadas para a obtenção dos valores da constante de velocidade de transferência heterogênea de elétrons (k^0). As curvas de aproximação foram obtidas com o propósito de avaliar a cinética dos processos eletroquímicos envolvidos entre sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e o eletrodo BDD-MWCNT/Ti. O potencial do eletrodo BDD-MWCNT/Ti foi progressivamente aumentado enquanto o potencial aplicado na ponta de prova (*tip* ou microeletrodo) foi mantido em -200 mV vs Ag/AgCl de forma a se obter um grupo de curvas de aproximação. A polarização da ponta de prova em -200 mV vs. Ag/AgCl teve como propósito garantir que os processos eletroquímicos da sonda redox ocorressem sob regime difusional.

Assim sendo, a corrente elétrica foi monitorada na ponta de prova à medida que está se aproximava dos substratos de forma que um grupo de valores efetivos (ou aparentes) da constante de velocidade de transferência heterogênea de elétrons (k_{eff}) foi obtido a partir das curvas de aproximação provenientes do microscópio eletroquímico de varredura. Experiências com fins comparativos também foram realizados com o eletrodo convencional de diamante dopado com boro (dados não mostrados) e eletrodo MWCNT/CV (dados não mostrados).

Figura 5. Curvas de aproximação obtidas por SECM para o eletrodo BDD-MWCNT/Ti em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. A ponta de prova foi polarizada em -200 mV e o substrato foi polarizado nos seguintes sobrepotenciais (1) 50, (2) 100, (3) 150, (4) 200 e (5) 250 mV vs Ag/AgCl . A Figura inserida mostra o gráfico do logaritmo natural da constante de velocidade aparente *versus* o sobrepotencial aplicado ao substrato obtido para o eletrodo BDD-MWCNT/Ti, eletrodo de carbono vítreo modificado MWCNT e o eletrodo de BDD. A linha mostra o ajuste da teoria Butler-Volmer aos dados obtidos empiricamente.



Fonte. Próprio autor

Como pode ser visto na Figura 5 à medida que a ponta de prova polarizada em $-0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$ aproxima-se do eletrodo de trabalho (BDD-MWCNT/Ti) há uma significativa variação da corrente desenvolvida na ponta de prova. A constante polarização da ponta de prova em $-0,2 \text{ V}$ faz com que a mesma atue como gerador de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ de forma que à medida que a ponta de prova se aproxima do substrato ocorre a regeneração da forma $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Como resultado, a concentração de ferricianeto aumenta na região entre o substrato e a ponta de prova à medida a ponta de prova polarizada se aproxima do substrato investigado.

Adicionalmente, o aumento do potencial aplicado ao substrato (BDD-MWCNT/Ti) induziu uma grande mudança no perfil das curvas de aproximação obtidas

por SECM de forma que as mesmas apresentaram perfil de *feedback* negativo quando o eletrodo BDD-MWCNT/Ti foi polarizado em baixos valores de potencias e apresentaram perfil de *feedback* positivo quando o eletrodo BDD-MWCNT/Ti foi polarizado em altos valores de potencias.

A polarização do BDD-MWCNT/Ti em baixos potenciais ($E_{\text{aplicado}} < E^{\circ}$ (sonda redox)) torna o substrato um regenerador de pouca ou nenhuma eficiência para ferricianeto de potássio de forma que o substrato tende a se comportar como um substrato isolante que dificulta a difusão da sonda redox para a ponta de prova, conseqüentemente o *feedback* é negativo. Por outro lado, a polarização do BDD-MWCNT/Ti em altos potenciais ($E_{\text{aplicado}} > E^{\circ}$ (sonda redox)) torna o substrato um regenerador de elevada eficiência para ferricianeto de potássio de forma que o substrato tende a se comportar como um substrato condutor que aumenta a concentração da sonda redox bem como sua disponibilidade para a ponta de prova, conseqüentemente o *feedback* é positivo.

As curvas de corrente normalizada *versus* a distância normalizada foram simuladas para cada eletrodo polarizado para se obter a constante de transferência de elétrons heterogêneas efetiva (k_{eff}) (também conhecida como aparente, k_{app}) usando as seguintes equações (LEFROU e CORNUT, 2010):

$$Ni_T(L, R_g, \kappa) \sim Ni_T^{Cond}(L+1/k, R_g) + \frac{Ni_T^{Ins}(L, R_g)-1}{(1+2.47R_g^{0.31})(1+L^{0.006R_g+0.113}k^{-0.0236R_g+0.91})} \quad (1)$$

onde $\kappa = k_{\text{eff}}\alpha/D$, k_{eff} é a constante de velocidade heterogênea aparente, D é o coeficiente de difusão da sonda redox, Ni_T^{Ins} e Ni_T^{Cond} representam a corrente da ponta de prova para substrato isolante e condutor, respectivamente. As expressões para Ni_T^{Ins} e Ni_T^{Cond} em função da distância normalizada da ponta de prova ao substrato são dadas por (LEFROU e CORNUT, 2010):

$$Ni_T^{Cond} \sim \alpha(R_g) + \frac{1}{\beta(R_g)} \frac{\pi}{4ArcTan(L)} + (1 - \alpha(R_g) - \frac{1}{2\beta(R_g)}) \frac{2}{\pi} ArcTan(L) \quad (2)$$

$$\alpha(R_g) \sim \ln(2) + \ln(2) \left(1 - \frac{2}{\pi} ArcCos\left(\frac{1}{R_g}\right)\right) - \ln(2) \left[1 - \left(\frac{2}{\pi} ArcCos\left(\frac{1}{R_g}\right)\right)^2\right] \quad (3)$$

$$\beta(R_g) \sim 1 + 0.639 \left(1 - \frac{2}{\pi} ArcCos\left(\frac{1}{R_g}\right)\right) - 0.186 \left[1 - \left(\frac{2}{\pi} ArcCos\left(\frac{1}{R_g}\right)\right)^2\right] \quad (4)$$

$$Ni_T^{Ins} \sim \left[\frac{2.08}{R_g^{0.358}} \left(L - \frac{0.145}{R_g}\right) + 1.585\right] \times \left[\frac{2.08}{R_g^{0.358}} \left(L - 0.0023R_g\right) + 1.57 + \frac{\ln(R_g)}{L} + \frac{2}{\pi R_g} \ln\left(1 + \frac{\pi R_g}{2L}\right)\right]^{-1} \quad (5)$$

As constantes de velocidade efetiva obtidas para uma determinada região do substrato foram ajustadas ao modelo eletroquímico de Butler-Volmer com o propósito de se obter a constante de velocidade heterogênea padrão aparente de cada material (SILVA *et al.*, 2014; SPINDOLA *et al.*, 2017):

$$k_{eff} = k^{\circ} \exp [(1 - \alpha)f(E_s - E^{\circ})] \quad (6)$$

onde $f = F/RT$, F é a constante de Faraday, R é a constante dos gases e T é a temperatura.

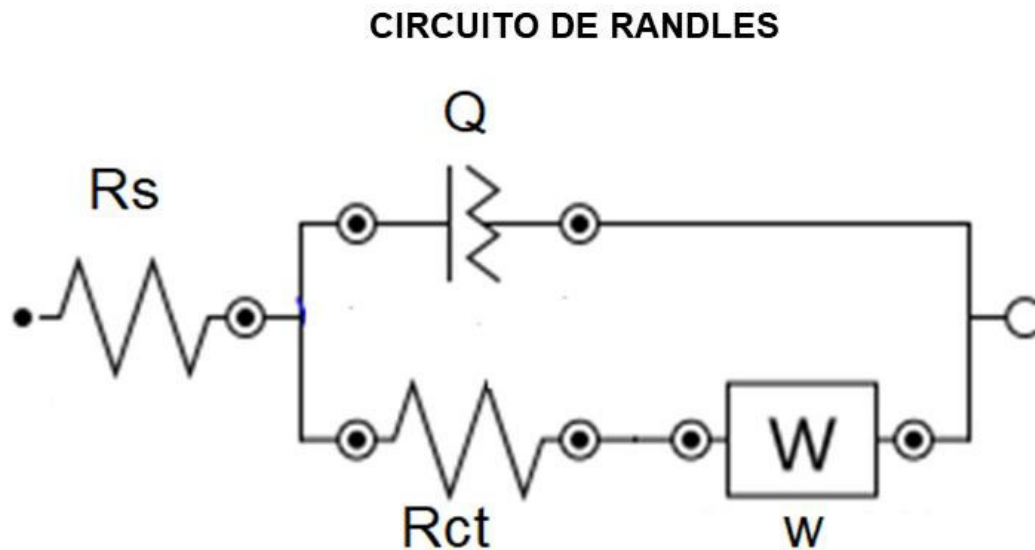
Como pode ser visto na figura 7, as curvas de corrente adimensional da ponta de prova *versus* a distância normalizada tip-substrato variam de *feedback* negativo para positivo com o aumento do potencial aplicado ao eletrodo de BDD-MWCNT/Ti como consequência do aumento na constante de transferência eletrônica heterogênea da reação eletroquímica sobre a superfície do eletrodo proposto.

A comparação do comportamento das curvas de aproximação obtidas para o BDD-MWCNT/Ti às curvas obtidas para o eletrodo de diamante dopado com boro e para o eletrodo MWCNT/CV deixaram evidente que o eletrodo BDD-MWCNT/Ti apresentou um desvio do *feedback* negativo em potências que foram intermediários aos observados para o eletrodo BDD e para o eletrodo MWCNT/CV. As constantes aparentes de velocidade obtidas foram ajustadas à equação (6) e os valores obtidos das constantes aparentes de transferência de elétrons heterogênea para BDD-MWCNT/Ti, eletrodo BDD e eletrodo MWCNT/CV foram de $6,34 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ e $5,24 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ e $7,75 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$, respectivamente.

