

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – *CAMPUS* RIO VERDE
LICENCIATURA EM QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE CÉLULA ELETROQUÍMICA E
ELETRODO DE TRABALHO IMPRESSOS PARA
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO

Autor: Gabriel Cabral da Fonseca
Orientador: Dr. João Carlos Perbone de Souza

RIO VERDE - GOIÁS
AGOSTO – 2022

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – *CAMPUS* RIO VERDE
LICENCIATURA EM QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE CÉLULA ELETROQUÍMICA E
ELETRODO DE TRABALHO IMPRESSOS PARA
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO

Autor: Gabriel Cabral da Fonseca
Orientador: Dr. João Carlos Perbone de Souza

Trabalho de Curso apresentado como parte das exigências para obtenção do título de Licenciado em Química, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – *Campus* Rio Verde.

RIO VERDE - GOIÁS
AGOSTO – 2022

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

Fd Fonseca, Gabriel
DESENVOLVIMENTO DE CÉLULA ELETROQUÍMICA E ELETRODO
DE TRABALHO IMPRESSOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO
INDOL-3-ACÉTICO / Gabriel Fonseca; orientador João
Carlos Perbone de Souza . -- Rio Verde, 2022.
56 p.

TCC (Graduação em Licenciatura em Química) --
Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2022.

1. Análise por injeção em batelada. 2. Impressão
3D. 3. Eletrodo impresso. 4. Ácido indol-3-acético.
I. , João Carlos Perbone de Souza, orient. II. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese (doutorado) | <input type="checkbox"/> Artigo científico |
| <input type="checkbox"/> Dissertação (mestrado) | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização) | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input checked="" type="checkbox"/> TCC (graduação) | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

Gabriel Cabral da Fonseca

Matrícula:

2018102221530181

Título do trabalho:

DESENVOLVIMENTO DE CÉLULA ELETROQUÍMICA E ELETRODO DE TRABALHO IMPRESSOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: Não Sim, justifique:

O conteúdo do arquivo será utilizado para produção de artigo científico.

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 01 / 08 / 2023

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde

Local

04 / 08 / 2022

Data

Gabriel Cabral da Fonseca

Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

João C. Pedroni de Souza

Assinatura do(a) orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Ata nº 61/2022 - DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CURSO

Aos três dias do mês de agosto de 2022, às 19 horas e 30 minutos, reuniu-se a banca examinadora composta pelos docentes: João Carlos Perbone de Souza (orientador), Polyana Fernandes Pereira (membro), Celso Martins Belisário (membro), para examinar o Trabalho de Curso intitulado "DESENVOLVIMENTO DE CÉLULA ELETROQUÍMICA E ELETRODO DE TRABALHO IMPRESSOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO" do estudante Gabriel Cabral da Fonseca, Matrícula nº 2018102221530181 do Curso de Licenciatura em Química do IF Goiano - Campus Rio Verde. A palavra foi concedida ao estudante para a apresentação oral do TC, houve arguição do candidato pelos membros da banca examinadora. Após tal etapa, a banca examinadora decidiu pela APROVAÇÃO do estudante. Ao final da sessão pública de defesa foi lavrada a presente ata que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora.

(Assinado Eletronicamente)

João Carlos Perbone de Souza

Orientador(a)

(Assinado Eletronicamente)

Polyana Fernandes Pereira

Membro

(Assinado Eletronicamente)

Celso Martins Belisário

Membro

Observação:

() O(a) estudante não compareceu à defesa do TC.

Documento assinado eletronicamente por:

- Celso Martins Belisario, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 04/08/2022 08:04:54.
- Rodrigo Braghiroli, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 04/08/2022 06:29:34.
- Polyana Fernandes Pereira, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 03/08/2022 21:12:37.
- Joao Carlos Perbone de Souza, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 03/08/2022 20:27:11.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 03/08/2022. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 412531

Código de Autenticação: F75de04515



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3620-5600

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Francisco e Mônica.

À minha querida avó, Elizabete,
por ser meu exemplo de vida e meu bem
mais precioso neste mundo.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao meu pai, por todo o apoio, incentivo e pelo exemplo de vida.
- ❖ À minha querida mãe, por ter me apoiado quando eu mais precisei.
- ❖ À minha querida avó, Elizabete, um exemplo de mulher batalhadora que, frente a tantas dificuldades, criou eu e minha irmã mais velha com todo o amor que pode nos dar. A senhora sempre será meu bem maior neste mundo.
- ❖ Às minhas irmãs, em especial à minha irmã mais velha, Danielle, por todo aprendizado durante nossa criação. Você também sempre será um exemplo para mim.
- ❖ Ao meu recente companheiro, Matheus, por ser um exemplo de pessoa trabalhadora, e por estar ao meu lado nas minhas decisões.
- ❖ Ao meu orientador, Dr. João Perbone, por ter me aceitado como orientando e por ter me ensinado grande parte do eu sei hoje. Sou grato por todas as discussões científicas e por confiar em meu trabalho; e, claro, pela amizade.
- ❖ Aos professores de Química do IF Goiano pela minha formação profissional, em especial, à Dra. Polyana por participar da minha formação científica e na produção deste trabalho.
- ❖ Aos meus amigos do curso de Química, em especial ao João Vitor, Ian, Ana Luiza, Geovana e Victor. Obrigado por todos esses anos de amizade, compreensão e aprendizado.
- ❖ Ao IF Goiano, CAPES e CNPq pelas bolsas concedidas por meio de diferentes programas (PIBID, PIPECTI, PIBIC e PIBITI).

“Precisamos lembrar que o que observamos não é a própria natureza, mas a natureza conforme revelada por nossos métodos de investigação.”

Werner Heisenberg

RESUMO

A manufatura aditiva, comumente conhecida como impressão 3D, tem despertado grande interesse aos pesquisadores devido a rapidez e baixo custo no *design* e produção de novos materiais. A matéria-prima utilizada no processo de impressão (filamento) é diversa, o que aumenta ainda mais o interesse de muitas áreas, principalmente, na eletroquímica, que pode dispor desse processo para a impressão de sistemas que são utilizados na identificação e quantificação de compostos por meio da eletroanalítica. Neste estudo, utilizamos uma impressora 3D para produzir uma célula eletroquímica destinada a análise por injeção em batelada (do inglês, *batch injection analysis*, BIA) com filamento não condutor, e um eletrodo de trabalho com filamento condutivo. Para as análises de voltametria cíclica e amperometria foi utilizado um potenciostato *homemade*, eletrodo de referência de Ag/AgCl (3 M KCl), eletrodo auxiliar de platina e o eletrodo de trabalho impresso. O eletrodo de trabalho foi caracterizado por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier e Microscopia Eletrônica de Varredura, e tratado com ativação mecânica e eletroquímica previamente à padronização do método de análise de ácido indol-3-acético (AIA). A partir dos resultados de voltametria cíclica, foi escolhido o potencial de -0,4 V para as análises amperométricas do AIA. As seguintes características analíticas foram determinadas: limite de detecção ($0,65 \text{ mg L}^{-1}$) e quantificação ($2,16 \text{ mg L}^{-1}$), linearidade (faixa linear de trabalho: $1 - 50 \text{ mg L}^{-1}$; $R^2 = 0,998$) e repetibilidade (DPR ($n = 9$) foi de 0,88 e 1,27 % para 5 e 25 mg L^{-1} , respectivamente). Em suma, os resultados demonstram a possibilidade de se utilizar o eletrodo impresso para quantificação de AIA em amostras reais por BIA, sendo um método rápido e de baixo custo.

Palavras-chave: Análise por injeção em batelada. Impressão 3D. Eletrodo impresso. Ácido indol-3-acético.

ABSTRACT

Additive manufacturing, commonly known as 3D printing, has aroused great interest among researchers due to the speed and low cost of designing and producing new materials. The raw material used in the printing process (filament) is diverse, which increases, even more, the interest of many areas, such as electrochemistry, which can print systems for identification and quantification of compounds by electroanalytic. In this study, we used a 3D printer to produce an electrochemical cell for batch injection analysis (BIA) with a non-conductive filament, and a working electrode with a conductive filament. For cyclic voltammetry and amperometry analyses, we used a homemade potentiostat, Ag/AgCl (3 M KCl) reference electrode, platinum auxiliary electrode, and the printed working electrode. The working electrode was characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Scanning Electron Microscopy and treated with mechanical and electrochemical activation before the standardization of the indole-3-acetic acid (IAA) analysis method. From the cyclic voltammetry results, the potential of -0.4 V was chosen for the amperometric analysis of the IAA. The following analytical characteristics were determined: detection limit (0.65 mg L^{-1}) and quantification (2.16 mg L^{-1}), linearity (linear range: $1 - 50 \text{ mg L}^{-1}$; $R^2 = 0.998$) and repeatability (DPR ($n = 9$) was 0.88 and 1.27 % for 5 and 25 mg L^{-1} , respectively). In summary, the results demonstrate the possibility of using the printed electrode to quantify IAA in real samples by BIA, being a fast and low-cost method.

Keywords: Batch injection analysis. 3D printing. Printed electrode. Indole-3-acetic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do AIA.	22
Figura 2. Modelo 3D da célula eletroquímica. (A) Vista superior do corpo da célula; (B) Vista frontal da base da célula; (C) Vista superior da base da célula; (D) Corpo e tampa da célula, e peça de encaixe da pipeta eletrônica; (E) Vista superior da peça.	24
Figura 3. Célula eletroquímica impressa na impressora GTMaX 3D com filamento ABS não condutivo.	25
Figura 4. Eletrodo de trabalho impresso na impressora GTMaX 3D com filamento PLA-CB condutivo.	25
Figura 5. Célula eletroquímica impressa com os três eletrodos. (A) eletrodo de referência Ag/AgCl (3 M KCl); (B) eletrodo auxiliar de platina; e (C) eletrodo de trabalho impresso.	27
Figura 6. Voltamogramas cíclicos de azul de metileno como sonda redox para diferentes procedimentos de ativação do eletrodo de trabalho. (—) sem tratamento; (—) ativação mecânica; (—) HNO ₃ ; (—) H ₂ SO ₄ ; (—) DMF; (—) NaOH; (—) ativação mecânica seguido de ativação eletroquímica.	30
Figura 7. Espectros de FTIR do eletrodo de trabalho. (—) sem tratamento; (—) após a ativação mecânica; (—) após a ativação eletroquímica; (—) após ciclos voltamétricos com o analito.	31
Figura 8. Estrutura química do polímero PLA.	32
Figura 9. Micrografias de MEV do eletrodo impresso (A e B), eletrodo ativado mecanicamente (C e D) e eletrodo ativado eletroquimicamente (E e F).	33
Figura 10. Voltamogramas cíclicos realizados com variação de potencial entre -0,8 a +1,2. (—) NaOH (0,5 M); (—) AIA 10 mg L ⁻¹ ; (—) AIA 20 mg L ⁻¹ ; (—) AIA 40 mg L ⁻¹ ; e (—) AIA 60 mg L ⁻¹ ; (—) AIA 80 mg L ⁻¹ ; (—) AIA 100 mg L ⁻¹	35
Figura 11. Mecanismo proposto para a redução irreversível do AIA no eletrodo de trabalho, em meio básico.	36
Figura 12. Comparação dos resultados sem e com agitação da solução na célula eletroquímica. Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ . Eletrólito suporte: NaOH (0,5 M).	37

Figura 13. Estudo de linearidade em triplicata realizado por amperometria. (a) 1 mg L⁻¹; (b) 5 mg L⁻¹; (c) 10 mg L⁻¹; (d) 25 mg L⁻¹; (e) 50 mg L⁻¹; (f) 100 mg L⁻¹. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Eletrólito suporte: NaOH (0,5 M)..... 38

Figura 14. Curva analítica do AIA (R² = 0,998). Equação: uA = -0,977 + (-0,86) x mg L⁻¹. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Eletrólito suporte: NaOH (0,5 M)..... 39

Figura 15. Estudo de repetibilidade do método de análise nas mesmas condições da curva analítica. (a) 5 mg L⁻¹ e (b) 25 mg L⁻¹. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Eletrólito suporte: NaOH (0,5 M). 40

ANEXO A

Figura A1. Voltamogramas cíclicos do AIA em NaOH (0,5 M). (A) [AIA]: 50 mg L⁻¹; (B) [AIA]: 100 mg L⁻¹. (—) NaOH (0,5 M); (—) AIA 50 mg L⁻¹ em (A); (—) AIA 100 mg L⁻¹ em (B).

ANEXO B

Figura B1. Voltamogramas cíclicos do AIA. (A) pH 2,6; (B) pH 4,6; (C) pH 6,6. (—) ácido cítrico-Na₂HPO₄; (—) AIA 50 mg L⁻¹; (—) AIA 100 mg L⁻¹. Nos voltamogramas (A) e (B) não foi possível identificar um pico de potencial definido de redução ou oxidação do AIA. Já no voltamograma (C), foi possível identificar um pico de redução do AIA em -0,86 V; contudo, após alguns ciclos observamos que o eletrodo pode estar sofrendo envenenamento da superfície, possivelmente devido à adsorção do analito.

Figura B2. Voltamogramas cíclicos do AIA. (A) pH 4; (B) pH 6; (C) pH 8; (D) pH 10. (—) tampão BR 80 % (v/v) (tampão/etanol); (—) AIA 50 mg L⁻¹; (—) AIA 100 mg L⁻¹. Nos voltamogramas (A), (B) e (D) não foi possível identificar um pico de potencial definido de redução ou oxidação do AIA, como no caso do tampão ácido cítrico-Na₂HPO₄. No voltamograma (C) foi possível identificar um pico de redução do AIA em -0,79 V; no entanto, podemos observar que no voltamograma da concentração maior (100 mg L⁻¹) a intensidade do sinal de corrente diminuiu drasticamente. Esse resultado pode ser devido ao envenenamento da superfície do eletrodo, assim como no caso do tampão ácido cítrico-Na₂HPO₄.

Figura B3. Voltamogramas cíclicos do AIA. (A) pH 4 e (B) pH 8. (—) solução-tampão fosfato e (—) AIA 50 mg L⁻¹. Nos voltamogramas apresentados em (A) não foi possível identificar um pico de potencial definido de redução ou oxidação do AIA. Nos voltamogramas apresentados em (B) foi possível identificar um pico de redução do AIA em -0,74 V, mas após alguns ciclos observamos que o eletrodo pode estar sofrendo envenenamento da superfície, possivelmente devido à adsorção do analito.