Consequentemente, os valores da constante aparentem de transferência heterogênea de elétrons (k_{eff}) para o processo redox da sonda em uma área selecionada do eletrodo BDD-MWCNT/Ti foram intermediários aos obtidos para o eletrodo BDD e o eletrodo modificado MWCNT/CV.

O eletrodo BDD-MWCNT/Ti também foi avaliado em comparação com eletrodos BDD e MWCNT/CV por impedância eletroquímica (EIS) sob condições de potencial formal em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (Fig. 7). O circuito equivalente de Randles foi usado para modelar e comparar os dados de impedância, onde R_s é a resistência da solução, CPE ou Q é o elemento de fase constante, R_{ct} é a resistência à transferência de carga e W é a impedância de Warburg (Fig. 6).

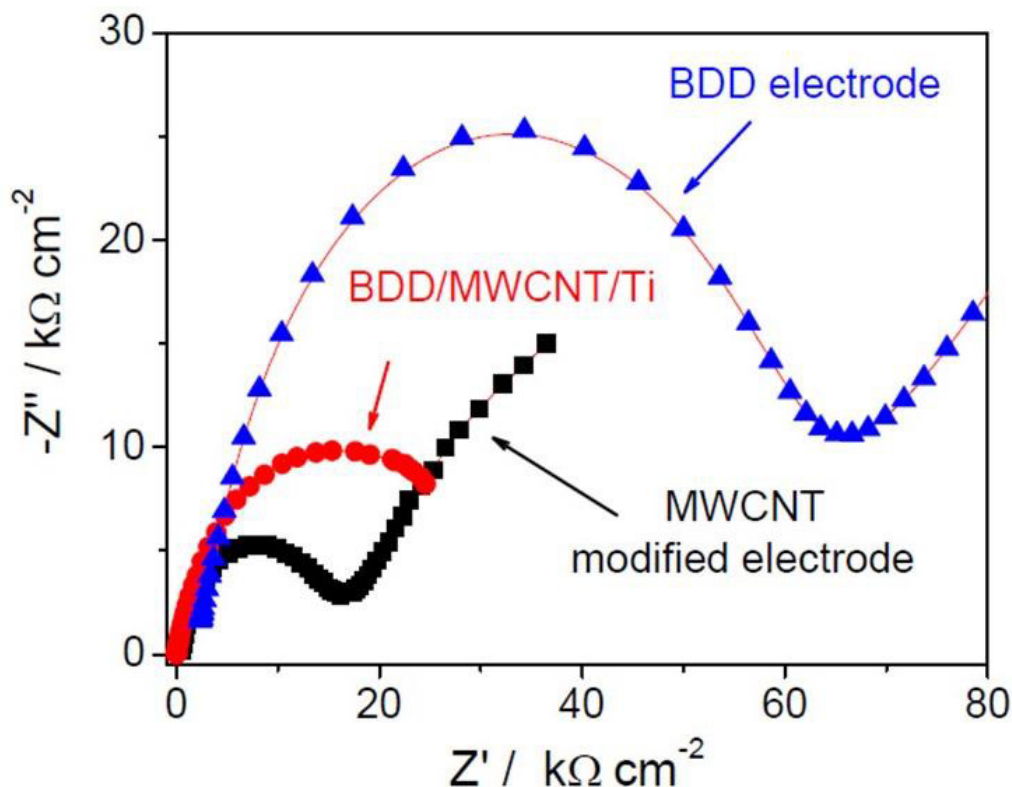
Figura 6. Circuito equivalente de Randles



Fonte. Próprio autor

Os diagramas de Nyquist para todos os eletrodos mostram um semicírculo no domínio de alta frequência atribuído à resistência à transferência de carga na interface eletrodo/solução. O diagrama de Nyquist para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT (Figura 7, quadrado na cor preta) apresenta um semicírculo de pequeno diâmetro indicando que esse eletrodo apresenta uma baixa resistência à transferência de carga. Por outro lado, o eletrodo BDD (Fig 7, triângulos na cor azul) apresentou um semicírculo de maior diâmetro indicando assim uma alta resistência à transferência de carga. Por sua vez, o eletrodo BDD-MWCNT/Ti apresentou um semicírculo intermediário aos observados para MWCNT e BDD. As resistências à transferência de carga (R_{ct}) estimadas para os eletrodos MWCNT/CV, BDD-MWCNT/Ti e BDD foram $20 \text{ k}\Omega \text{ cm}^{-2}$, $40 \text{ k}\Omega \text{ cm}^{-2}$ e $70 \text{ k}\Omega \text{ cm}^{-2}$, respectivamente. Esses resultados confirmam que o eletrodo BDD-MWCNT/Ti apresenta uma resistência à transferência de elétrons entre os valores observados para o eletrodo BDD e eletrodo MWCNT/CV como resultado do sinergismo entre as estruturas BDD e MWCNT.

Figura 7. Diagrama de Nyquist para eletrodo BDD-MWCNT/Ti, eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT e eletrodo BDD em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo 5 mmol L⁻¹ [Fe (CN)₆]³⁻.



Fonte. Próprio autor

5.2 Oxidação de L-dopa e benserazida sobre plataforma baseada em BDD-MWCNT / Ti

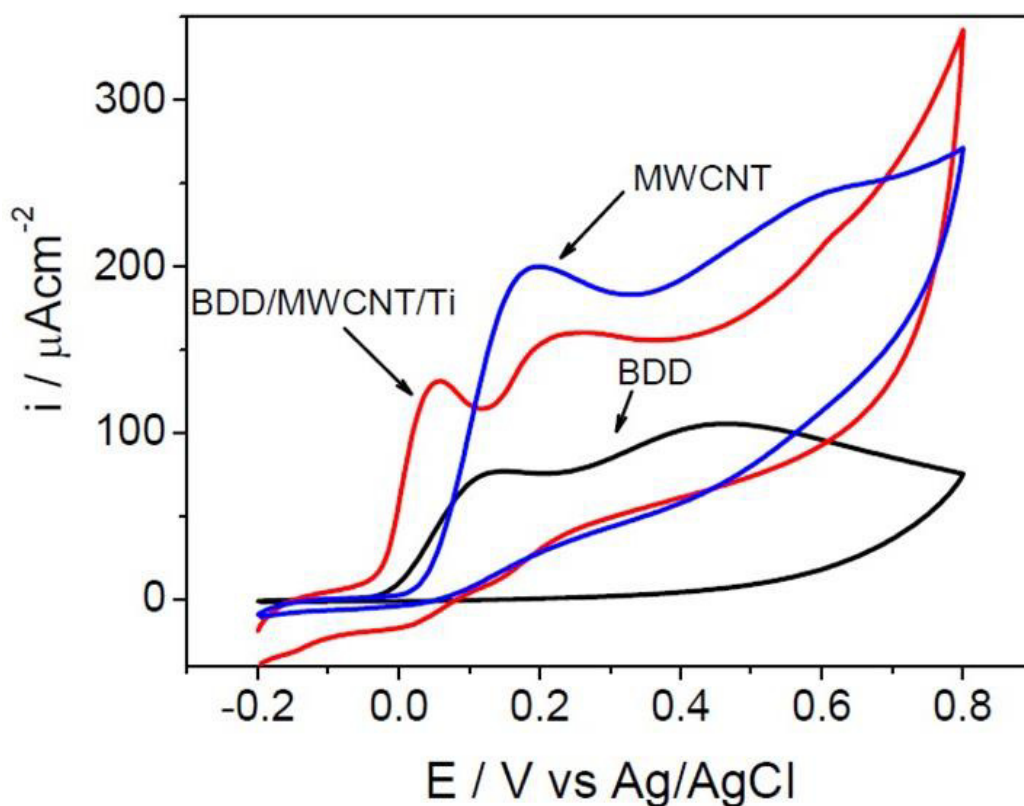
Embora a determinação simultânea de L-dopa e benserazida seja um tópico desafiador hoje em dia, há apenas alguns relatos na literatura sobre a determinação simultânea de L-dopa e benserazida usando sistemas eletroquímicos. Assim, com o propósito de avaliar a potencialidade do eletrodo composto ao sistema em apreço, realizamos uma comparação da oxidação simultânea de L-dopa e benserazida sobre os diferentes eletrodos à base de carbono.

A Figura 8 mostra voltamogramas cíclicos para oxidação eletroquímica de L-dopa e benserazida sobre a superfície do eletrodo de BDD, MWCNT/CV e BDD-MWCNT/Ti em uma solução de tampão de fosfato pH 7,0, registrada a uma velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹. Os voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo BDD-MWCNT/Ti em uma solução contendo 1 mmol L⁻¹ de L-Dopa e 1 mmol L⁻¹ de benserazida em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato apresentaram dois picos de oxidação bem definidos em 0,055 e 0,250 V para a benserazida e L-dopa, respectivamente.

Por outro lado, os picos voltametricos de oxidação da L-dopa e da benserazida sobre os eletrodos de BDD e MWCNT/CV apresentaram-se em maiores potenciais elétricos de forma que para o BDD os picos de oxidação para benserazida e L-dopa foram observados em 154 e 467 mV vs Ag/AgCl e para o MWCNT/CV os picos de oxidação para benserazida e L-dopa foram observados em 195 e 632 mV vs Ag/AgCl, respectivamente.

Embora as três plataformas tenham apresentado picos voltametricos de oxidação para L-dopa e benserazida em posições distintas, a oxidação destas espécies sobre o eletrodo BDD e sobre o carbono vítreo modificado com MWCNT ocorreram em potenciais elevados para ambos os compostos. O principal problema associado aos elevados valores de potencial elétrico para oxidação de L-dopa e benserazida reside no fato de que um grande número de possíveis interferentes comumente presentes em amostras de interesse para L-dopa e benserazida pode sofrer oxidação em potenciais de eletrodo superiores a 250 mV vs Ag/AgCl.

Figura 8. Voltamogramas cíclicos para eletrodo BDD-MWCNT/Ti, eletrodo MWCNT/CV e eletrodo BDD em solução tampão de fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) contendo 1 mmol L⁻¹ de L-dopa e 1 mmol L⁻¹ de benserazida.



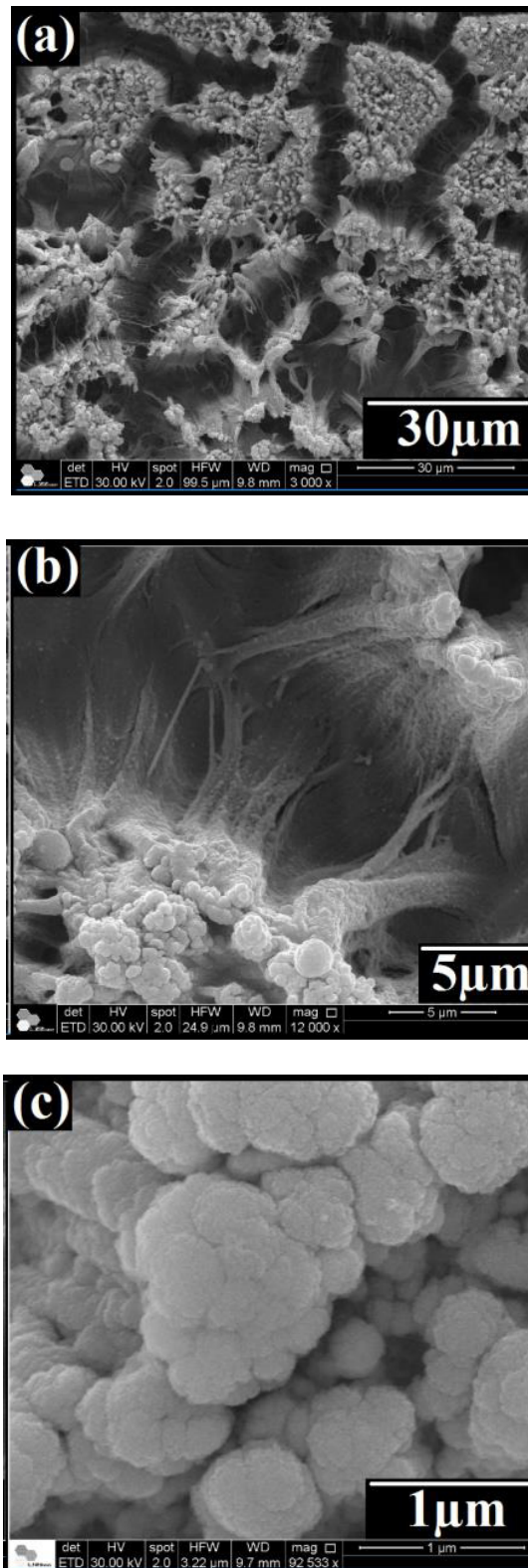
Fonte: Próprio autor

Com base nos resultados, obtidos pelos estudos de voltametria cíclica (VC), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e microscopia eletroquímica de varredura, o eletrodo de BDD-MWCNT/Ti foi o mais apto para a oxidação das espécies de interesse em potências mais baixas, o que está associado ao efeito sinérgico resultante da combinação do BDD com o MWCNT e, conseqüentemente, devido o interesse na oxidação simultânea dos analitos de interesse, o eletrodo de BDD-MWCNT/Ti foi escolhido como plataforma para estudos posteriores.

5.3 Caracterização Morfológica do eletrodo BDD-MWCNT/Ti

A Figura 9 (a - c) mostra imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o eletrodo compósito BDD-MWCNT/Ti proposto. Conforme pode ser observado, a micrografia apresentada na Figura 9 (a) deixa evidente que os nanotubos de carbono de paredes múltiplas cresceram de forma a produzir estruturas verticalmente alinhadas como base (VAMWCNTs).

Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura de compósito com ampliação diferente de (a) 3k x para (c) ~ 100k x.

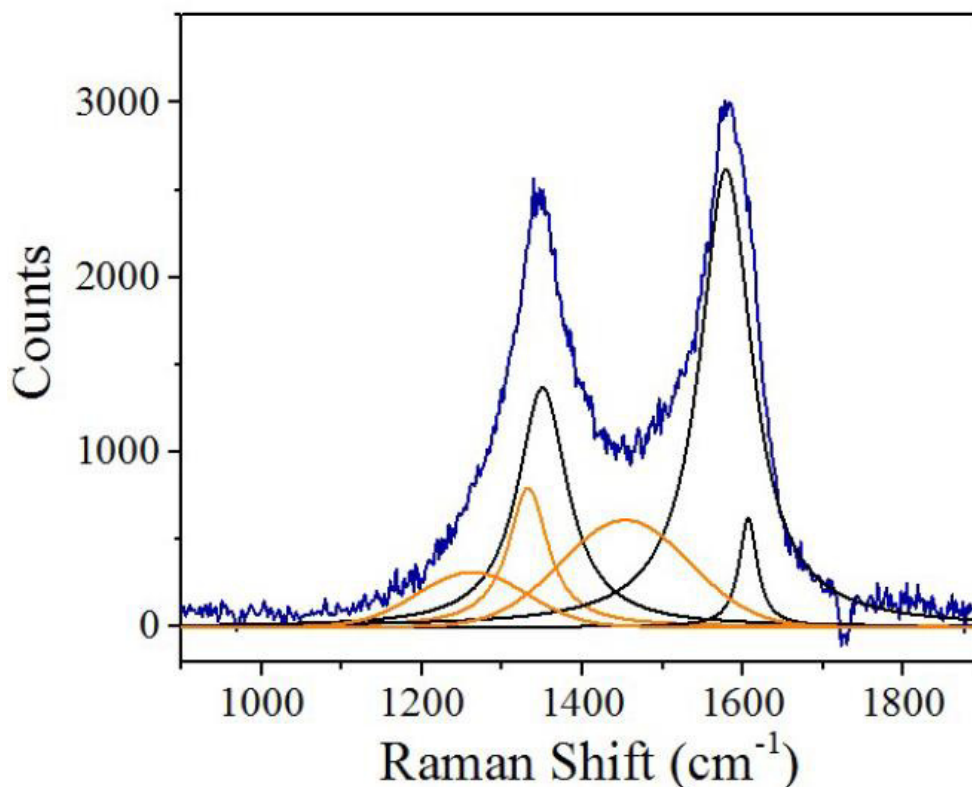


Fonte. Próprio autor

Adicionalmente, o tratamento do material com o *spray* de nanodiamante produziu um padrão de microestrutura formado por aproximadamente 500-1500 nanotubos de carbono que se juntaram durante a eletro-pulverização gerando uma estrutura na forma couve-flor com tamanho de grão estimado entre 20 e 50 nm.

Na Figura 10 é apresentado o espectro Raman do composto bem como sua deconvolução como combinação das características de nanodiamantes fortemente dopadas com boro e VAMWCNT.

Figura 10. Espectros Raman do composto usando excitação verde (514 nm).



Fonte. Próprio autor

Como podemos observar o pico do diamante está centrado em 1332 cm^{-1} e é menos proeminente do que as bandas D ($\sim 1350\text{ cm}^{-1}$) e G ($\sim 1580\text{ cm}^{-1}$) típicas do MWCNT. A banda “D” para os nanotubos de carbono está relacionado com defeitos e com o desordenamento de carbono (ZANIN *et al.*, 2015). Também podemos observar a banda D', típica do MWCNT, centrada em 1606 cm^{-1} . Para um alto teor de Boro, a intensidade da banda centrada em $\sim 1250\text{ cm}^{-1}$ aumenta, acabando por ocultar o pico mais fraco de 1170 cm^{-1} e o pico do diamante. Essas observações sugerem que a integridade dos nanotubos de carbono individuais não é afetada pelo crescimento subsequente do BDD. Para uma explicação mais detalhada sobre espectros de nanodiamantes fortemente

dopados, estão à disposição as referências (MAY *et al.*, 2008; ZANIN *et al.*, 2012) e para mais detalhes sobre os espectros Raman do MWCNT, está o trabalho de Zanin e colaboradores (2015).