Figura B4. Voltamogramas cíclicos do AIA. (A) pH 4 e (B) pH 8. (—) solução-tampão fosfato; (—) AIA 50 mg L⁻¹; (—) AIA 100 mg L⁻¹; (—) AIA 250 mg L⁻¹; e (—) AIA 500 mg L⁻¹. Nos voltamogramas apresentados em (A) além de não ser possível observar um pico de redução definido, com o aumento da concentração os sinais de corrente diminuem, sendo o oposto do previsto. Os voltamogramas em (B) apresentam as mesmas semelhanças, mas com intensidade de corrente mais baixa quando comparado com (A), esse resultado pode estar relacionado com a diferença de pH do eletrólito suporte.

Figura B5. Voltamogramas cíclicos do AIA. (—) tampão PBS pH 7,4; (—) AIA 50 mg L⁻¹; (—) AIA 100 mg L⁻¹. Nos ciclos voltamétricos apresentados podemos observar a diminuição da intensidade de sinal de corrente para a redução do AIA. No primeiro ciclo na concentração de 50 mg L⁻¹ se observa um pico de redução em -0,84 V, o potencial que poderia ser utilizado para estudos de amperometria; contudo, como nos resultados já apresentados anteriormente, nesse eletrólito suporte pode também estar ocorrendo o envenenamento da superfície do eletrodo, possivelmente pela adsorção do analito em estudo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1. Manufatura aditiva	16
2.2. Impressão 3D na química analítica	17
2.2.1. Células eletroquímicas impressas	17
2.2.2. Eletrodos impressos	19
2.3. Sistema BIA	20
2.3.1. BIA com detecção amperométrica	21
2.4. Fitormônios e detecção eletroquímica de AIA	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1. Impressão da célula eletroquímica e eletrodos	24
4.2. Ativação do eletrodo de trabalho	25
4.3. Caracterização da superfície do eletrodo de trabalho	26
4.4. Sistema de trabalho	26
4.5. Padronização do método de análise	27
4.5.1. Limite de detecção (LD).....	27
4.5.2. Limite de quantificação (LQ)	28
4.5.3. Repetibilidade.....	28
4.5.4. Linearidade e faixa linear de trabalho	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Tratamento e caracterização do eletrodo de trabalho	29
5.1.1. Procedimentos de ativação	29
5.1.2. Caracterização por FTIR	31
5.1.3. Caracterização por MEV	32
5.2. Comportamento eletroquímico do AIA em diferentes eletrólitos	34
5.2.1. Comportamento eletroquímico do AIA em NaOH	35
5.3. Padronização do método de análise	36
5.3.1. Estudo de linearidade.....	37
5.3.2. Curva analítica, LD e LQ	38

5.3.3. Estudo de repetibilidade	39
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
8. ANEXO A.....	49
9. ANEXO B.....	50

1. INTRODUÇÃO

A manufatura aditiva, comumente conhecida como impressão 3D, tem despertado grande atenção devido a rapidez e baixo custo no *design* e produção de novos materiais. A matéria-prima utilizada no processo de impressão (filamento) pode ser condutivo e não condutivo; este último vem sendo utilizado em muitas áreas de pesquisa, como na química analítica ¹. Na eletroquímica, muitos estudos são desenvolvidos a partir da impressão de sistemas complexos para a identificação e quantificação de compostos, geralmente com rapidez, baixo custo e fácil operação ^{2,3,4,5}.

No sistema de análise por injeção em batelada (BIA), constituído por uma célula eletroquímica e três eletrodos, o eletrodo de trabalho deve ser de um metal que não corrói facilmente, como ouro, platina ou de formas alotrópicas de carbono que sejam bons condutores elétricos, como o grafeno. No entanto, os eletrodos desses materiais são dispendiosos, o que inviabiliza sua ampla utilização em análises rotineiras. Com o intuito de contornar este problema, tem sido cada vez maior a utilização de filamentos condutivos impregnados com *carbon black* para impressão de eletrodos de trabalho, principalmente de ácido polilático (CB-PLA) ^{4,6}, e poliacrilonitrila butadieno estireno (CB-ABS) ^{7,8}. Contudo, muitos aspectos devem ser considerados nestes estudos, como a geometria e orientação de impressão do eletrodo ⁹; o tratamento do eletrodo, para a exposição da estrutura de carbono condutora, que geralmente está sobposta pelo polímero plástico ¹⁰; e o eletrodo precisa ser testado para a detecção do analito de interesse, ou mesmo de um grupo de analitos.

Os estudos utilizando eletrodos de trabalho condutivos ABS e PLA para impressão de eletrodos de trabalho relatam a detecção de diversos analitos. Cardoso et al. evidenciaram a detecção de trinitrotolueno (TNT) com eletrodo impresso com filamento PLA condutivo, além do baixo limite de detecção (LD) ($1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), os autores apresentaram a vantagem do eletrodo ser reutilizado após um procedimento de ativação mecânica (lixamento) ⁶. O filamento de PLA condutivo também foi utilizado em um outro estudo para impressão de eletrodo que, após a ativação mecânica e eletroquímica, foi utilizado para detecção de cobre em amostras de biocombustíveis; obtiveram um LD de $0,097 \mu\text{g L}^{-1}$ e (LQ) de $0,323 \mu\text{g L}^{-1}$. Os autores concluíram que as análises com o eletrodo apresentaram resultados promissores, possibilitando sua produção em larga escala e, ao acoplar em equipamentos portáteis, pode ser utilizado no controle de qualidade em postos de combustíveis ¹¹. Oliveira et al. estudaram a detecção de vitamina B2 e B6 com um

eletrodo impresso com filamento de ABS condutivo. Os resultados foram satisfatórios com as análises de amostras farmacêuticas, LD e LQ foram de 0,15 e 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para vitamina B2; e 10 e 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para vitamina B6, respectivamente ¹².

Estudos que visam a utilização de eletrodos de trabalho impresso podem ser desenvolvidos para outros analitos, ampliando a utilização desta técnica, a qual dispõe das vantagens de baixo custo e fácil utilização quando comparada com outras técnicas de análises, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) ¹³, Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CGMS) ¹⁴. Apesar de diversos estudos relatarem a detecção e quantificação de AIA por eletroquímica, a técnica em muitos casos se torna dispendiosa pela utilização de eletrodos de trabalho de alto custo.

Wang et al. montaram um sistema eletroquímico para detecção de AIA; contudo, os autores fizeram um tratamento sobre uma fita de carbono com nanotubos de carbono de múltiplas camadas seguido de um tratamento com plasma de oxigênio ¹⁵. Um estudo semelhante empregou do mesmo procedimento para produzir um sensor para detecção de AIA ¹⁶. Para avaliar o efeito de estresse salino em girassóis na produção de AIA, Li et al. fabricaram um imunossensor eletroquímico (biossensor eletroquímico) com eletrodo de disco de ouro e posterior imobilização do dendrímero poliamidoamina. Em um estudo de detecção *in vivo* de AIA em plântulas de soja, os autores fabricaram um eletrodo de aço inoxidável com eletrodeposição de nanopartículas de ouro e prata, materiais que elevam o custo do eletrodo ¹⁷. Em vista disto, torna-se relevante estudar novos tipos de eletrodos de trabalho, a fim de fornecer métodos de análises de baixo custo.

Nesta perspectiva, este estudo teve como objetivo desenvolver uma célula eletroquímica e eletrodo de trabalho impressos para detecção e quantificação de ácido indol-3-acético (AIA). A célula foi impressa com filamento não condutivo e o eletrodo de trabalho com filamento condutivo; o eletrodo foi submetido a alguns processos de ativação e então utilizado no sistema BIA. Por fim, realizamos a padronização do método de análise, e este foi aplicado na determinação de AIA em uma amostra real.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Manufatura aditiva

Manufatura aditiva, mais conhecida como impressão em três dimensões, é um processo de impressão que utiliza diferentes materiais aquecidos a altas temperaturas para o desenho de objetos nas dimensões XYZ. O processo geral, do *design* até a parte final, se prossegue em cinco etapas principais: desenhar o modelo digital 3D, sendo o Design Auxiliado por Computador (*Computer Aided Design*, CAD) a maneira mais comum; converter o arquivo do modelo 3D em um arquivo que a impressora possa interpretar, o *STereoLithography* (STL) é o arquivo mais utilizado para conversão, então o objeto é enviado para um programa de fatiamento, o qual a impressora irá interpretar para imprimir o objeto; a impressão, a própria impressão do material pela impressora; remoção do objeto impresso da impressora, essa etapa é a simples separação do objeto da mesa de impressão; por fim, o pós processamento, essa etapa varia de impressora para impressora, como algumas impressões demandam um tratamento com luz UV ¹⁸.

Dentre as matérias-primas manipulada na impressão 3D se destacam os termoplásticos, os quais são polímeros que podem ser derretidos e solidificados por diversas vezes sem perder suas propriedades. A forma mais comum de impressão empregando termoplásticos é impressão com filamento fundido (*Fused Filament Fabrication*, FFF); um carretel de filamento é carregado pela impressora, então aquecido a alta temperatura (> 200 °C) na extrusora, e então modelado o objeto ¹⁸. Outras matérias-primas amplamente utilizadas são os filamentos condutivos, também constituído de polímeros, porém com adição de compostos condutivos como carbono (grafeno, *carbon black*, etc.).

Na literatura, os estudos publicados utilizam majoritariamente dois filamentos condutivos, o *carbon black* impregnado em ácido polilático (CB-PLA) ¹⁹ e o *carbon black* impregnado em acrilonitrila butadieno estireno (CB-ABS) ⁷. Contudo, devido às limitações encontradas em impressões com filamentos condutivos, estudos vêm desenvolvendo novos polímeros condutivos para solucionar problemas de aplicações. Yuk et al. desenvolveram um polímero condutivo de alta performance para impressão 3D, que pode ser convertido em microestruturas altamente condutivas ²⁰.

2.2. Impressão 3D na química analítica

Considerando que os polímeros condutivos podem ser empregados na produção de peças que conduzem corrente elétrica, a impressão 3D despertou grande interesse da química analítica. A principal aplicação dessa tecnologia na química analítica é a impressão de sensores eletroquímicos, oferecendo vantagens interessantes quando comparado com os métodos convencionais, já que podem diminuir custos de produção e rápida resposta sensorial ²¹. Além disso, a velocidade e versatilidade da impressão são excepcionais, uma vez que a segunda permite a impressão de sensores com complexas formas geométricas ²².

As características morfológicas e estruturais de dispositivos e sensores eletroquímicos impressos podem ser selecionadas de acordo com a necessidade no *software* de fatiamento antes da impressão. O próprio *design* do objeto a ser impresso pode ser alterado de acordo com o método de impressão; com isso, a técnica amplamente utilizada para impressão tanto para a química quanto para a engenharia é a modelagem de deposição fundida (*Fused Deposition Modeling*, FDM) ²¹. Ademais, a impressão 3D na química analítica vem sendo empregada para produção de células para análises espectroeletroquímicas ^{23, 24}; dispositivos fluídicos para amperometria com injeção em fluxo ²⁵; células eletroquímicas ^{4, 26}; e eletrodos ^{9, 27}.

2.2.1. Células eletroquímicas impressas

Células eletroquímicas são dispositivos onde a transferência de elétrons de reações químicas geram corrente elétrica; a corrente pode ser gerada a partir de reações de oxirredução espontâneas, ou mesmo após a introdução de energia elétrica externa para reações não espontâneas. O funcionamento espontâneo de uma célula eletroquímica, com a geração de corrente elétrica a partir de uma reação química, denomina-se de célula galvânica; em outro caso, quando é aplicado uma diferença de potencial por uma fonte externa de energia elétrica, fornecendo elétrons para as reações ocorrerem, temos a célula eletrolítica ²⁸.

As células eletroquímicas mencionadas, geralmente, são constituídas por dois eletrodos, o de referência e o de trabalho. Entretanto, hoje em dia se trabalha com células contendo três eletrodos: o eletrodo de referência; o eletrodo de trabalho, que irá reduzir ou oxidar a espécie a ser detectada (o analito) e a corrente é medida de acordo com a diferença de potencial; o contra eletrodo (ou auxiliar), como o próprio nome diz, esse

eletrodo auxilia na célula viabilizando um caminho para o fluxo de elétrons. Dessa forma, o potencial do eletrodo de referência não é alterado quando o potencial do de trabalho muda, mantendo a mesma diferença de potencial durante toda a análise ²⁹.

O modelo relativamente simples de células eletroquímicas permite que elas sejam impressas com diversas modelagens; o eletrodo de trabalho, por exemplo, pode estar posicionado na posição vertical no plano superior da célula, ou mesmo encaixado base da célula. Com isto, a versatilidade de formas de células eletroquímicas na impressão 3D é ainda maior.

A impressão 3D na eletroquímica possibilitou o desenvolvimento de muitos modelos de células para estudos eletroquímicos; o modelo pode variar conforme necessidade e técnica empregada nas análises. Além disso, a principal característica nesses estudos é o baixo custo das peças impressas. O'Neil et al. desenvolveram e imprimiram uma célula eletroquímica de fluxo com impressão em única etapa utilizando filamentos de PLA condutivo e não condutivo; a célula possibilita um fluxo hidrodinâmico por meio de canais internos e, apesar de terem observado um LD de catecol de $1,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ por voltametria, os autores destacam que esse limite pode ser melhor com a alteração da geometria da célula ³⁰.

Apresentando um outro modelo de célula eletroquímica impressa, Richter et al. também imprimiram todo o aparato eletroquímico necessário para as análises (célula, eletrodo de trabalho, contra eletrodo e o eletrodo de referência) com filamento CB-PLA e ABS; e destacam que o volume da célula é de 5 mL para fins práticos ⁴. O modelo da célula permite que a sustentação do contra eletrodo e eletrodo de trabalho seja na base superior, e o eletrodo de trabalho é posicionado na base inferior, onde é inserido em um compartimento na base da célula; a base superior ainda conta com um pequeno orifício onde é feita a injeção do analito ⁴. Com um modelo diferente dos anteriores, Ferreira et al. desenvolveram uma célula eletroquímica onde os três eletrodos ficam dispostos na base, onde fazem o contato elétrico com um controlador externo, e o modelo para uso de eletrodo de trabalho planar; a célula ainda conta com a vantagem de uso de pequenos volumes da solução eletrolítica (0,5 – 3,0 mL) ³¹.