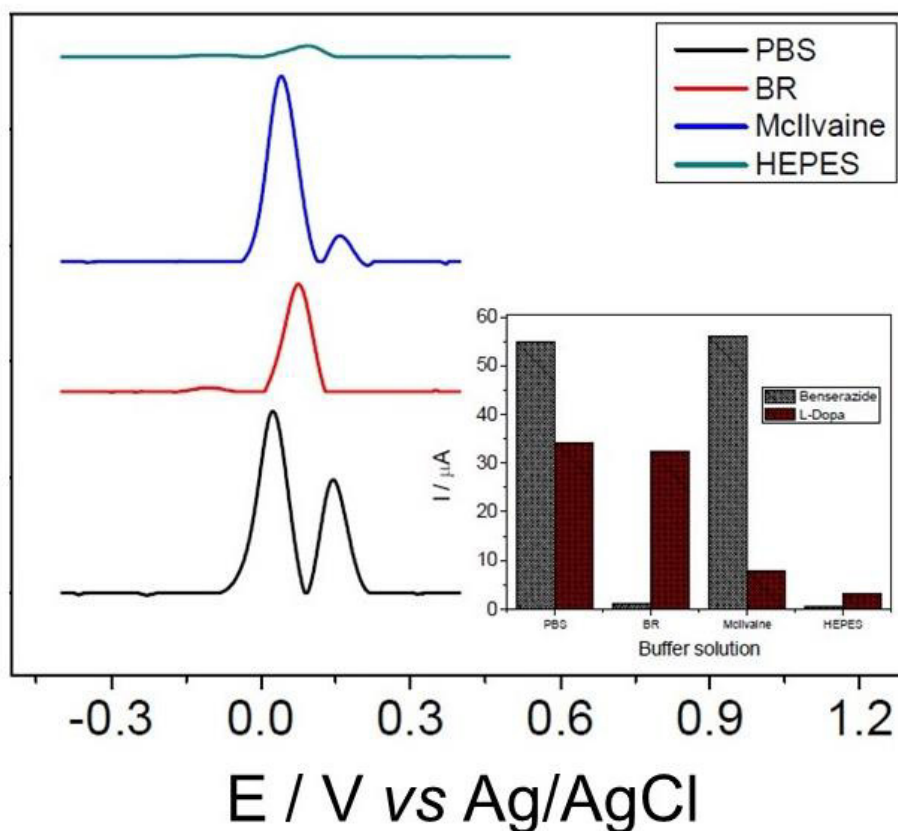
5.4 Otimização dos parâmetros eletroanalíticos

Estudo dos tipos de tampões (PBS, MacIlvaine, Britton-Robinson e Hepes)

5.4.1 Primeiramente, a influência do tipo de tampão sobre as respostas eletroquímicas do eletrodo proposto para benserazida e L-dopa foram investigadas usando os tampões PBS, MacIlvaine, Britton-Robinson (BR) e Hepes a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0. Com o propósito de avaliar a influência de cada tipo de tampão sobre a resposta do sistema fez-se o uso da técnica eletroanalítica denominada de voltametria de pulso diferencial.

Conforme pode ser observado, há uma grande variação de resposta eletroquímica da plataforma aos analitos em cada tampão, contudo, dentre eles o tampão PBS foi o que apresentou melhores respostas para a determinação simultânea em termos de sensibilidade eletroquímica a ambos analitos. Por outro lado, os demais tampões também apresentaram respostas em maior ou menor intensidade para uma dos analitos estudados, mas não para as duas simultaneamente (Fig. 11). Portanto, o tampão PBS foi determinado como o melhor eletrólito a ser utilizado para os próximos estudos já que o mesmo promoveu melhores respostas para a determinação simultânea de L-dopa e benserazida.

Figura 11. Influência da solução tampão na resposta voltamétrica do sensor BDD-MWCNT/Ti para L-dopa e benserazida. Medições realizadas em tampão 0,1 mol L⁻¹. A figura inserida à Figura 11 mostra a corrente de pico para L-dopa e benserazida em relação à natureza do tampão.



Fonte: Próprio autor

5.4.2

Efeito do pH

Após a definição do tipo de tampão, fez-se o estudo da influência do pH sobre a resposta eletroquímica do eletrodo proposto para a benserazida e L-dopa usando tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ em diferentes valores de pH. O efeito do pH na resposta do sensor para L-dopa e benserazida foi investigado do pH 5,0 até 8,0 no intuito de avaliar a proporção de prótons em relação ao de elétrons. Adicionalmente, tais experimentos permitiram encontrar o melhor pH da solução para a determinação simultânea de L-dopa e benserazida. A Figura 12 mostra um gráfico do potencial de pico (Gráfico (A) da Figura 12) e a corrente de pico (Gráfico (B) da Figura 12) para oxidação de L-dopa e benserazida em função do pH da solução tampão, respectivamente.

Conforme pode ser observado na Figura 12, o potencial de pico de oxidação de L-dopa variou-se linearmente com o pH, obedecendo a seguinte equação $E_p = 0.575 (\pm 0.028) - 0.056 (\pm 0.004) \text{ pH}$ (Fig 12 (A) pontos vermelhos) e o potencial de pico de

oxidação da benserazida varia de acordo com o pH, obedecendo a seguinte equação $E_p = 0.522 (\pm 0,042) - 0,069 (\pm 0,006) \text{ pH}$ (Fig 12 (A) quadrados pretos).

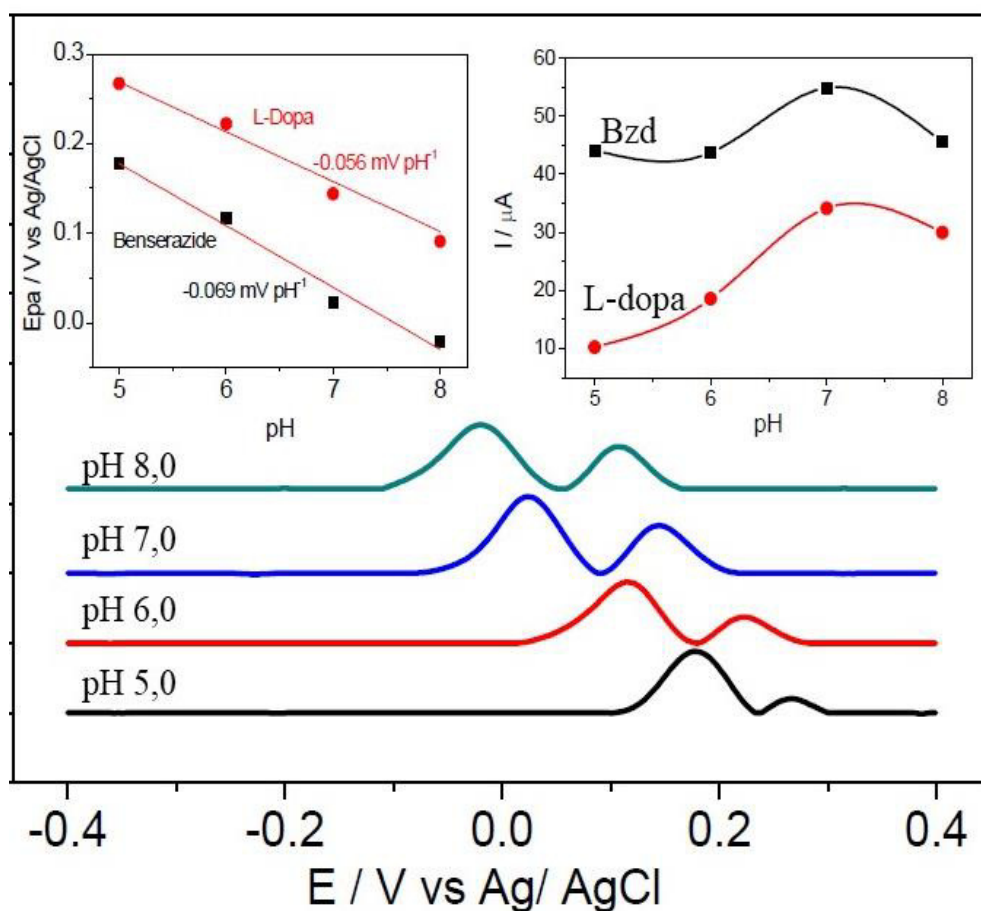
O coeficiente angular das curvas de potencial de pico para L-dopa e benserazida com o pH foram próximas ao valor teórico previsto para um comportamento “Nernstiano”, de forma a indicar que a oxidação de L-dopa e benserazida ocorre com a produção de dois elétrons e dois prótons por molécula de L-dopa e produção de dois elétrons e dois prótons por molécula de benserazida oxidada.

A corrente de pico para benserazida aumentou de pH 6,0 a 7,0 (Fig 12 (B) quadrados pretos), o que pode ser associado ao alto valor de pKa do grupo amina das moléculas de L (pKa de 8,87) (ENSAFI *et al.*, 2013; SZYRWIEL *et al.*, 2013). Portanto, a benserazida ocorre na sua forma protonada na faixa de pH investigada, o que pode facilitar a interação entre as moléculas de benserazida e a superfície dos grupos carboxílicos do eletrodo BDD-MWCNT/Ti.

Similarmente, a corrente de pico da L-dopa aumentou de pH 5,0 até pH 7,0 (Fig 12 (B) pontos vermelhos) e depois diminuiu de pH 7,0 para pH 8,0. É provável que a valores de pH muito superiores ao valor de pKa de prótons fenólicos de L-dopa (pKa = 5,44) (ENSAFI *et al.*, 2013; SZYRWIEL *et al.*, 2013), faz com que a mesma perca prótons e se apresente como espécies negativas de forma a dificultar sua interação com a superfície do eletrodo proposto.

Assim sendo, o pH 7,0 foi escolhido para a determinação simultânea de L-dopa e benserazida uma vez que neste pH foram obtidas as melhores condições em termos de corrente de pico para a determinação simultânea de L-dopa e benserazida com maior sensibilidade.

Figura 12. Influência do pH da solução tampão na resposta voltamétrica do sensor BDD-MWCNT/Ti para L-dopa e benserazida. A Figura inserida (A) à Figura 12 mostra o efeito do pH no potencial de pico de L-dopa e benserazida e a figura inserida (B) mostra o efeito do pH na corrente de pico de L-dopa e benserazida.



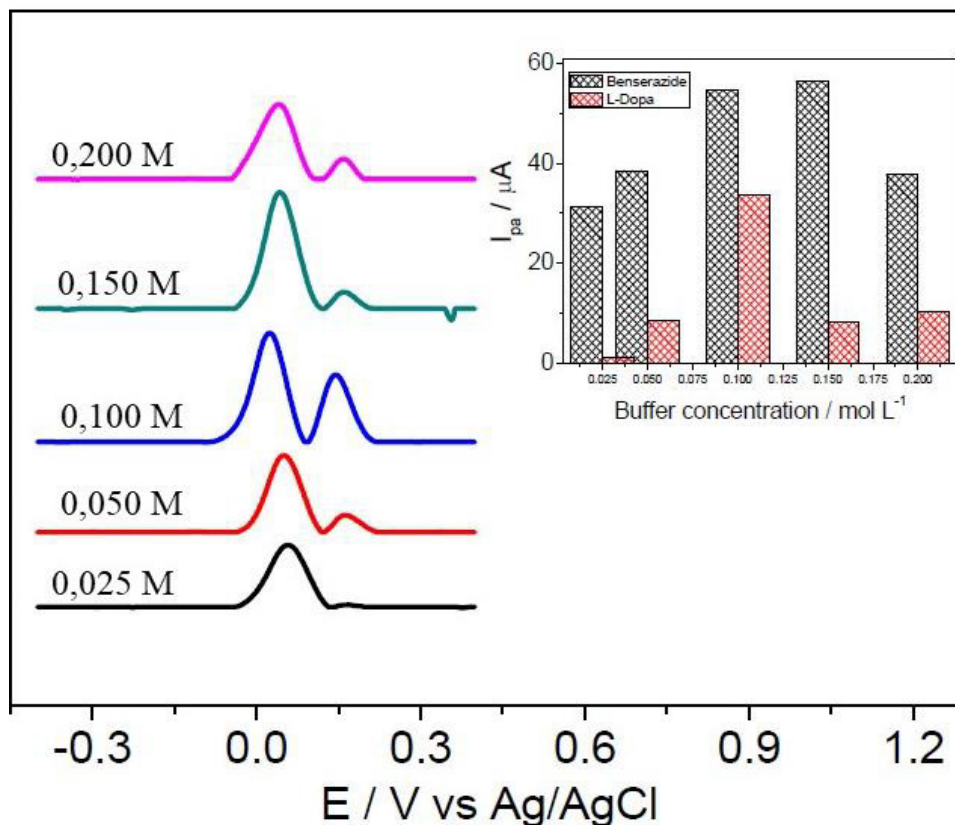
Fonte: Próprio autor

5.4.3

Efeito da concentração

Após definir o melhor tampão e o melhor pH do tampão, teve-se a necessidade de identificar qual seria a melhor concentração do tampão na determinação simultânea dos analitos. Para tal, preparou-se 5 (cinco) tampões PBS pH 7,0 nas seguintes concentrações $0,025 \text{ mol L}^{-1}$, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente às análises da variação da concentração, observou-se que para as concentrações de $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ houve aumento da corrente de pico para a benserazida e para a L-dopa enquanto que após a concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ o sistema apresentou menores valores de correntes para ambos os analitos. Deste modo definiu-se a concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ do tampão para os experimentos subsequentes uma vez que esta concentração favoreceu de forma bem significativa a oxidação das duas espécies como exposto na Figura 13.

Figura 13. Influência da concentração da solução tampão na resposta voltamétrica do sensor BDD-MWCNT/Ti para L-dopa e benserazida. Medições realizadas em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹. A Figura inserida à Figura 13 mostra a corrente de pico para L-dopa e benserazida versus a concentração do tampão.



Fonte: Próprio autor

Com base nos resultados obtidos na etapa de otimização da resposta eletroquímica da plataforma proposta, ficou definido como as melhores condições para a determinação dos analitos o tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

Estudo de interferentes

A seletividade do eletrodo BDD-MWCNT/Ti foi investigada avaliando a influência de alguns compostos de interferência comuns em amostras de urina, como ácido ascórbico, ácido barbitúrico, ácido fólico, ureia, glicose e ácido úrico.

As espécies foram analisadas em concentrações 10 (dez) vezes superiores à concentração dos princípios ativos e observou-se que as mesmas não apresentaram resposta sobre o eletrodo proposto no intervalo de potencial investigado. Assim, o BDD-MWCNT/Ti apresentou-se como uma alternativa viável para determinar seletivamente L-

dopa e benserazida na presença de vários interferentes comumente presentes em amostras de urina.

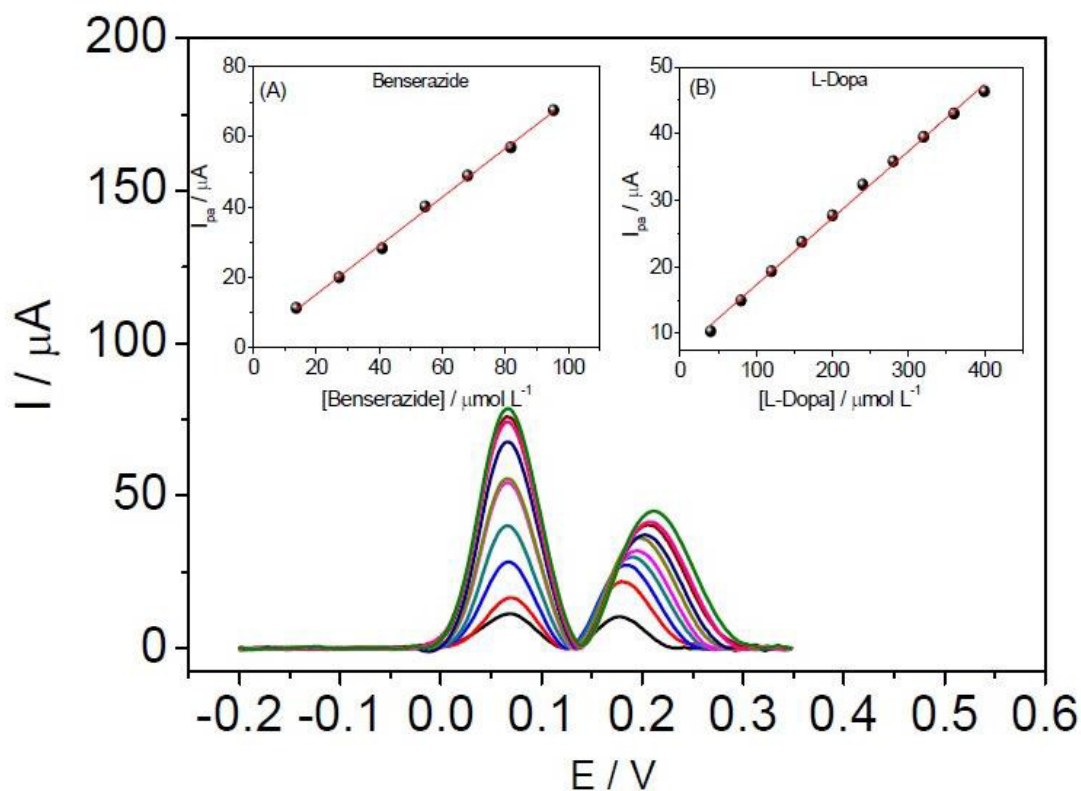
Caracterização analítica

Com o intuito de obter uma curva analítica para o sensor desenvolvido, foram realizados estudo de voltametria de pulso diferencial para oxidação da benserazida e L-5.4.5 dopa em tampão fosfato (PBS) 0,1 mol L⁻¹ a pH 7,0 após otimização dos parâmetros experimentais (Fig 14). Em condições otimizadas, o sensor proposto apresentou uma faixa de resposta linear de 40 a 400 μmol L⁻¹ para a L-dopa e de 10 a 99 μmol L⁻¹ para a benserazida (Fig 14 A e B), que pode ser expressa de acordo com a seguinte equação:

$$I / \mu\text{A} = 5.632 (\pm 2.241) + 0.598 (\pm 0.026) [\text{Bzd} / \mu\text{mol L}^{-1}] \text{ para a bzd}; \quad (7)$$

$$I / \mu\text{A} = 7.236 (\pm 0.478) + 0.100 (\pm 0.002) [\text{L-dopa} / \mu\text{mol L}^{-1}] \text{ para a L-dopa}. \quad (8)$$

Figura 14. Voltamogramas de pulso diferencial para soluções de L-dopa e benserazida obtidas em condições otimizadas. A relação entre as concentrações máximas de corrente e fármaco é mostrada na inserção (A) e inserção (B) para benserazida e L-dopa, respectivamente.



Fonte: Próprio autor

A precisão do eletrodo BDD-MWCNT/Ti para a determinação de L-dopa e benserazida foi avaliada a partir de estudos de repetição intra-dia e inter-dia. A qual se obteve um desvio padrão relativo (DPR) para 10 (dez) determinações de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ L-dopa e benserazida realizadas no mesmo dia de trabalho foram de 4,9% e 3,5%, aproximadamente. Por outro lado, a reprodutibilidade inter-dia do eletrodo BDDMWCNT/Ti para determinação de L-dopa e benserazida foi avaliada comparando a resposta analítica do sensor para 10 determinações de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ L-dopa e benserazida. Os DPR do eletrodo BDD-MWCNT/Ti para determinação de L-dopa e benserazida medidos em 10 (dez) diferentes dias foram 7,3% e 5,1%, indicando que a plataforma proposta apresenta alta precisão em termos de repetibilidade e reprodutibilidade.