Diante das aplicações de células impressas na eletroquímica, nota-se a crescente aplicação de eletrodos impressos nesses sistemas de análise, principalmente para substituição do eletrodo de trabalho, que geralmente é feito com materiais caros como diamante dopado com boro (DDP), platina, grafeno, etc. Os eletrodos de trabalho

impressos estão sendo aplicado tanto em sistemas BIA quanto em sistemas com análise por injeção em fluxo (*Flow Injection Analysis*, FIA), com medições amperométricas e voltamétricas ²⁶.

2.2.2. Eletrodos impressos

Os eletrodos empregados nas análises eletroquímicas devem ser de materiais resistentes, ou seja, que não corroem em contato com os eletrólitos ou analitos que serão estudados. O eletrodo de trabalho, especificamente, pode ser impresso em ouro ³², grafeno ³³, ³; no entanto, devido ao alto custo da matéria-prima, muitos estudos vêm desenvolvendo eletrodos de trabalho impressos a partir de materiais de baixo custo, como citado anteriormente, de CB-PLA e CB-ABS.

A orientação, geralmente, é um aspecto considerado na impressão dos eletrodos; imprimindo eletrodos nas direções vertical e horizontal, Hamzah et al. observaram que não houve alteração na resposta capacitiva. Contudo, o eletrodo impresso na vertical apresentou redução na resistência de transferência de carga. Os autores concluíram que eletrodos impressos na direção vertical têm performance eletroquímica superior comparado ao da posição horizontal ⁹. Em um outro estudo, Abdalla et al. analisaram não só a orientação de impressão, como também a espessura de camada de filamento depositado, variando entre 0,1 e 0,4 mm ³⁴. Com a caracterização eletroquímica, os autores mostraram que o aumento da espessura de camada implica na diminuição da condutividade do material, a qual reduz ainda mais com quando impresso na posição horizontal. Após o processo de impressão com filamentos condutivos, é necessário a ativação da superfície do eletrodo, isto é, a remoção do excesso de polímero ABS ou PLA para a então exposição da estrutura de carbono que é responsável por conduzir corrente elétrica.

Kalinke et al. reportaram diferentes propriedades eletroquímicas de eletrodos impressos com grafeno-PLA sobre diferentes métodos de ativação ¹⁰. No estudo, foram testados seis métodos de ativação da superfície do eletrodo: eletroquímico, mecânico (polimento), solvente (dimetilformamida – DMF), meio básico (NaOH) e meio ácido (HNO₃ e H₂SO₄). O solvente DMF com NaOH combinados com a ativação eletroquímica promoveram um aumento da área eletroativa, com isto, melhor resposta eletroquímica e taxa de transferência de elétrons. Este eletrodo ainda apresentou alta resposta eletroquímica para dopamina, em diferentes técnicas voltamétricas (voltametria cíclica,

voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada). Apesar da estrutura de carbono ser grafeno, este estudo pode fornecer discernimento sobre os métodos de ativação para serem empregados na ativação de eletrodos impressos de CB-PLA ou CB-ABS.

Após a ativação do eletrodo, prossegue-se para a caracterização eletroquímica e a detecção de analitos em si. Contudo, apesar de muitos estudos reportarem o uso de filamentos condutivos, ainda são poucos os quais empregam o CB-ABS e CB-PLA para impressão de eletrodos de trabalho, especialmente na detecção de fitormônio; desta maneira, há um grande campo de exploração para o uso destes filamentos em estudos eletroquímicos para a detecção e quantificação de diferentes compostos.

2.3.Sistema BIA

O sistema BIA é amplamente utilizado desde a sua criação em 1991. Nesse sistema, uma pequena quantidade de amostra é injetada com uma micropipeta na superfície do detector (eletrodo de trabalho, configuração do tipo *wall-jet*), onde o sinal tem aspecto transiente que reflete a passagem do analito pelo sensor ³⁵. Quando comparada com a técnica FIA, o sistema BIA apresenta ser menos versátil na adaptação para detecção de reações química longas, sendo mais favorável às reações ácido-base e enzimáticas ³⁶. Além disso, tem-se também algumas limitações em relação à automação e procedimentos em linha; contudo, essas são apenas algumas características da técnica, não sendo consideradas desvantagens ³⁷. O sistema BIA, por sua vez, apresenta vantagens semelhantes ao sistema FIA, como a quantidade de amostra que pode ser analisada por tempo, acuracidade, sensibilidade e reprodutibilidade ³⁸.

Em reações químicas rápidas entre o analito e o eletrodo no momento da injeção, a intensidade do sinal de resposta será proporcional à concentração do analito em questão. Diante disto, é importante que a injeção seja precisa e reproduzida da maneira mais parecida possível, para que o sinal de resposta não esteja sujeito a erros, que poderia, conseqüentemente, levar a erros nos cálculos de concentração. O uso de micropipetas eletrônicas é o mais recomendado em análises no sistema BIA, justamente para permitir que a operação seja altamente reprodutível ³⁷, principalmente, em análises de padronização de método. No entanto, devido à diferentes questões (principalmente financeira), não se tem micropipetas eletrônicas em todos os laboratórios. Assim, em muitos casos, os estudos são realizados com micropipetas comuns, as quais não fornecem

total reprodutibilidade dos dados, mas são uma alternativa aceita para obtenção de resultados.

2.3.1. BIA com detecção amperométrica

O sinal do analito, a partir de reações com o eletrodo de trabalho, pode ser observada a partir de diferentes detectores. Por espectroscopia, Wang & Agnes (1993) realizaram um estudo com espectrofotômetro convencional para análises automáticas em alta velocidade. Os autores converteram o compartimento de amostra do espectrofotômetro em um reservatório com solução de branco. A amostra então é injetada com uma pipeta computadorizada no feixe de radiação, e logo dispersa em solução. A rápida passagem pelo feixe gera um pico com sinal transiente que está relacionado com a concentração do analito ³⁹. Outros detectores, como fluorimétricos, potenciométricos, voltamétricos e amperométricos, partem do mesmo princípio de funcionamento, sendo mais comum a utilização de amperometria para obtenção de resultados, com uma gama de materiais diferentes servindo como eletrodo de trabalho ³⁷.

A amperometria consiste em medidas de corrente elétrica em um potencial fixo de trabalho em função do tempo, que se difere da voltametria, onde o potencial varia em função do tempo. Contudo, um sensor amperométrico pode ser considerado um sensor voltamétrico de acordo com o potencial aplicado, sendo denominada de amperometria convencional; sendo que as reações de oxidação e redução do analito injetado acontecem na interface eletrodo/solução ³⁷.

Dentro da amperometria ainda temos subdivisões ou análises alternativas que podem ser implementadas no sistema BIA, que são a detecção amperométrica pulsada (*Pulsed Amperometric Detection*, PAD) e a amperometria de múltiplos pulsos (*Multiple Pulse Amperometry*, MPA). O método PAD normalmente se baseia em uma forma de onda de potencial triplo que facilita a limpeza do sistema, reativando a superfície do eletrodo após cada ciclo de medição. Por ser muito rápida (milissegundos) o sistema permite várias medidas em um curto período de tempo ⁴⁰. Já no método MPA, pulsos de potenciais são aplicados em um único eletrodo de trabalho, e o sinal de resposta do analito é obtido sem precisar de pré-tratamento químico da amostra, como purificação, ou mesmo a modificação do eletrodo de trabalho ⁴¹. No entanto, a necessidade ou não de realizar um pré-tratamento da amostra irá depender do conteúdo da amostra; caso nela contenha compostos que gerem sinais no mesmo potencial deve ser realizado algum processo de

purificação ou extração, principalmente, se são nos mesmos potenciais que geram resposta do analito de interesse.

As duas técnicas citadas acima, utilizadas como formas alternativas para a limpeza constante do eletrodo de trabalho, são importantes de serem consideradas devido ao problema de contaminação do eletrodo de trabalho durante as análises; pois a gradativa contaminação pode diminuir a área de trabalho do eletrodo, afetando a repetibilidade do sinal analítico ³⁷.

2.4. Fitormônios e detecção eletroquímica de AIA

Fitormônios são moléculas pequenas que funcionam como reguladores essenciais no crescimento das plantas, e em pequenas concentrações têm efeitos fisiológicos consideráveis, que influenciam no desenvolvimento da planta e na resistência a estresses ⁴². Alguns fitormônios são derivados de indol, como o AIA (Figura 1), que é uma auxina com função de regulação na divisão celular.

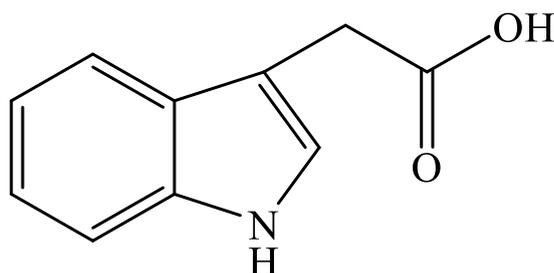


Figura 1. Estrutura química do AIA.

Fonte: Autor.

O AIA pode ser produzido por microrganismos e plantas, tendo na sua via metabólica o aminoácido triptofano como substrato; as enzimas que atuam como catalisadores nas reações para produção de AIA conduzem em até sete vias para sua produção ⁴³. Visto que a produção e/ou absorção de AIA pelas plantas tem um papel fundamental no crescimento e no seu bom desenvolvimento, este fitormônio se tornou foco de estudo há décadas ^{44, 45, 46, 47, 48}. Assim como o emprego de diferentes técnicas analíticas para detecção e quantificação, como a eletroanalítica.

A molécula do AIA pode sofrer processos de oxidação eletroquímica, o que permite sua identificação por eletroquímica. Com o intuito de detectar AIA e ácido salicílico (AS) em diversas partes de plântulas de ervilha, Sun et al. desenvolveram um

sensor eletroquímico com detecção por voltametria de pulso diferencial, sendo o sensor composto por uma fita de carbono aderida a um vidro condutivo e recoberta com óxido de grafeno¹⁶. Para as análises, os autores cortaram pequenas partes das mudas de ervilha, e colocaram sobre o eletrodo de trabalho para quantificação com base nos picos de corrente, desta maneira, conseguiram identificar as variações de concentração de AIA e AS nas plântulas. A detecção simultânea de AIA e AS também foi realizada por Cao et al., na qual a interface sensorial foi fabricada com hidrogel de grafeno poroso sobre um eletrodo de carbono vítreo⁴⁹, com o emprego da voltametria de varredura linear nas análises. O sensor apresentou boa seletividade e estabilidade, com um LD de 1,42 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o AIA.

Na literatura, os estudos que reportam a detecção de AIA apresentam um pré-tratamento do eletrodo de trabalho antes da análise em si. Com a utilização de vários métodos para a funcionalização do eletrodo, principalmente em casos de imunossensores^{17, 50, 51, 52}, tornam a técnica de alto custo. Não foi encontrado na literatura, até o momento, o uso de eletrodos de trabalho impressos com filamentos condutivos CB-PLA e CB-ABS para detecção de AIA pelo método BIA, o que torna promissora a realização deste estudo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi desenvolver um novo método de análise para quantificação de AIA.

3.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Viabilizar um sistema de trabalho para análises eletroquímicas por meio do método BIA;
- Definir um eletrólito suporte para análises de determinação de AIA;
- Definir o potencial de trabalho para determinação de AIA;
- Padronizar o método de análise de AIA por amperometria;
- Quantificar de AIA em amostras reais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Impressão da célula eletroquímica e eletrodos

O modelo 3D da célula eletroquímica e eletrodos foram projetados no programa Blender® (Figura 2). A célula eletroquímica foi impressa com filamento ABS não condutivo (GTMaX 3D) em uma impressora GTMaX 3D, com as seguintes configurações: temperatura da extrusora de 220 °C; temperatura da mesa de 110 °C; tempo para impressão da base, corpo e tampa da célula de 26 horas e 17 minutos; quantidade de filamento para impressão das mesmas peças de 182,99 gramas; valor calculado de R\$ 40,25 (Figura 3). O eletrodo de trabalho foi impresso na mesma impressora com filamento condutivo PLA-CB (Proto-pasta), com as seguintes configurações: temperatura da extrusora de 220 °C; temperatura da mesa de 60 °C; tempo para impressão de 11 minutos; quantidade de filamento de 0,59 gramas; valor calculado para cada eletrodo de R\$ 0,70 (Figura 4).

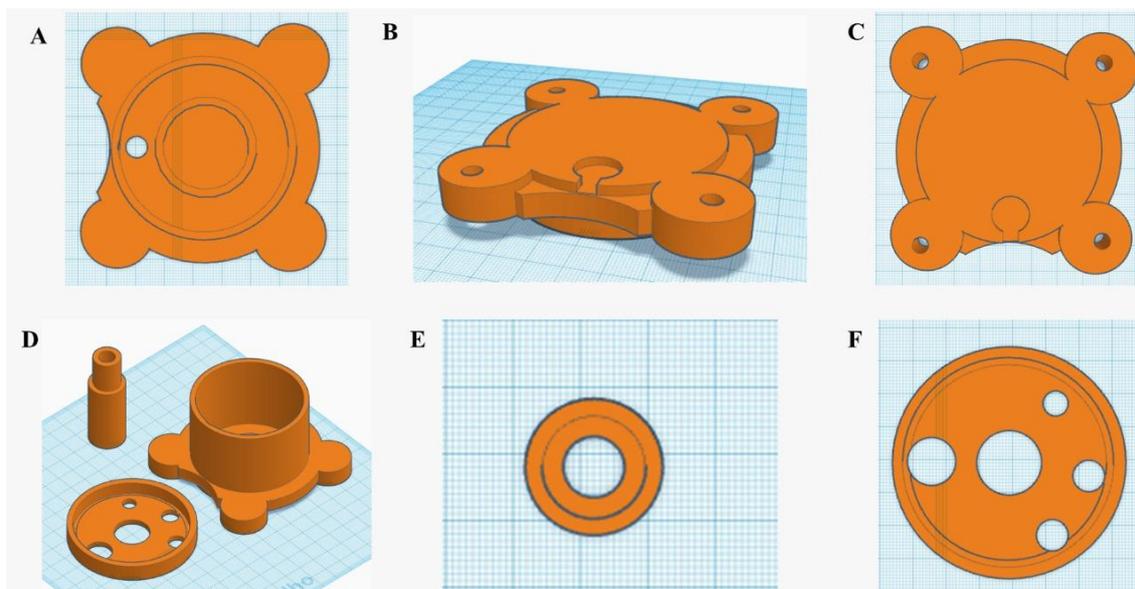


Figura 2. Modelo 3D da célula eletroquímica. (A) Vista superior do corpo da célula; (B) Vista frontal da base da célula; (C) Vista superior da base da célula; (D) Corpo e tampa da célula, e peça de encaixe da pipeta eletrônica; (E) Vista superior da peça.