Os limites de detecção (LD) para as duas espécies foram determinados como sendo $18 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a L-dopa e a benserazida, respectivamente. O cálculo do limite de detecção foi realizado mediante o emprego da expressão $3\sigma/S$ (coeficiente

angular), em que σ é o desvio padrão do valor médio para 10 voltamogramas do branco, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC (DE CÁSSIA SILVA LUZ *et al.*, 2006). Estes resultados demonstram que o eletrodo de BDD-MWCNT/Ti exibiu excelente detectabilidade para a determinação da benserazida e L-dopa.

Quando comparados os resultados obtidos neste trabalho aos trabalhos existente na literatura para a determinação simultânea dos dois compostos, notou-se que o eletrodo proposto para tal finalidade apresentou resposta satisfatória quando comparada à alguns trabalhos reportados previamente (Tabela 3).

Entretanto, ao fazermos uma comparação das condições operacionais dos sistemas em cada trabalho citado na tabela 3 com o nosso trabalho, observou-se que os trabalhos de Ensafi e colaboradores (2010) e do Demircigil e colaboradores (2011) apresentaram seus potenciais de oxidação muito próximo de modo que, para a determinação simultânea poderá ocorrer uma sobre posição de potencial, enquanto que, o nosso trabalho apresentou potenciais de oxidação bem distintos para os dois analitos (0,055 e 0,250V para benserazida e L-dopa respectivamente). Já para os trabalhos da Naushad e colaboradores (2013) e Alexandra Rabinca e colaboradores (2017), observou-se que em ambos os trabalho só possível fazer essa determinação em potenciais mais elevados em comparação com o nosso estudo que oxida os analitos em potenciais mais baixo. Ao compararmos o nosso estudo com o estudo do Zapata-Urzúa e colaboradores (2010) notou-se que a determinação dos dois analitos so foi possível mediante as calibrações multivariada dos seu sistema enquanto que o nosso sistema não necessita deste tipo de abordagem. E por fim, o trabalho do Kuyumcu Savan e Erdoadu (2017) apresentou limites de dectção mais elevados em comparação ao nosso trabalho (Tabela 3), além de também apresentar um alto potencial de oxidação de aproximadamente 0,15 e 0,3 V para a referida determinação.

Tabela 3. Comparação dos limites de detecção (LD) obtidos pelo BDD-MWCNT / Ti proposto com outros eletrodos relatados na literatura para a determinação simultâneo de L-dopa e Bzd.

Eletrodo	Condições otimizadas	Bzd $\mu\text{mol L}^{-1}$	L-dopa $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ref.
Multi-Walled carbon nanotube sensor with poly (3-methylthiophene)	Tampão PBS pH 7,0	32,5	10,3	(Kuyumcu Savan e Erdoadu, 2017)
GCE	Tampão B-R pH 5.0	2,99	2,52	(Demircigil <i>et al.</i> , 2011)
GCE applying multivariate calibrations	Solução de ácido perclórico	2,77	5,12	(Zapata-Urzúa <i>et al.</i> , 2010)
CPE modified with chloranil	Solução em pH 10	0,95	0,65	(Ensafi <i>et al.</i> , 2010)
GCE modified with poly (4-(2-pyridylazo)-resorcinol)	Tampão PBS pH 5,2	2	6	(Naushad <i>et al.</i> , 2013)
SPCE electro-chemically pretreated	Tampão B-R pH 2.21.	2,6	0,47	(Alexandra Rabinca <i>et al.</i> , 2017)
BDD-MWCNT/Ti	Tampão PBS pH 7,0	1	18	Este trabalho

5.5 Aplicação do BDD-MWCNT/Ti em amostras biológicas e testes de recuperação

Para avaliar o desempenho do eletrodo proposto para determinação de L-dopa e benserazida em amostras de urina, a análise direta de L-dopa e benserazida em amostras de urina humana foi investigada (Tabela 4). As percentagens da recuperação foram calculadas comparando a concentração obtida das amostras com concentrações reais e adicionadas. O método de adição padrão foi utilizado para testar a recuperação.

Com o intuito de avaliar a aplicabilidade do método para a análise real da amostra, o conteúdo de L-dopa e benserazida foi determinado em amostras de urina usando o método de adição padrão e os testes de recuperação. A recuperação do analito nas amostras variou entre 95% e 105%, indicando que o sensor proposto é efetivo e pode ser aplicado para detecção de L-Dopa e benserazida em amostras reais. Pode-se observar claramente que não há influência das matrizes no sensor desenvolvido para as amostras avaliadas.

Tabela 4. Adição e recuperação de L-Dopa e Benserazida em amostras de urina (n = 3).

Samples	[L-Dopa] added/($\mu\text{mol L}^{-1}$)	[L-Dopa] found/($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recovery/(%)
A	0	-	-
	50	52	104
	100	98	98
	200	206	103
	300	312	104
Samples	[Benserazide] added/($\mu\text{mol L}^{-1}$)	[Benserazide] found/($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recovery/(%)
A	0	-	-
	50	48	96
	100	102	102
	200	196	98
	300	310	103

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstra que o eletrodo de BDD-MWCNT/Ti é uma plataforma viável para a determinação simultânea de benserazida e L-dopa sem o necessário uso de ferramentas adicionais como etapas de separação ou tratamento matemático. A comparação do eletrodo proposto aos eletrodos de MWCNT/CV e ao eletrodo de BDD deixou evidente que o BDD-MWCNT/Ti apresentou melhor capacidade de oxidação das moléculas de interesse de forma a reduzir o potencial necessário para a oxidação da L-dopa e benserazida.

Sob condições otimizadas (Solução tampão fosfato pH 7,0 0,1 mol L⁻¹), a plataforma proposta apresentou uma faixa de resposta linear de 40 a 400 µmol L⁻¹ para a L-dopa e de 10 a 99 µmol L⁻¹ para a benserazida.

A precisão do eletrodo BDD-MWCNT/Ti para a determinação de L-dopa e benserazida, avaliada a partir de estudos de repetição intra-dia e inter-dia, resultou em um desvio padrão relativo (DPR) para 10 (dez) determinações L-dopa e benserazida realizadas no mesmo dia de trabalho foram de 4,9% e 3,5%. A reprodutibilidade inter-dia do eletrodo BDDMWCNT/Ti para determinação de L-dopa e benserazida, avaliadas em termos de DPR, foram 7,3% e 5,1%, indicando que a plataforma proposta apresenta alta precisão em termos de repetibilidade e reprodutibilidade.

Os limites de detecção (LD) para as duas espécies foram determinados como sendo 18 µmol L⁻¹ e 1 µmol L⁻¹ para a L-dopa e a benserazida, respectivamente tal que estes resultados demonstram que o eletrodo de BDD-MWCNT/Ti exibiu excelente detectabilidade para a determinação da benserazida e L-dopa. A comparação da plataforma proposta a outros trabalhos existente na literatura para a determinação simultânea dos dois compostos deixou evidente que o eletrodo proposto para tal finalidade apresentou resposta satisfatória.

Por fim, a aplicação da plataforma proposta para determinação de L-dopa e benserazida em amostras de urina bem como os estudos de adição e recuperação do analito nas amostras indicou que o sensor proposto é efetivo e pode ser aplicado para detecção de L-Dopa e benserazida em amostras reais.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

7 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

AJAYAN, P. M. Nanotubes from Carbon. *Chemical Reviews*, v. 99, n. 7, p. 1787-1800, 1999/07/01 1999. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cr970102g> >.

ALEXANDER, G. E. Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues in Clinical Neuroscience, France*, v. 6, n. 3, p. 259-280, 2004. ISSN 1294-8322 1958-5969. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3181806/> >

ALEXANDRA RABINCA, A. et al. Voltammetric Method for Simultaneous Determination of L-Dopa and Benserazide. *Current Analytical Chemistry*, v. 13, n. 3, p. 218-224, // 2017. Disponível em: < <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cac/2017/00000013/00000003/art00007> >. Disponível em: < <https://doi.org/10.2174/1573411012666160601161703> >.

ALULA, M. T. et al. Citrate-capped silver nanoparticles as a probe for sensitive and selective colorimetric and spectrophotometric sensing of creatinine in human urine. *Analytica Chimica Acta*, v. 1007, p. 40-49, May 2018. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000423843500006 >.

ATA, M. S. et al. New developments in non-covalent surface modification, dispersion and electrophoretic deposition of carbon nanotubes. *Carbon*, v. 130, p. 584-598, Apr 2018. ISSN 0008-6223. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000424889200071 >.

ATTA, N. F.; GALAL, A.; EL-ADS, E. H. Graphene — A Platform for Sensor and Biosensor Applications. In: RINKEN, T. (Ed.). *Biosensors - Micro and Nanoscale Applications*. Rijeka: InTech, 2015. p.Ch. 02.

BARBOSA, E. R. et al. Cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease: clinical characteristics and treatment. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, v. 34, n.4, p. 176-183, 2007.

BARENDRECHT, E. Voltammetric determination of antioxidants at the wax-impregnated graphite electrode. *Analytica Chimica Acta*, v. 24, p. 498-499, 1961/01/01/ 1961. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003267061801050> >.

BARRAGAN, J. T. C. et al. A novel approach for electroanalytical determinations employing discharge of pseudocapacitor by electroactive species. *Analytica Chimica Acta*, v. 1006, p. 1-9, May 2018. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000425502600001 >.

BEITOLLAHI, Hadi; GARKANI NEJAD, Fariba. Graphene oxide/ZnO nanocomposite for sensitive and selective electrochemical sensing of levodopa and tyrosine using modified graphite screen printed electrode. *Electroanalysis*, v. 28, n. 9, p. 2237-2244, 2016.

BLANCO, M. et al. Simultaneous spectrophotometric determination of levodopa and benserazide in a pharmaceutical preparation by use of partial least-squares regression.

Analytical Letters, v. 33, n. 13, p. 2701-2718, 2000. ISSN 0003-2719. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000089580300008 >.

BUSSY, C.; ALI-BOUCETTA, H.; KOSTARELOS, K. Safety Considerations for Graphene: Lessons Learnt from Carbon Nanotubes. *Accounts of Chemical Research*, v. 46, n. 3, p. 692-701, 2013/03/19 2013. ISSN 0001-4842. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ar300199e> >.

CAPEK, I. Dispersions, novel nanomaterial sensors and nanoconjugates based on carbon nanotubes. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 150, n. 2, p. 63-89, 2009/09/30/ 2009. ISSN 0001-8686. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868609000372> >.

CHEN, D. Y.; SHEN, X. J.; SUN, L. L. Strong cation exchange-reversed phase liquid chromatography-capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry platform with high peak capacity for deep bottom-up proteomics. *Analytica Chimica Acta*, v. 1012, p. 1-9, Jul 2018. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000425505800001 >.

CHEN, D.; FENG, H.; LI, J. Graphene Oxide: Preparation, Functionalization, and Electrochemical Applications. *Chemical Reviews*, v. 112, n. 11, p. 6027-6053, 2012/11/14 2012. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cr300115g> >.

CHEN, H.; LEI, H. M.; XU, Q. Y. Neuronal activity pattern defects in the striatum in awake mouse model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, v. 341, p. 135-145, Apr 2018. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000425199000018 >.

DAMIANI, P. C. et al. Design and optimization of a chemometrics-assisted spectrophotometric method for the simultaneous determination of levodopa and carbidopa in pharmaceutical products. *Analytica Chimica Acta*, v. 543, n. 1, p. 192-198, 2005/07/06/ 2005. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267005007245> >.

DE CÁSSIA SILVA LUZ, R. et al. Development of a voltammetric sensor for catechol in nanomolar levels using a modified electrode with Cu(phen)₂(TCNQ)₂ and PLL. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 117, n. 1, p. 274-281, 9/12/ 2006. ISSN 0925-4005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400505009160> >.

Demircigil, B.T.; Topal, B.D.; Ozkan, S.A. Simultaneous determination of L-dopa and benserazide in binary mixtures using first derivative of the ratio-voltammetric methods based on their oxidation on solid electrode. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 2011, 76, 1717-1736.

DRESSELHAUS, M. S. et al. Raman spectroscopy of carbon nanotubes. *Physics Reports*, v. 409, n. 2, p. 47-99, 2005/03/01/ 2005. ISSN 0370-1573. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0370157304004570> >.

ELVING, P. J.; SMITH, D. L. The graphite electrode. An improved technique for voltammetry and chronopotentiometry. *Analytical Chemistry*, v. 32, n. 13, p. 1849-1854, 1960/12/01 1960. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac50153a041> >.

ENSAFI, A. A. et al. Application of ionic liquid-TiO₂ nanoparticle modified carbon paste electrode for the voltammetric determination of benserazide in biological samples. *Materials Science and Engineering: C*, v. 33, n. 2, p. 831-835, 2013/03/01/ 2013. ISSN 0928-4931. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493112005255> >.

ENSAFI, A. A.; ARABZADEH, A.; KARIMI-MALEH, H. Sequential Determination of Benserazide and Levodopa by Voltammetric Method using Chloranil as a Mediator. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 8, p. 1572-1580, 2010. ISSN 0103-5053. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280811000024 >.

FILHO, A.G.S. FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 7, 1695-1703, 2007.

FOULADGAR, M. A high sensitive square wave voltammetric sensor based on ZnO nanoparticle ionic liquid paste electrode for determination of benserazide in biological samples. *Measurement*, v. 86, p. 141-147, 5// 2016. ISSN 0263-2241. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263224116001445> >.

GEORGAKILAS, V. et al. Broad Family of Carbon Nanoallotropes: Classification, Chemistry, and Applications of Fullerenes, Carbon Dots, Nanotubes, Graphene, Nanodiamonds, and Combined Superstructures. *Chemical Reviews*, v. 115, n. 11, p. 4744-4822, 2015/06/10 2015. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cr500304f> >.

GEORGAKILAS, V. et al. Functionalization of Graphene: Covalent and Non-Covalent Approaches, Derivatives and Applications. *Chemical Reviews*, v. 112, n. 11, p. 6156-6214, 2012/11/14 2012. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cr3000412> >.

GHANEAN, S.; AFJEH, M. G. Application of the nondestructive second derivative spectrophotometry to eliminate the effect of substrate in identification of madder used in Persian carpets. *Color Research and Application*, v. 43, n. 2, p. 238-246, Apr 2018. ISSN 0361-2317. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000424763100009 >.

Goodman-Hilman, A.; Rall, T.; Nier, A.; Taylor, P.; *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Mc-Graw Hill: New York, 1996.

GREENACRE, J. K. et al. COMPARISON OF LEVODOPA WITH CARBIDOPA OR BENSERAZIDE IN PARKINSONISM. *Lancet*, v. 2, n. 7982, p. 381-384, 1976. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1976CB78400001 >.

GREENSHIELDS, M.W.C.C. Sensores Químicos Baseados em Compósitos de Nanotubos de Carbono. 2011. 129 f. Tese (Doutorado em Física) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR. 2011.

HE, W. W.; ZHOU, X. W.; LU, J. Q. Capillary electrophoresis-chemiluminescence detection of levodopa and benserazide in Medopar tablet. *Chinese Chemical Letters*, v. 18, n. 1, p. 91-93, 2007/01/01/ 2007. ISSN 1001-8417. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001841706000350> >.

HE, W.-W.; ZHOU, X.-W.; LU, J.-Q. Simultaneous determination of benserazide and levodopa by capillary electrophoresis–chemiluminescence using an improved interface. *Journal of Chromatography A*, v. 1131, n. 1, p. 289-292, 2006/10/27/ 2006. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967306016414> >.

HERZ, D. M. et al. Resting-state connectivity predicts levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, v. 31, n. 4, p. 521-529, Apr 2016. ISSN 0885-3185. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000374546300016 >.

HOGLINGER, G. U. et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nature Neuroscience*, v. 7, n. 7, p. 726-735, Jul 2004. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222274400014 >.

KAACKOLA, S. et al. EFFECT OF ENTACAPONE, A COMT INHIBITOR, ON CLINICAL DISABILITY AND LEVODOPA METABOLISM IN PARKINSONIAN-PATIENTS. *Neurology*, v. 44, n. 1, p. 77-80, Jan 1994. ISSN 0028-3878. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994MR37100017 >.

KAROUSIS, N. et al. Structure, Properties, Functionalization, and Applications of Carbon Nanohorns. *Chemical Reviews*, v. 116, n. 8, p. 4850-4883, 2016/04/27 2016. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00611> >.

KIZEK, R et al. Antraciclina e elipticina como drogas que danificam o DNA anticancerígenos: Recentes avanços *Farmacologia e Terapêutica*, v 133, n. 1, p. 26-39, 2012.

KORPOSH, S. et al. INVITED Porphyrin-nanoassembled fiber-optic gas sensor fabrication: Optimization of parameters for sensitive ammonia gas detection. *Optics and Laser Technology*, v. 101, p. 1-10, May 2018. ISSN 0030-3992. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000424316900001 >.

KUYUMCU SAVAN, E.; ERDOADU, G. Simultaneous determination of levodopa and benserazide using poly(3-methylthiophene) and a multi-walled carbon nanotube sensor. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 21, n. 8, p. 2209-2217, Aug 2017. ISSN 1432-8488. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000406177400006 >.

LAURILA, T.; SAINIO, S.; CARO, M. A. Hybrid carbon based nanomaterials for electrochemical detection of biomolecules. *Progress in Materials Science*, v. 88, p. 499-594, 2017/07/01/ 2017. ISSN 0079-6425. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079642517300518> >.

Le Pan, Yanping Guo, Zhongdong Li, Jun Chen, Tian Jiang, Yunqiu Yu, Simultaneous Determination of Levodopa, Benserazide and 3-O-Methyldopa in Human Serum by LC–MS–MS Chromatography, *72* (2010) 627 – 633.

LEFROU, C.; CORNUT, R. Analytical Expressions for Quantitative Scanning Electrochemical Microscopy (SECM). *Chemphyschem*, v. 11, n. 3, p. 547-556, Feb 2010. ISSN 1439-4235. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275243700001 >.

LI, H. et al. Carbon nanodots: synthesis, properties and applications. *Journal of Materials Chemistry*, v. 22, n. 46, p. 24230-24253, 2012. ISSN 0959-9428. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C2JM34690G> >.

LIU, W. L. et al. Poly(3,6-diamino-9-ethylcarbazole) based molecularly imprinted polymer sensor for ultra-sensitive and selective detection of 17-beta-estradiol in biological fluids. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 104, p. 79-86, May 2018. ISSN 0956-5663. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000424719000013 >.

LIU, Z. Y. et al. Efficient Carbon-Based CsPbBr₃ Inorganic Perovskite Solar Cells by Using Cu-Phthalocyanine as Hole Transport Material. *Nano-Micro Letters*, v. 10, n. 2, p. 13, Jun 2018. ISSN 2311-6706. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000425093800016 >.

MARQUES, K. L. et al. Simultaneous chemiluminometric determination of levodopa and benserazide in a multi-pumping flow system with multivariate calibration. *Analytical Sciences*, v. 24, n. 8, p. 985-991, Aug 2008. ISSN 0910-6340. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258601700007 >.