Fonte: Autor.



Figura 3. Célula eletroquímica impressa na impressora GTMaX 3D com filamento ABS não condutivo.

Fonte: Autor.

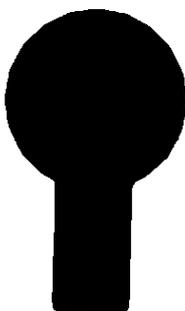


Figura 4. Eletrodo de trabalho impresso na impressora GTMaX 3D com filamento PLA-CB condutivo.

Fonte: Autor.

4.2. Ativação do eletrodo de trabalho

Um estudo com diferentes métodos de ativação do eletrodo de trabalho foi realizado para selecionar o de melhor eficiência. A eficiência foi avaliada por voltametria cíclica, na qual observamos qual método proporcionou maior corrente de oxidação e redução da sonda redox (azul de metileno). Foram gerados voltamogramas cíclicos com o eletrodo impresso sem tratamento, e com os seguintes tratamentos:

- ativação mecânica (lixamento em lixa Norton Água T401 Grão 1500, com água ultrapura até apresentar uma superfície homogênea);
- tratamento ácido (HNO_3 0.1 M) por 1 hora;*;
- tratamento ácido (H_2SO_4 0.1 M) por 1 hora;*;
- tratamento com solvente (DMF)*;
- tratamento básico (NaOH 0,5 M) por 1 hora* ; e
- ativação eletroquímica (-1,0 V por 200 segundos seguido de +1,4 V por 200 segundos em NaOH 0,5 M).

*o eletrodo foi lixado previamente, como no primeiro tratamento.

4.3. Caracterização da superfície do eletrodo de trabalho

Para avaliar as mudanças na superfície do eletrodo após dois processos de ativação (ativação mecânica e ativação eletroquímica) e ciclos voltamétricos com o AIA (10 ciclos -1,0 a +1,3 V), o eletrodo foi analisado por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR/NIR, Perkin Elmer Frontier) no modo de reflectância total atenuada (ATR), na região espectral de 650 a 4000 cm^{-1} . Além disso, o eletrodo também foi caracterizado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (JEOL IT300LV), para observar a superfície dele impresso, após ativação mecânica e ativado eletroquimicamente.

4.4. Sistema de trabalho

A célula eletroquímica de três eletrodos conta com o eletrodo de trabalho impresso com área geométrica de 0,5 cm^2 - definida pelo diâmetro interno (8 mm) do *O-ring* posicionado na base do corpo da célula, como observado na figura 3 -, eletrodo de referência de Ag/AgCl (3 M KCl), e eletrodo auxiliar de platina. As medidas de voltametria cíclica e amperometria foram realizadas utilizando o potenciostato *homemade* do Laboratório de Materiais e Eletroanalítica. Todas as análises de voltametria cíclica foram realizadas com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

A célula eletroquímica impressa com filamento ABS não condutivo foi desenvolvida de acordo com o emprego da técnica de análise BIA; a célula pode comportar um volume de até 150 mL (Figura 5).

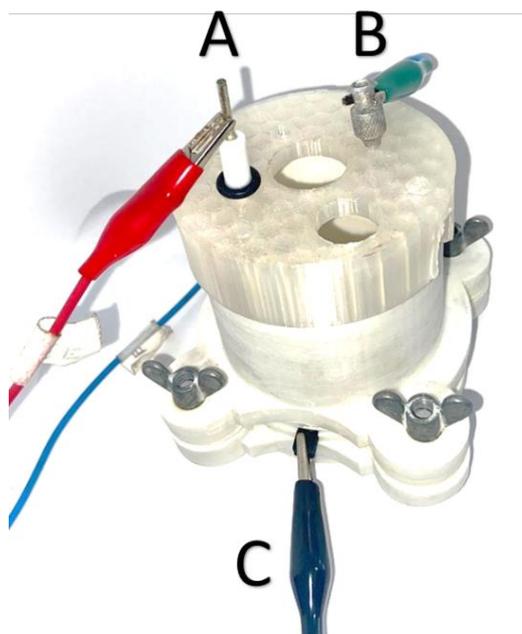


Figura 5. Célula eletroquímica impressa com os três eletrodos. (A) eletrodo de referência Ag/AgCl (3 M KCl); (B) eletrodo auxiliar de platina; e (C) eletrodo de trabalho impresso.
Fonte: Autor.

No emprego da técnica BIA, o eletrodo de trabalho fica posicionado na base da célula, e os eletrodos auxiliar e de referência ficam posicionados na parte superior da célula (na tampa). As injeções foram realizadas por meio de um orifício na tampa da célula, o qual permite o acesso à superfície do eletrodo de trabalho. As injeções foram realizadas com uma pipeta eletrônica da marca *Jetta*, modelo M1200.

4.5. Padronização do método de análise

4.5.1. Limite de detecção (LD)

O LD é a concentração mais baixa que pode ser detectada com confiança estatística aceitável. Contudo, tal concentração não é necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas no método de análise⁵³. O LD também é definido como a concentração do analito que apresenta uma resposta confiável superior ao desvio padrão do branco⁵⁴, de acordo com a equação:

$$LD = \frac{3DPb}{b}$$

onde DPd é o desvio padrão do branco ($n = 10$) e b é a sensibilidade da curva analítica (coeficiente angular).

4.5.2. Limite de quantificação (LQ)

O LQ é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis⁵³. Há diferentes métodos de se calcular o valor de LQ; contudo, aqui o valor será estimado a partir da curva analítica, pela seguinte equação:

$$LQ = \frac{10DPd}{b}$$

4.5.3. Repetibilidade

A repetibilidade pode ser determinada de maneira quantitativa a partir de medidas sucessivas do analito, seguindo as mesmas condições dispostas:

- Mesmo analista;
- Mesmo laboratório;
- Mesmo equipamento;
- Em curto intervalo de tempo.

A repetibilidade está diretamente relacionada com a dispersão entre os resultados encontrados⁵³. O analito utilizado deve estar com concentração dentro da faixa linear de trabalho; a repetibilidade é determinada a partir do desvio padrão ou desvio padrão relativo de uma série de medidas desse mesmo analito³⁷, sendo calculado com a seguinte equação:

$$DPR\% = \frac{DPx}{\bar{x}} \times 100$$

onde DPx é o desvio padrão da concentração e \bar{x} é a medida da concentração encontrada.

4.5.4. Linearidade e faixa linear de trabalho

A linearidade de um método é uma faixa de trabalho onde a resposta do analito é proporcional à sua concentração. Para qualquer método analítico é necessário determinar a faixa linear de trabalho; no ponto mais baixo de concentração os fatores limitantes são o LD e/ou LQ, e o ponto de maior concentração o fato limitante dependerá de vários fatores, como o sistema de resposta do instrumento⁵⁵.

Para determinar a linearidade deve ser realizado uma padronização interna ou externa e a formulação da equação matemática que relaciona a resposta do analito com a sua concentração ⁵³. A equação que relaciona as duas variáveis é dada como:

$$y = a + bx$$

onde y é a resposta dada pelo instrumento, como área ou altura de pico; a é o coeficiente linear, o qual intersecta o eixo y quando $x = 0$; b é o coeficiente angular, sendo a inclinação da curva analítica ou mesmo a sensibilidade; e x é a concentração do analito.

A partir dos dados experimentais também é possível calcular o coeficiente de correlação linear (r), o qual fornece uma estimativa da qualidade da curva analítica; quando mais próximo de 1, maior a confiança da curva analítica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi realizar a padronização de um método eletroquímico de análise para determinação de AIA, com um sistema de trabalho (célula eletroquímica e eletrodo de trabalho) impressos em impressora 3D. Para tanto, o foco foi direcionado para o sensor utilizado (eletrodo de trabalho impresso com filamento condutivo) tanto para sua caracterização quanto para avaliação da performance eletroquímica frente à detecção de AIA.

5.1. Tratamento e caracterização do eletrodo de trabalho

5.1.1. Procedimentos de ativação

O eletrodo de trabalho foi submetido a uma série de procedimentos de ativação para avaliar qual o melhor método a ser seguido. Dentre os métodos de ativação mecânica, com solução ácida, solução básica e solvente orgânico, o procedimento de ativação mecânica seguido de ativação eletroquímica foi o que resultou melhor performance eletroquímica do eletrodo de trabalho (Figura 6).

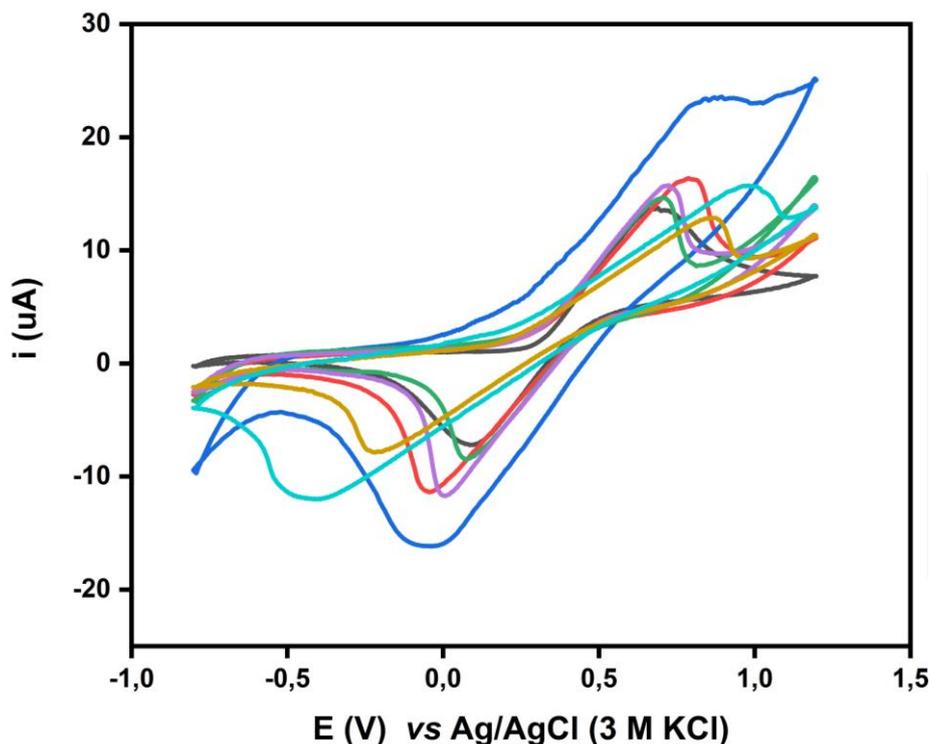


Figura 6. Voltamogramas cíclicos de azul de metileno como sonda redox para diferentes procedimentos de ativação do eletrodo de trabalho. (—) sem tratamento; (—) ativação mecânica; (—) HNO₃; (—) H₂SO₄; (—) DMF; (—) NaOH; (—) ativação mecânica seguido de ativação eletroquímica.

Fonte: Autor.

Os procedimentos de ativação do eletrodo após sua impressão têm a finalidade de desgastar a superfície, removendo o excesso do PLA, para então aumentar a performance eletroquímica por meio da transferência de elétrons. O resultado observado corrobora com os resultados encontrados por Kalinke *et al.* (2019), o qual realizou diferentes procedimentos de ativação de eletrodos de trabalho impresso com filamento PLA-grafeno. O hidróxido quebra as ligações de éster da estrutura do polímero criando grupos oxigenados, carboxilas e hidroxilas¹⁰; expondo o material condutor, que em nosso estudo é o *carbon black*. Além disso, a etapa subsequente de ativação eletroquímica desenvolve melhora da performance na transferência de elétrons devido a exfoliação e redução do condutor¹⁰.

O processo de ativação mecânica seguido da ativação eletroquímica do eletrodo foi realizado antes de todas as análises.

5.1.2. Caracterização por FTIR

O eletrodo de trabalho foi analisado por FTIR para avaliar a possível alteração dos grupos funcionais da superfície sem tratamento, após a ativação mecânica, após a ativação eletroquímica e após ciclos voltamétricos com o AIA (Figura 7).

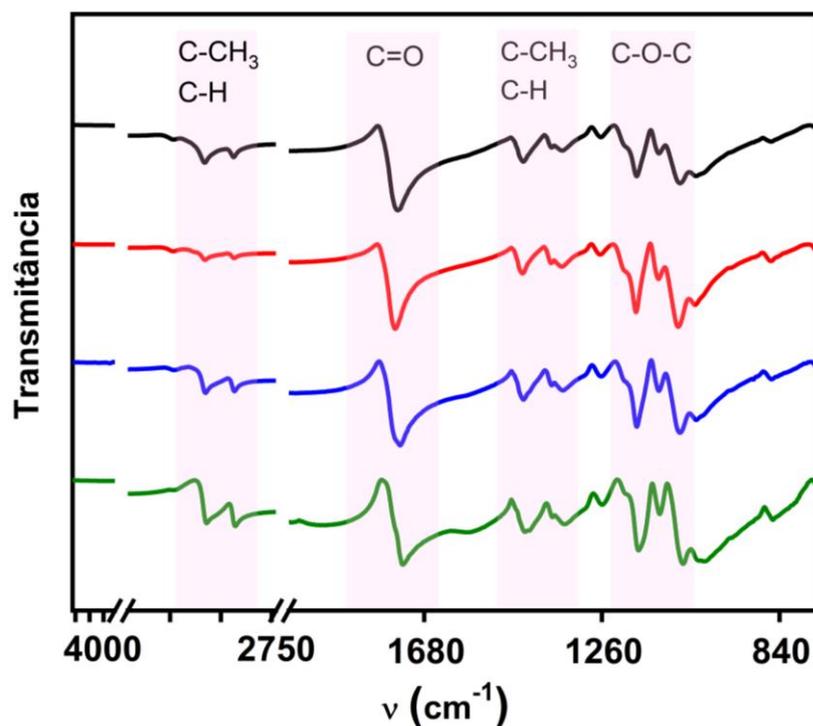


Figura 7. Espectros de FTIR do eletrodo de trabalho. (—) sem tratamento; (—) após a ativação mecânica; (—) após a ativação eletroquímica; (—) após ciclos voltamétricos com o analito.

Fonte: Autor.

Não foi observado nenhuma mudança significativa dos grupos funcionais presentes na superfície do eletrodo, mesmo após ciclos voltamétricos com o analito. As bandas observadas são características dos grupos funcionais da estrutura do PLA (Figura 8), que é o polímero onde o material condutor (*carbon black*) está impregnado.

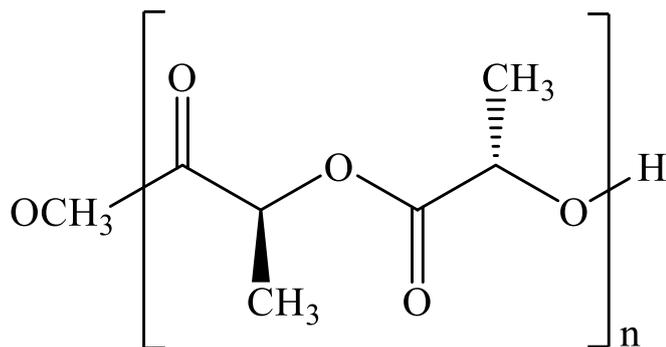


Figura 8. Estrutura química do polímero PLA.

Fonte: Autor.

As bandas nas regiões de 1045, 1093-1180 cm^{-1} são características do estiramento da ligação C-CH₃ e estiramento assimétrico da ligação C-O-C, respectivamente. A banda em 1360 cm^{-1} é associada ao dobramento simétrico e assimétrico da ligação C-H. Já em 1450 cm^{-1} o dobramento assimétrico está associado ao grupo CH₃. A banda em 1757 cm^{-1} é característica do estiramento da ligação C=O. Por fim, as bandas nas regiões de 2800 e 2900 cm^{-1} são referentes ao estiramento simétrico da ligação C-H e estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-CH₃, respectivamente ⁵⁶.

5.1.3. Caracterização por MEV

As micrografias de MEV foram obtidas com intuito de observar as alterações morfológicas do eletrodo sem tratamento e após dois diferentes procedimentos de tratamento (ativação mecânica e ativação eletroquímica) (Figura 9). As imagens (A) e (B) são do eletrodo impresso sem tratamento; é possível observar nitidamente as linhas de impressão do filamento na imagem (A) com amplificação de 30x; já na imagem (B), com amplificação de 1000x podemos observar que a superfície do eletrodo apresenta ser rígida e sem deformações.

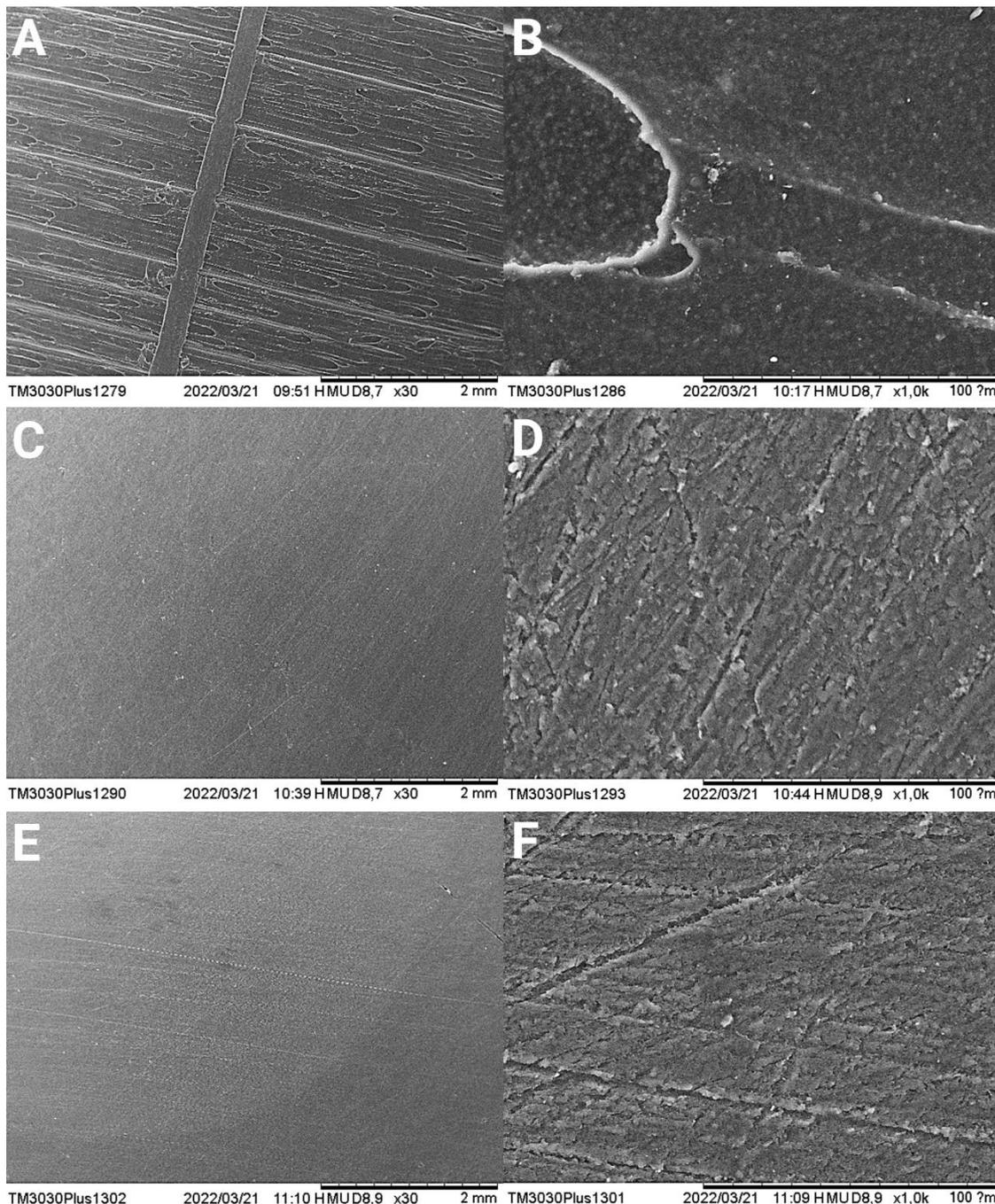


Figura 9. Micrografias de MEV do eletrodo impresso (A e B), eletrodo ativado mecanicamente (C e D) e eletrodo ativado eletroquimicamente (E e F).

Fonte: Autor.

As imagens (C) e (D) mostram a superfície do eletrodo após a ativação mecânica, com amplificação de 30x e 1000x, respectivamente. Já as imagens (E) e (F) são referentes ao eletrodo após a ativação eletroquímica, com amplificação de 30x e 1000x. Observa-se em (C) e (E) que após os dois processos o eletrodo apresentou uma superfície mais

homogênea e sem deformações. Além disso, observamos que para as imagens (D) e (F) não houveram alterações significativas na superfície; no entanto, isso está associado às ampliações das imagens. Para melhor observar as alterações morfológicas, as imagens devem ser obtidas com amplificação de até 10.000x, assim seria possível verificar a exposição dos aglomerados de *carbon black* devido à remoção do excesso de PLA, como são observados em diferentes estudos na literatura ^{4, 6, 31, 57}.

5.2. Comportamento eletroquímico do AIA em diferentes eletrólitos

Realizou-se um estudo do comportamento eletroquímico do AIA em diferentes eletrólitos, com variação do pH, para escolher aquele com melhor performance, ou seja, que apresentasse pico de redução ou oxidação definido em algum potencial. Deste modo, considerando alguns estudos científicos, foram realizados voltamogramas cíclicos em quatro meios eletrólitos suporte (Anexo B): tampão ácido cítrico- Na_2HPO_4 (pH 2,6, 4,6 e 6,6); tampão Britton-Robinson 80 % (pH 4, 6, 8 e 10); tampão fosfato (pH 4 e 8); e tampão PBS (pH 7,4 e 13). No entanto, em nenhum dos eletrólitos suporte estudados foi possível escolher uma região de potencial definida em que houvesse oxidação ou redução do AIA, devido aos picos largos. Além disso, em alguns casos, foi levantado a hipótese de possível envenenamento da superfície do eletrodo de trabalho, podendo ser devido a adsorção do analito. Este problema pode ser contornado com a utilização de NaOH 0,5 M (pH 13,5) como eletrólito suporte na célula eletroquímica. Com esse eletrólito suporte foi possível observar um pico de redução do AIA com maior intensidade de corrente no potencial de -0,4 V (Figura 10). Além disso, não foi observado nenhum indício de envenenamento da superfície do eletrodo com NaOH como eletrólito suporte, com manutenção do pico de corrente após três ciclos voltamétricos (Anexo A).

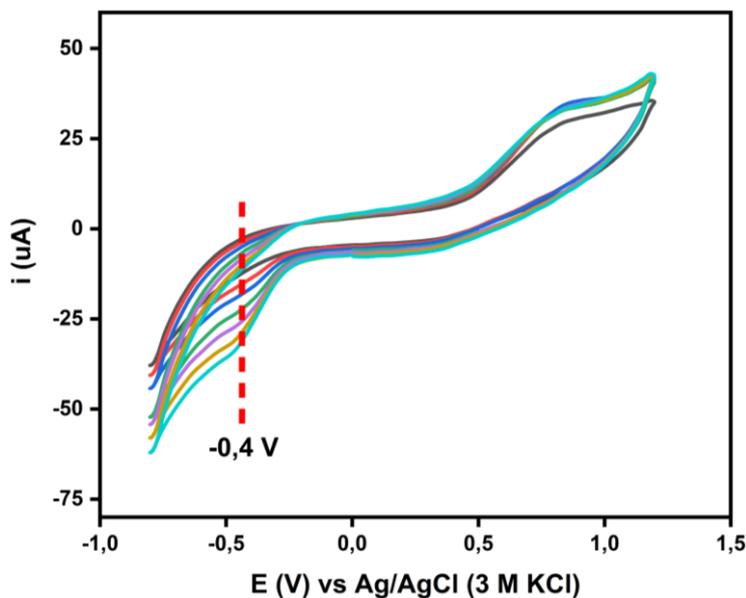


Figura 10. Voltamogramas cíclicos realizados com variação de potencial entre -0,8 a +1,2. (—) NaOH (0,5 M); (—) AIA 10 mg L⁻¹; (—) AIA 20 mg L⁻¹; (—) AIA 40 mg L⁻¹; e (—) AIA 60 mg L⁻¹; (—) AIA 80 mg L⁻¹; (—) AIA 100 mg L⁻¹.

Fonte: Autor.

Os ciclos voltamétricos foram realizados separadamente para as diferentes concentrações; em cada ciclo foi adicionado uma alíquota da solução estoque (5.000 mg L⁻¹) de acordo com a concentração final desejada. Na faixa de concentração de 10 – 100 mg L⁻¹ a corrente aumentou linearmente com o aumento da concentração ($R^2 = 0,997$). Diante disto, o potencial de -0,4 V foi escolhido para padronização do método de análise por amperometria.

5.2.1. Comportamento eletroquímico do AIA em NaOH

O pico de corrente catódica, referente à redução do AIA no potencial de -0,4 V em NaOH, pode estar relacionado à uma reação irreversível que está ocorrendo com o ganho de dois elétrons para formação de duas ligações duplas juntamente à perda de um próton, conforme o mecanismo proposto (Figura 11).

Não foi encontrado, até o presente momento, nenhum estudo que relata a redução do AIA em eletrodos. Além disso, também não foi encontrado na literatura nenhum estudo para determinação de AIA com eletrodo impresso com filamento condutivo. Em diferentes estudos, com diferentes eletrodos de trabalho, são relatados apenas reações de oxidação do AIA em diferentes regiões de potencial, sendo devido a mudança da natureza

do eletrodo. Hu et al. (2020) desenvolveram um sensor ratiométrico multifuncional para detecção simultânea de AIA e AS; demonstraram que o AIA oxida no potencial de 0,75 V. Em um outro estudo, utilizando um eletrodo modificado de aço inoxidável, os autores relataram que a oxidação do AIA ocorria perto de 0,7 V ¹⁷.

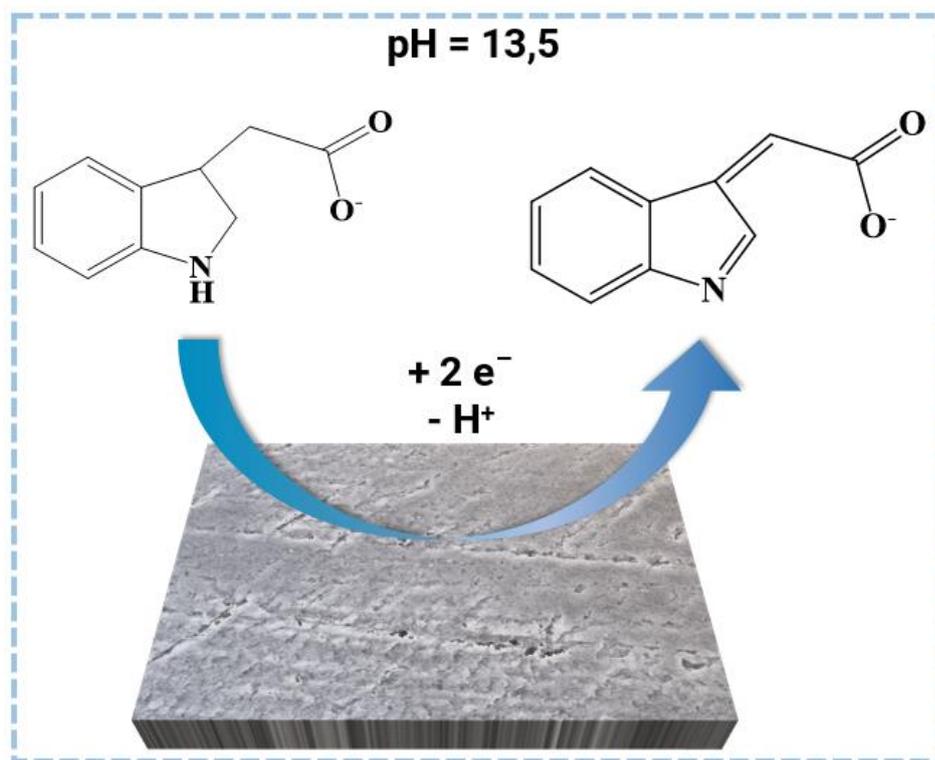


Figura 11. Mecanismo proposto para a redução irreversível do AIA no eletrodo de trabalho, em meio básico.