MAY, P. W. et al. Raman and conductivity studies of boron-doped microcrystalline diamond, faceted nanocrystalline diamond and cauliflower diamond films. *Diamond and Related Materials*, v. 17, n. 2, p. 105-117, 2008/02/01/ 2008. ISSN 0925-9635. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925963507004694> >.

MCCREERY, R. L. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. *Chemical Reviews*, v. 108, n. 7, p. 2646-2687, 2008/07/01 2008. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cr068076m> >.

MOLAAKBARI, E. et al. Synthesis of ZnO nanorods and their application in the construction of a nanostructure-based electrochemical sensor for determination of levodopa in the presence of carbidopa. *Analyst*, v. 139, n. 17, p. 4356-4364, 2014. ISSN 0003-2654. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C4AN00138A> >.

MURRAY, R. W. Chemically modified electrodes. *Accounts of Chemical Research*, v. 13, n. 5, p. 135-141, 1980/05/01 1980. ISSN 0001-4842. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ar50149a002> >.

MURRAY, R. W.; EWING, A. G.; DURST, R. A. CHEMICALLY MODIFIED ELECTRODES - MOLECULAR DESIGN FOR ELECTROANALYSIS. *Analytical Chemistry*, v. 59, n. 5, p. A379-&, Mar 1987. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1987G132200002 >.

NAMDARI, P.; NEGAHDARI, B.; EATEMADI, A. Synthesis, properties and biomedical applications of carbon-based quantum dots: An updated review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 87, p. 209-222, 3// 2017. ISSN 0753-3322. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332216318601> >.

Naushad, M.; Gupta, V.K.; Wabaidur, S.M.; Alothman, Z.A. Simultaneous determination of benserazide and levodopa in pharmaceutical tablet, human serum and urine sample by differential pulse voltammetry using modified glassy carbon electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2013, 8, 297-311.

NOSEK, M.; SAINIO, J.; JOENSUU, P. M. 2,2'-bipyridine-functionalized single-walled carbon nanotubes: The formation of transition metal complexes and their charge transfer effects. *Carbon*, v. 129, p. 175-182, Apr 2018. ISSN 0008-6223. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000424885800020 > .

PALAKOLLU, V. N. et al. Electrochemically reduced graphene oxide/Poly-Glycine composite modified electrode for sensitive determination of l-dopa. *Materials Science and Engineering: C*, v. 77, p. 394-404, 8/1/ 2017. ISSN 0928-4931. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116327886> > .

PENG, J. et al. Graphene Quantum Dots Derived from Carbon Fibers. *Nano Letters*, v. 12, n. 2, p. 844-849, 2012/02/08 2012. ISSN 1530-6984. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/nl2038979> > .

PLESKOV, Y. V. et al. Electrochemical Behaviour of Boron-doped Diamond Compacts – a New Electrode Material. *Electrochimica Acta*, v. 201, p. 268-273, 2016/05/20/ 2016. ISSN 0013-4686. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468615304874> > .

Polleri A, Masturzo P, Murialdo G, Carolei A. Dose- and sexrelated effects of aromatic acids decarboxylase inhibitors on serum prolactin in humans. *Acta Endocrinologica* 1980; 93: 7 – 12.

REZAEI, B. et al. An electrochemical biosensor based on nanoporous stainless steel modified by gold and palladium nanoparticles for simultaneous determination of levodopa and uric acid. *Talanta*, v. 158, p. 42-50, 2016/09/01/ 2016. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914016303113> > .

ROZMANOWSKI, T.; KRAWCZYK, P. Influence of chemical exfoliation process on the activity of NiCl₂-FeCl₃-PdCl₂-graphite intercalation compound towards methanol electrooxidation. *Applied Catalysis B-Environmental*, v. 224, p. 53-59, May 2018. ISSN 0926-3373. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000424960700007 > .

SAGAR, K. A.; SMYTH, M. R. Simultaneous determination of levodopa, carbidopa and their metabolites in human plasma and urine samples using LC-EC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 22, n. 3, p. 613-624, 2000/04/01/ 2000. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708500002375> > .

SAINIO, S. et al. Carbon nanotube (CNT) forest grown on diamond-like carbon (DLC) thin films significantly improves electrochemical sensitivity and selectivity towards dopamine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 211, n. Supplement C, p. 177-186, 2015/05/01/ 2015. ISSN 0925-4005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400515000830> > .

SALVADORI, M. C. et al. Novel method for measuring nanofriction by atomic force microscope. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures Processing, Measurement, and Phenomena*, v. 26, n. 2, p. 643-650, 2008.

SANTOS, N. F. et al. Tuning the field emission of graphene-diamond hybrids by pulsed methane flow CVD. *Carbon*, v. 122, p. 726-736, Oct 2017. ISSN 0008-6223. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000407394200080 >.

SHEIKH-MOHSENI, Mohammad Ali; PIRSA, Sajad. Nanostructured Conducting Polymer/Copper Oxide as a Modifier for Fabrication of L-DOPA and Uric Acid Electrochemical Sensor. *Electroanalysis*, v. 28, n. 9, p. 2075-2080, 2016.

SHEN, H. et al. Effects of benserazide on L-DOPA-derived extracellular dopamine levels and aromatic L-amino acid decarboxylase activity in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Advances in Brain Research: Cerebrovascular Disorders and Neurodegeneration*, v. 1251, p. 199-204, 2003. ISSN 0531-5131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000185213600021 >.

SILVA, L A da et al. Estudo eletroquímico e determinação de l-dopa em produto farmacêutico por voltametria cíclica. 2006.

Silva, S.M. et al., A Novel Sensor Based on Manganese azo Macrocycle/Carbon Nanotubes to Perform the Oxidation and Reduction Processes of Two Diphenol Isomers, *Electroanalysis* 2014, 26, 602 – 611.

SPINDOLA, R. F. et al. Evaluation of a novel composite based on functionalized multi-walled carbon nanotube and iron phthalocyanine for electroanalytical determination of isoniazid. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 21, n. 4, p. 1089-1099, 2017// 2017. ISSN 1433-0768. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10008-016-3451-9> >.

SURIANI, A. B. et al. Synthesis, structural, and field electron emission properties of quasi-aligned carbon nanotubes from gutter oil. *Materials Chemistry and Physics*, v. 165, p. 1-7, Sep 2015. ISSN 0254-0584. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000363818500001 >.

SWAIN, G. M.; RAMESHAM, R. The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin film electrodes. *Analytical Chemistry*, v. 65, n. 4, p. 345-351, 1993/02/15 1993. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac00052a007> >.

SZYRWIEL, L. et al. Interactions of anti-Parkinson drug benserazide with Zn(II), Cu(II), Fe(II) ions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 76, n. Supplement C, p. 36-43, 2013/03/25/ 2013. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708512006474> >.

TAI, L. X. et al. Direct Growth of Graphene on Silicon by Metal-Free Chemical Vapor Deposition. *Nano-Micro Letters*, v. 10, n. 2, p. 9, Jun 2018. ISSN 2311-6706. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000425093800003 >.

TAKAMURA, T. CHEMISTRY, ELECTROCHEMISTRY, AND ELECTROCHEMICAL APPLICATIONS | Carbon A2 - Garcke, Jürgen. In: (Ed.). Encyclopedia of Electrochemical Power Sources. Amsterdam: Elsevier, 2009. p.709-743. ISBN 978-0-444-52745-5.

TAKEDA, H. H. et al. Electrochemical sensing of levodopa or carbidopa using a glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes within a poly(allylamine hydrochloride) film. *Analytical Methods*, v. 8, n. 6, p. 1274-1280, 2016. ISSN 1759-9660. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C5AY03041B> >.

YAN, X. et al. Electrochemical determination of L-dopa at cobalt hexacyanoferrate/large-mesopore carbon composite modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 663, n. 1, p. 36-42, 12/1/ 2011. ISSN 1572-6657. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572665711004929> >.

ZANIN, H. et al. High surface area diamond-like carbon electrodes grown on vertically aligned carbon nanotubes. *Carbon*, v. 82, n. Supplement C, p. 288-296, 2015/02/01/ 2015. ISSN 0008-6223. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008622314010513> >.

ZANIN, H. et al. Porous Boron-Doped Diamond/Carbon Nanotube Electrodes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 6, n. 2, p. 990-995, 2014/01/22 2014. ISSN 1944-8244. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/am4044344> >.

ZANIN, H. G. et al. Synthesis and Characterization of Magnetic Nanocrystalline Diamond Films. *Ferroelectrics*, v. 436, n. 1, p. 96-100, 2012/01/01 2012. ISSN 0015-0193. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/10584587.2012.731340> >.

ZAPATA-URZÚA, C. et al. Simultaneous voltammetric determination of levodopa, carbidopa and benserazide in pharmaceuticals using multivariate calibration. *Talanta*, v. 82, n. 3, p. 962-968, 2010/08/15/ 2010. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914010004327> >.

ZARBIN, Aldo J. G. and OLIVEIRA, Marcela M. Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): Quo Vadis? *Quím. Nova* [online]. 2013, vol.36, n.10, pp.1533-1539. ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013001000009>.

ZHANG, W. et al. Synthesis of three-dimensional carbon nanotube/graphene hybrid materials by a two-step chemical vapor deposition process. *Carbon*, v. 86, p. 358-362, 2015/05/01/ 2015. ISSN 0008-6223. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008622315000767> >.

ZHENG, Y.-Y. et al. Detection of dopamine at graphene-ZIF-8 nanocomposite modified electrode. *Chinese Chemical Letters*, v. 28, n. 7, p. 1473-1478, 2017/07/01/ 2017. ISSN 1001-8417. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S100184171730092X> >.