Fonte: Autor.

5.3. Padronização do método de análise

Antes da padronização do método foi investigado o efeito da agitação da solução sobre os sinais de corrente. Observa-se que sem a agitação da solução a corrente leva cerca de 100 s para retornar à linha de base, sendo possível a realização de 36 injeções h⁻¹; já com a solução em agitação a corrente retorna à linha de base em cerca de 60 segundos, possibilitando realizar até 60 injeções h⁻¹ (Figura 12). O aumento da frequência analítica foi significativo; assim, todas as análises subsequentes foram realizadas com agitação da solução na célula.

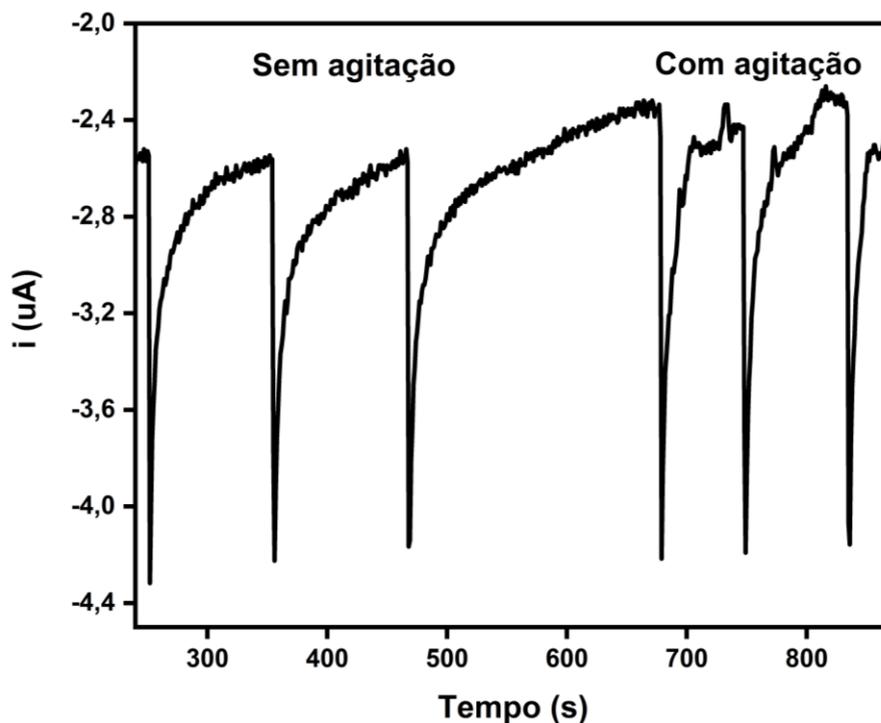


Figura 12. Comparação dos resultados sem e com agitação da solução na célula eletroquímica. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Eletrólito suporte: NaOH (0,5 M).

Fonte: Autor.

5.3.1. Estudo de linearidade

O estudo de linearidade mostra qual a faixa de concentração que apresenta sinais analíticos proporcionais. Para este estudo foi preparada uma série de concentrações, diluídas a partir da solução estoque de 5.000 mg L^{-1} . Foi observado que a linearidade se mantém até a concentração de 50 mg L^{-1} (Figura 13). A partir de 50 mg L^{-1} observamos que o sinal de corrente diminui, não sendo proporcional à concentração analisada. Desta maneira, podemos selecionar a faixa de concentração que constituirá a curva analítica.

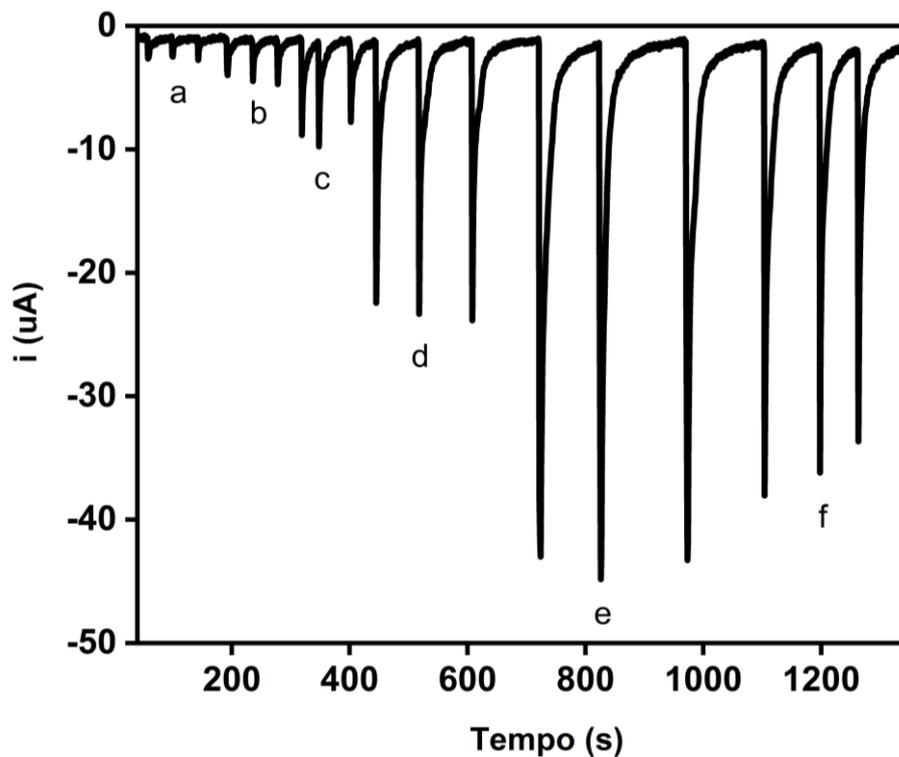


Figura 13. Estudo de linearidade em triplicata realizado por amperometria. (a) 1 mg L^{-1} ; (b) 5 mg L^{-1} ; (c) 10 mg L^{-1} ; (d) 25 mg L^{-1} ; (e) 50 mg L^{-1} ; (f) 100 mg L^{-1} . Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Eletrólito suporte: NaOH ($0,5 \text{ M}$).

Fonte: Autor.

5.3.2. Curva analítica, LD e LQ

A curva analítica do AIA foi realizada com as concentrações que estão dentro da faixa linear analisada anteriormente (Figura 14). A partir do amperograma e da curva analítica podemos calcular os valores de LD e LQ. O valor de LD calculado foi de $0,65 \text{ mg L}^{-1}$ ($3,71 \text{ }\mu\text{M}$), e o LQ foi de $2,16 \text{ mg L}^{-1}$ ($12,3 \text{ }\mu\text{M}$).

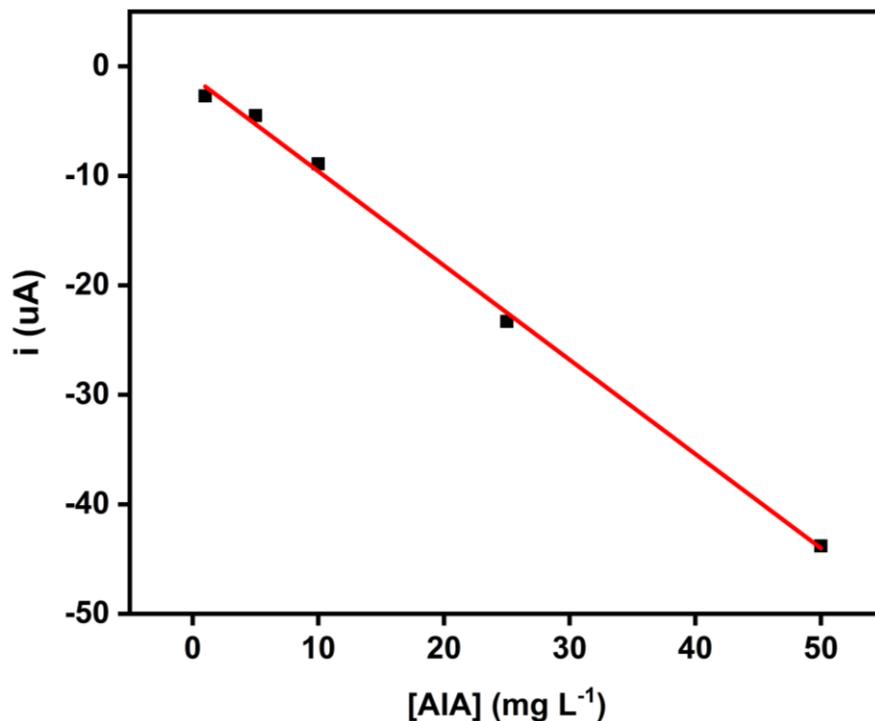


Figura 14. Curva analítica do AIA ($R^2 = 0,998$). Equação: $\mu\text{A} = -0,977 + (-0,86) \times \text{mg L}^{-1}$.
¹. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Eletrólito suporte: NaOH (0,5 M).

Fonte: Autor.

5.3.3. Estudo de repetibilidade

Medidas sucessivas do AIA em duas concentrações (5 e 25 mg L^{-1}) foram realizadas para avaliar a repetibilidade do método (Figura 15); as duas concentrações escolhidas estão dentro da faixa linear. O DPR ($n = 9$) foi de 0,88 e 1,27 % para 5 e 25 mg L^{-1} , respectivamente. Esses resultados demonstram que não houve o efeito de memória entre injeções sucessivas, representando a boa estabilidade do eletrodo ⁵⁸.

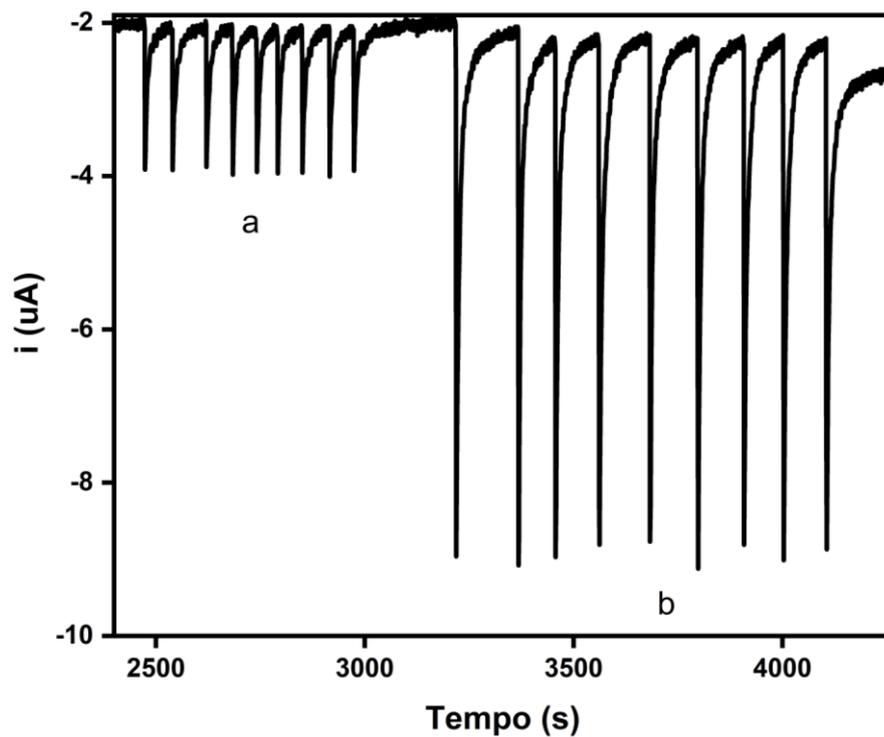


Figura 15. Estudo de repetibilidade do método de análise nas mesmas condições da curva analítica. (a) 5 mg L^{-1} e (b) 25 mg L^{-1} . Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Eletrólito suporte: NaOH ($0,5 \text{ M}$).

Fonte: Autor.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste estudo foi apresentado, pela primeira vez, a padronização de um método de análise para determinação de AIA. A caracterização do eletrodo demonstrou que para a melhor performance eletroquímica deve ser realizado a ativação mecânica seguido de ativação eletroquímica. Em suma, a utilização de uma célula eletroquímica e eletrodo de trabalho impresso representa um sistema de baixo custo promissor para quantificação de AIA em amostras reais, por meio da técnica BIA. Para trabalhos futuros, seguem algumas melhorias: análise de MEV com mais amplificação para observar os aglomerados de *carbon black*; otimização do modelo da célula eletroquímica para evitar rachaduras, as quais podem gerar vazamentos; estudar novos métodos de ativação para estudos com outros eletrólitos suporte; e análise cromatográfica da matriz da amostra onde contém o analito de interesse para estudo de possíveis interferentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Agrawaal, H.; Thompson, J. E. Additive Manufacturing (3D Printing) for Analytical Chemistry. *Talanta Open* **2021**, *3* (November 2020), 100036. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100036>.
- (2) Ambrosi, A.; Pumera, M. 3D-Printing Technologies for Electrochemical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (10), 2740–2755. <https://doi.org/10.1039/c5cs00714c>.
- (3) Browne, M. P.; Novotný, F.; Sofer, Z.; Pumera, M. 3D Printed Graphene Electrodes' Electrochemical Activation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (46), 40294–40301. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b14701>.
- (4) Richter, E. M.; Rocha, D. P.; Cardoso, R. M.; Keefe, E. M.; Foster, C. W.; Munoz, R. A. A.; Banks, C. E. Complete Additively Manufactured (3D-Printed) Electrochemical Sensing Platform. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (20), 12844–12851. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02573>.
- (5) Cardoso, R. M.; Silva, P. R. L.; Lima, A. P.; Rocha, D. P.; Oliveira, T. C.; do Prado, T. M.; Fava, E. L.; Fatibello-Filho, O.; Richter, E. M.; Muñoz, R. A. A. 3D-Printed Graphene/Poly(lactic Acid) Electrode for Bioanalysis: Biosensing of Glucose and Simultaneous Determination of Uric Acid and Nitrite in Biological Fluids. *Sensors Actuators, B Chem.* **2020**, *307* (December 2019), 127621. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127621>.
- (6) Cardoso, R. M.; Rocha, D. P.; Rocha, R. G.; Stefano, J. S.; Silva, R. A. B.; Richter, E. M.; Muñoz, R. A. A. 3D-Printing Pen versus Desktop 3D-Printers: Fabrication of Carbon Black/Poly(lactic Acid) Electrodes for Single-Drop Detection of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1132*, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.034>.
- (7) Dawoud, M.; Taha, I.; Ebeid, S. J. Strain Sensing Behaviour of 3D Printed Carbon Black Filled ABS. *J. Manuf. Process.* **2018**, *35* (July 2017), 337–342. <https://doi.org/10.1016/j.jmapro.2018.08.012>.
- (8) N, J.; P, S. Application of 3D Printed ABS Based Conductive Carbon Black Composite Sensor in Void Fraction Measurement. *Compos. Part B Eng.* **2019**, *159* (September 2018), 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.09.097>.
- (9) Bin Hamzah, H. H.; Keattch, O.; Covill, D.; Patel, B. A. The Effects of Printing

- Orientation on the Electrochemical Behaviour of 3D Printed Acrylonitrile Butadiene Styrene (ABS)/Carbon Black Electrodes. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27188-5>.
- (10) Kalinke, C.; Neumsteir, N. V.; Aparecido, G. D. O.; Ferraz, T. V. D. B.; Dos Santos, P. L.; Janegitz, B. C.; Bonacin, J. A. Comparison of Activation Processes for 3D Printed PLA-Graphene Electrodes: Electrochemical Properties and Application for Sensing of Dopamine. *Analyst* **2020**, *145* (4), 1207–1218. <https://doi.org/10.1039/c9an01926j>.
- (11) João, A. F.; Squissato, A. L.; Richter, E. M.; Muñoz, R. A. A. Additive-Manufactured Sensors for Biofuel Analysis: Copper Determination in Bioethanol Using a 3D-Printed Carbon Black/Polylactic Electrode. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *412* (12), 2755–2762. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02513-y>.
- (12) de Oliveira, G. C.; Pereira, L. C.; Silva, A. L.; Semaan, F. S.; Castilho, M.; Ponzio, E. A. Acrylonitrile-Butadiene-Styrene (ABS) Composite Electrode for the Simultaneous Determination of Vitamins B2 and B6 in Pharmaceutical Samples. *J. Solid State Electrochem.* **2018**, *22* (5), 1607–1619. <https://doi.org/10.1007/s10008-018-3897-z>.
- (13) Prasad, K.; Das, A. K.; Oza, M. D.; Brahmabhatt, H.; Siddhanta, A. K.; Meena, R.; Eswaran, K.; Rajyaguru, M. R.; Ghosh, P. K. Detection and Quantification of Some Plant Growth Regulators in a Seaweed-Based Foliar Spray Employing a Mass Spectrometric Technique sans Chromatographic Separation. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (8), 4594–4601. <https://doi.org/10.1021/jf904500e>.
- (14) Qin, G.; Zou, K.; Tian, L.; Li, Y. Determination of Five Plant Growth Regulator Containing Carboxyl in Bean Sprouts Based on Chemical Derivatization by GC-MS. *Food Anal. Methods* **2018**, *11* (9), 2628–2635. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1255-5>.
- (15) Wang, Q.; Li, X.; Tang, L.; Fei, Y.; Pan, Y.; Sun, L. Paper-Based Electroanalytical Devices for in Situ Determination of Free 3-Indoleacetic Acid and Salicylic Acid in Living *Pyropia Haitanensis* Thallus under Various Environmental Stresses. *J. Appl. Phycol.* **2020**, *32* (1), 485–497. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01913-7>.
- (16) Sun, L. J.; Zhou, J. J.; Pan, J. L.; Liang, Y. Y.; Fang, Z. J.; Xie, Y.; Yang, H.; Gu, H. Y.; Bao, N. Electrochemical Mapping of Indole-3-Acetic Acid and Salicylic Acid in Whole Pea Seedlings under Normal Conditions and Salinity. *Sensors Actuators, B Chem.* **2018**, *276* (August), 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.08.152>.

- (17) Li, H.; Wang, C.; Wang, X.; Hou, P.; Luo, B.; Song, P.; Pan, D.; Li, A.; Chen, L. Disposable Stainless Steel-Based Electrochemical Microsensor for in Vivo Determination of Indole-3-Acetic Acid in Soybean Seedlings. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *126* (August 2018), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.041>.
- (18) Redwood, B.; Schöffner, F.; Garret, B. *The 3D Printing Handbook*; Coers & Roest: Amsterdam, The Netherlands, 2017.
- (19) Flowers, P. F.; Reyes, C.; Ye, S.; Kim, M. J.; Wiley, B. J. 3D Printing Electronic Components and Circuits with Conductive Thermoplastic Filament. *Addit. Manuf.* **2017**, *18* (2017), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.addma.2017.10.002>.
- (20) Yuk, H.; Lu, B.; Lin, S.; Qu, K.; Xu, J.; Luo, J.; Zhao, X. 3D Printing of Conducting Polymers. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 4–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15316-7>.
- (21) Cardoso, R. M.; Kalinke, C.; Rocha, R. G.; dos Santos, P. L.; Rocha, D. P.; Oliveira, P. R.; Janegitz, B. C.; Bonacin, J. A.; Richter, E. M.; Munoz, R. A. A. Additive-Manufactured (3D-Printed) Electrochemical Sensors: A Critical Review. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1118*, 73–91. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.028>.
- (22) Hamzah, H. H.; Shafiee, S. A.; Abdalla, A.; Patel, B. A. 3D Printable Conductive Materials for the Fabrication of Electrochemical Sensors: A Mini Review. *Electrochem. commun.* **2018**, *96* (August), 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2018.09.006>.
- (23) Dos Santos, M. F.; Katic, V.; Dos Santos, P. L.; Pires, B. M.; Formiga, A. L. B.; Bonacin, J. A. 3D-Printed Low-Cost Spectroelectrochemical Cell for in Situ Raman Measurements. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (16), 10386–10389. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01518>.
- (24) Wirth, D. M.; Sheaff, M. J.; Waldman, J. V.; Symcox, M. P.; Whitehead, H. D.; Sharp, J. D.; Doerfler, J. R.; Lamar, A. A.; Leblanc, G. Electrolysis Activation of Fused-Filament-Fabrication 3D-Printed Electrodes for Electrochemical and Spectroelectrochemical Analysis. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (9), 5553–5557. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01331>.
- (25) Bishop, G. W.; Satterwhite, J. E.; Bhakta, S.; Kadimisetty, K.; Gillette, K. M.; Chen, E.; Rusling, J. F. 3D-Printed Fluidic Devices for Nanoparticle Preparation and Flow-Injection Amperometry Using Integrated Prussian Blue Nanoparticle-Modified Electrodes. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (10), 5437–5443. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00903>.

- (26) Cardoso, R. M.; Mendonça, D. M. H.; Silva, W. P.; Silva, M. N. T.; Nossol, E.; da Silva, R. A. B.; Richter, E. M.; Muñoz, R. A. A. 3D Printing for Electroanalysis: From Multiuse Electrochemical Cells to Sensors. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1033*, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.021>.
- (27) Rocha, D. P.; Squissato, A. L.; da Silva, S. M.; Richter, E. M.; Munoz, R. A. A. Improved Electrochemical Detection of Metals in Biological Samples Using 3D-Printed Electrode: Chemical/Electrochemical Treatment Exposes Carbon-Black Conductive Sites. *Electrochim. Acta* **2020**, *335*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.135688>.
- (28) Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O. *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*, 1st ed.; Bookcraft: Oxford, 1993.
- (29) Mabbott, G. A. *Electroanalytical Chemistry: Principles, Best Practices, and Case Studies*, 1st ed.; John Wiley & Sons: Chennai, 2020.
- (30) O’Neil, G. D.; Ahmed, S.; Halloran, K.; Janusz, J. N.; Rodríguez, A.; Terrero Rodríguez, I. M. Single-Step Fabrication of Electrochemical Flow Cells Utilizing Multi-Material 3D Printing. *Electrochem. commun.* **2019**, *99* (November 2018), 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2018.12.006>.
- (31) Ferreira, P. A.; de Oliveira, F. M.; de Melo, E. I.; de Carvalho, A. E.; Lucca, B. G.; Ferreira, V. S.; da Silva, R. A. B. Multi Sensor Compatible 3D-Printed Electrochemical Cell for Voltammetric Drug Screening. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1169*, 338568. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338568>.
- (32) Cheng, T. S.; Nasir, M. Z. M.; Ambrosi, A.; Pumera, M. 3D-Printed Metal Electrodes for Electrochemical Detection of Phenols. *Appl. Mater. Today* **2017**, *9*, 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.07.005>.
- (33) Katic, V.; Dos Santos, P. L.; Dos Santos, M. F.; Pires, B. M.; Loureiro, H. C.; Lima, A. P.; Queiroz, J. C. M.; Landers, R.; Muñoz, R. A. A.; Bonacin, J. A. 3D Printed Graphene Electrodes Modified with Prussian Blue: Emerging Electrochemical Sensing Platform for Peroxide Detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (38), 35068–35078. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b09305>.
- (34) Abdalla, A.; Hamzah, H. H.; Keattch, O.; Covill, D.; Patel, B. A. Augmentation of Conductive Pathways in Carbon Black/PLA 3D-Printed Electrodes Achieved through Varying Printing Parameters. *Electrochim. Acta* **2020**, *354*, 136618. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136618>.

- (35) Wang, J.; Taha, Z. Batch Injection Analysis. *Anal. Chem.* **1991**, *63* (10), 1053–1056. <https://doi.org/10.1002/9783527623259.ch4>.
- (36) Wang, J. Injection Analysis-From Flow-Injection Analysis to Batch-Injection Analysis. *Microchem. J.* **1992**, *45* (2), 219–224. [https://doi.org/10.1016/0026-265X\(92\)90011-Q](https://doi.org/10.1016/0026-265X(92)90011-Q).
- (37) Pereira, P. F. Uso Do Eletrodo de Diamante Dopado Com Boro Acoplado a Um Sistema BIA Para Determinação Simultânea de Princípios Ativos Em Medicamentos. **2012**, 156.
- (38) Tormin, T. F.; Cunha, R. R.; Da Silva, R. A. B.; Munoz, R. A. A.; Richter, E. M. Combination of Screen-Printed Electrodes and Batch Injection Analysis: A Simple, Robust, High-Throughput, and Portable Electrochemical System. *Sensors Actuators, B Chem.* **2014**, *202*, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.04.096>.
- (39) Angnes, L.; Angnes, L. Batch Injection Spectroscopy. *Anal. Lett.* **1993**, *26* (11), 2329–2339. <https://doi.org/10.1080/00032719308017473>.
- (40) Islam, M. A.; Mahbub, P.; Nesterenko, P. N.; Paull, B.; Macka, M. Prospects of Pulsed Amperometric Detection in Flow-Based Analytical Systems - A Review. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1052*, 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.066>.
- (41) Medeiros, R. A.; Lourenção, B. C.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O. Simple Flow Injection Analysis System for Simultaneous Determination of Phenolic Antioxidants with Multiple Pulse Amperometric Detection at a Boron-Doped Diamond Electrode. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (20), 8658–8663. <https://doi.org/10.1021/ac101921f>.
- (42) Zhao, B.; Liu, Q.; Wang, B.; Yuan, F. Roles of Phytohormones and Their Signaling Pathways in Leaf Development and Stress Responses. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (12), 3566–3584. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07908>.
- (43) Garcia, D. C.; Cheng, X.; Land, M. L.; Standaert, R. F.; Morrell-Falvey, J. L.; Doktycz, M. J. Computationally Guided Discovery and Experimental Validation of Indole-3-Acetic Acid Synthesis Pathways. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14* (12), 2867–2875. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00725>.
- (44) Seeley, S. D.; Powell, L. E. Gas Chromatography and Detection of Microquantities of Gibberellins and Indoleacetic Acid as Their Fluorinated Derivatives. *Anal. Biochem.* **1974**, *58* (1), 39–46. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(74\)90438-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(74)90438-2).
- (45) Göran, S.; Andersson, B.; Dunberg, A. IDENTIFICATION OF 3-INDOLEACETIC ACID IN *p*INUS. **1981**, *205*, 125–137.

- (46) Hu, T.; Dryhurst, G. Electrochemical Oxidation of Indole-3-Acetic Acid: Mechanisms and Products Formed in Acidic Medium. *J. Electroanal. Chem.* **1993**, 362 (1–2), 237–248. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(93\)80026-E](https://doi.org/10.1016/0022-0728(93)80026-E).
- (47) Liscum, E.; Reed, J. W. Genetics of Aux/IAA and ARF Action in Plant Growth and Development. *Plant Mol. Biol.* **2002**, 49 (3–4), 387–400. <https://doi.org/10.1023/A:1015255030047>.
- (48) Bulíčková, J.; Sokolová, R.; Giannarelli, S.; Muscatello, B. Determination of Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid in Aqueous Solution. *Electroanalysis* **2013**, 25 (1), 303–307. <https://doi.org/10.1002/elan.201200394>.
- (49) Cao, X.; Zhu, X.; He, S.; Xu, X.; Ye, Y. Electro-Oxidation and Simultaneous Determination of Indole-3-Acetic Acid and Salicylic Acid on Graphene Hydrogel Modified Electrode. *Sensors (Switzerland)* **2019**, 19 (24). <https://doi.org/10.3390/s19245483>.
- (50) Zhou, Y.; Xu, Z.; Wang, M.; Meng, X.; Yin, H. Electrochemical Immunoassay Platform for High Sensitivity Detection of Indole-3-Acetic Acid. *Electrochim. Acta* **2013**, 96, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.02.046>.
- (51) Yin, H.; Xu, Z.; Zhou, Y.; Wang, M.; Ai, S. An Ultrasensitive Electrochemical Immunosensor Platform with Double Signal Amplification for Indole-3-Acetic Acid Determinations in Plant Seeds. *Analyst* **2013**, 138 (6), 1851–1857. <https://doi.org/10.1039/c3an36526c>.
- (52) Li, H.; Hu, Y.; Li, A.; Wang, X.; Hou, P.; Wang, C.; Chen, K.; Zhao, C. A Highly Sensitive Electrochemical Impedance Immunosensor for Indole-3-Acetic Acid and Its Determination in Sunflowers under Salt Stress. *RSC Adv.* **2017**, 7 (86), 54416–54421. <https://doi.org/10.1039/c7ra09979g>.
- (53) INMETRO. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. *Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia*. 2016, p 31.
- (54) Skoog; West; Holler; Crouch. *Fundamentos de Química Analítica*, 8th ed.; Thomson, 2006. <https://doi.org/10.1021/ja00871a056>.
- (55) EURACHEMGuide. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*; Eurachem, 1998.
- (56) Riba, J. R.; Cailloux, J.; Cantero, R.; Canals, T.; MasPOCH, M. L. Multivariable Methods Applied to FTIR: A Powerful Technique to Highlight Architectural Changes in Poly(Lactic Acid). *Polym. Test.* **2018**, 65 (December 2017), 264–269.

<https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.12.003>.

(57) Rocha, D. P.; Squizzato, A. L.; da Silva, S. M.; Richter, E. M.; Munoz, R. A. A. Improved Electrochemical Detection of Metals in Biological Samples Using 3D-Printed Electrode: Chemical/Electrochemical Treatment Exposes Carbon-Black Conductive Sites. *Electrochim. Acta* **2020**, *335*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.135688>.

(58) Pereira, P. F.; Da Silva, W. P.; Muñoz, R. A. A.; Richter, E. M. A Simple and Fast Batch Injection Analysis Method for Simultaneous Determination of Phenazopyridine, Sulfamethoxazole, and Trimethoprim on Boron-Doped Diamond Electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2016**, *766*, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.01.034>.

8. ANEXO A

Neste anexo estão presentes as análises de voltametria cíclica do AIA em NaOH com três ciclos voltamétricos. As imagens mostram que mesmo após alguns ciclos a corrente de redução do AIA se mantém, sem nenhum indício de envenenamento da superfície do eletrodo de trabalho.

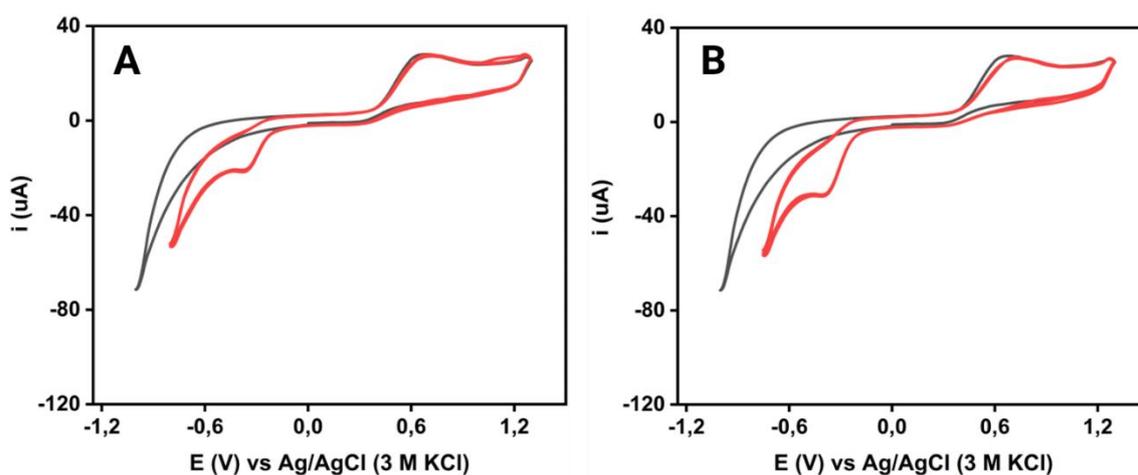


Figura A1. Voltamogramas cíclicos do AIA em NaOH (0,5 M). (A) [AIA]: 50 mg L⁻¹; (B) [AIA]: 100 mg L⁻¹. (—) NaOH (0,5 M); (—) AIA 50 mg L⁻¹ em (A); (—) AIA 100 mg L⁻¹ em (B).

Fonte: Autor.

9. ANEXO B

As análises de voltametria cíclica que não apresentaram perfis ideais para a escolha de um potencial de trabalho são apresentadas a seguir.

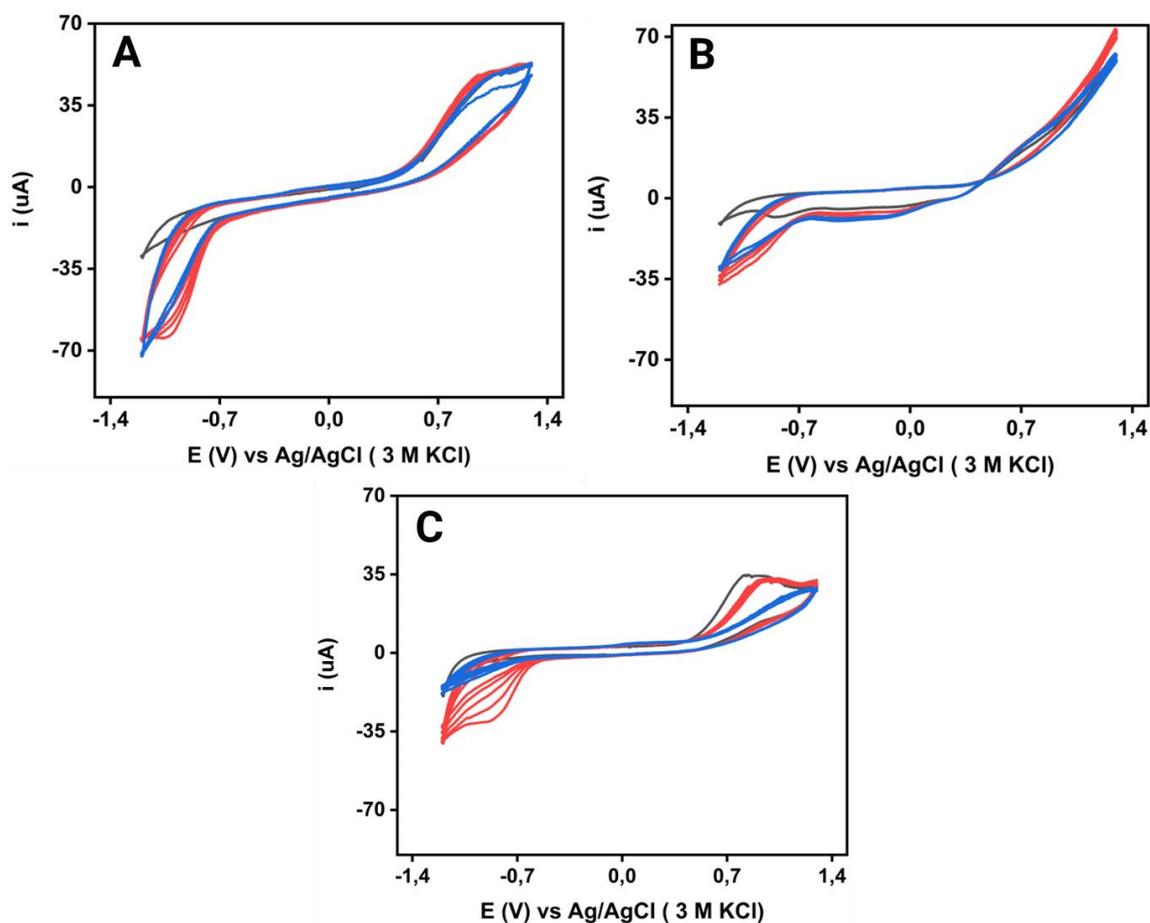


Figura B1. Voltamogramas cíclicos do AIA. (A) pH 2,6; (B) pH 4,6; (C) pH 6,6. (—) ácido cítrico- Na_2HPO_4 ; (—) AIA 50 mg L^{-1} ; (—) AIA 100 mg L^{-1} . Nos voltamogramas (A) e (B) não foi possível identificar um pico de potencial definido de redução ou oxidação do AIA. Já no voltamograma (C), foi possível identificar um pico de redução do AIA em $-0,86 \text{ V}$; contudo, após alguns ciclos observamos que o eletrodo pode estar sofrendo envenenamento da superfície, possivelmente devido à adsorção do analito.

Fonte: Autor.

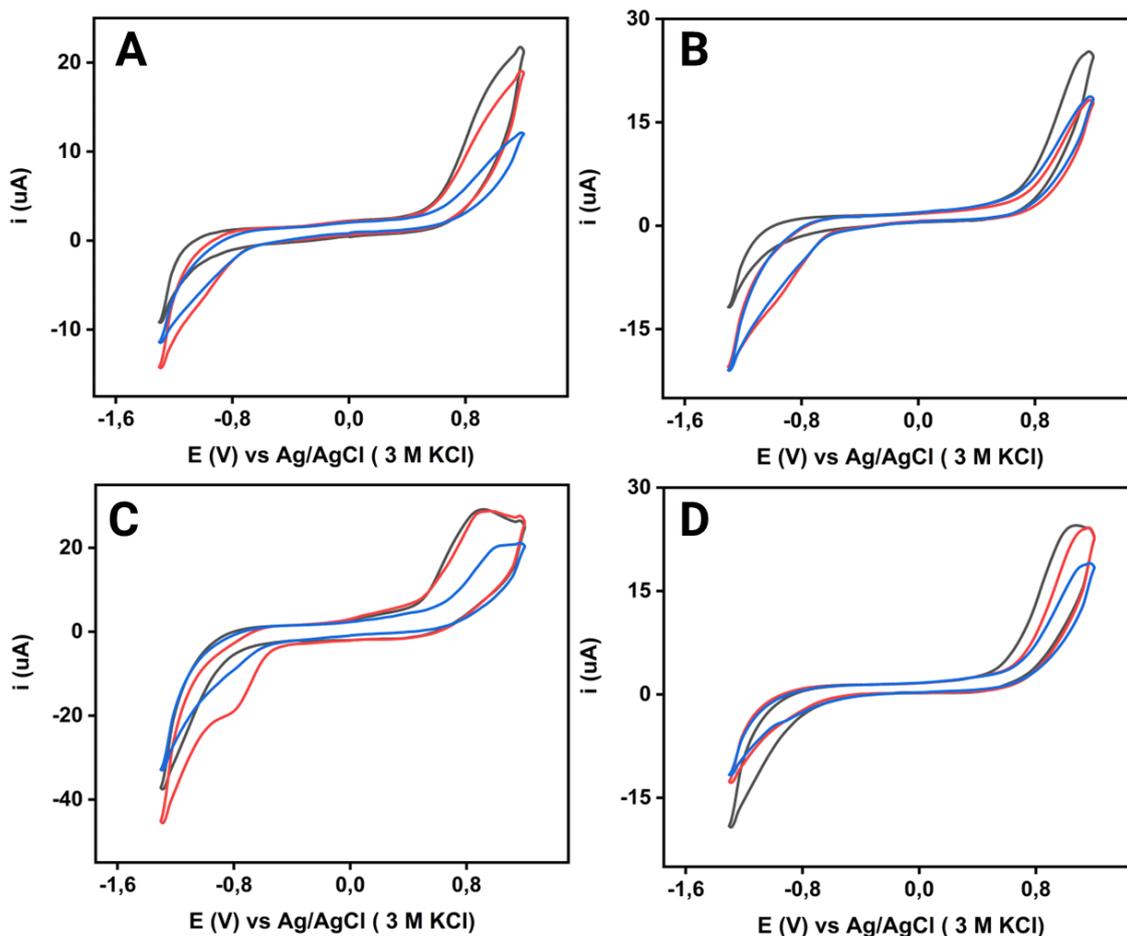


Figura B2. Voltamogramas cíclicos do AIA. (A) pH 4; (B) pH 6; (C) pH 8; (D) pH 10. (—) tampão BR 80 % (v/v) (tampão/etanol); (—) AIA 50 mg L⁻¹; (—) AIA 100 mg L⁻¹. Nos voltamogramas (A), (B) e (D) não foi possível identificar um pico de potencial definido de redução ou oxidação do AIA, como no caso do tampão ácido cítrico-Na₂HPO₄. No voltamograma (C) foi possível identificar um pico de redução do AIA em -0,79 V; no entanto, podemos observar que no voltamograma da concentração maior (100 mg L⁻¹) a intensidade do sinal de corrente diminuiu drasticamente. Esse resultado pode ser devido ao envenenamento da superfície do eletrodo, assim como no caso do tampão ácido cítrico-Na₂HPO₄.

Fonte: Autor.

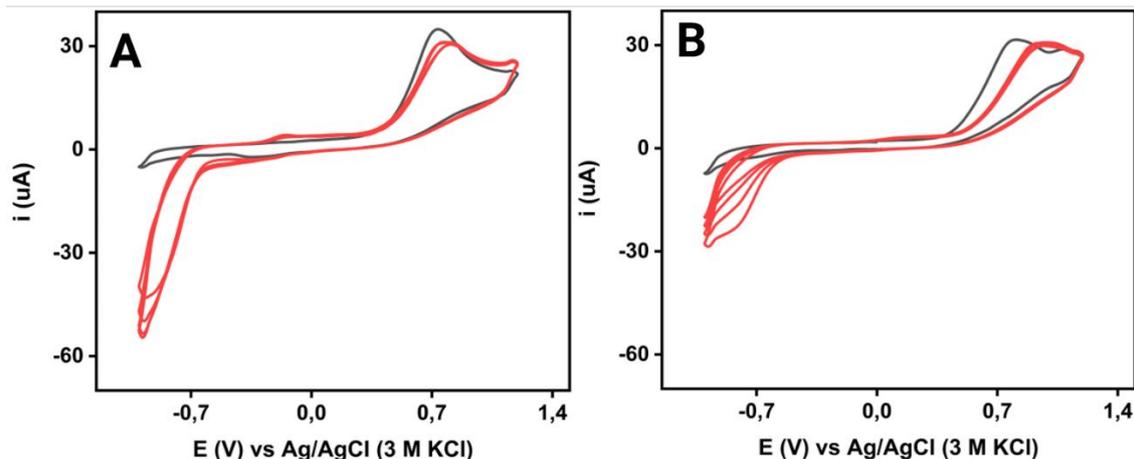


Figura B3. Voltamogramas cíclicos do AIA. (A) pH 4 e (B) pH 8. (—) tampão fosfato e (—) AIA 50 mg L^{-1} . Nos voltamogramas apresentados em (A) não foi possível identificar um pico de potencial definido de redução ou oxidação do AIA. Nos voltamogramas apresentados em (B) foi possível identificar um pico de redução do AIA em $-0,74 \text{ V}$, mas após alguns ciclos observamos que o eletrodo pode estar sofrendo envenenamento da superfície, possivelmente devido à adsorção do analito.

Fonte: Autor.

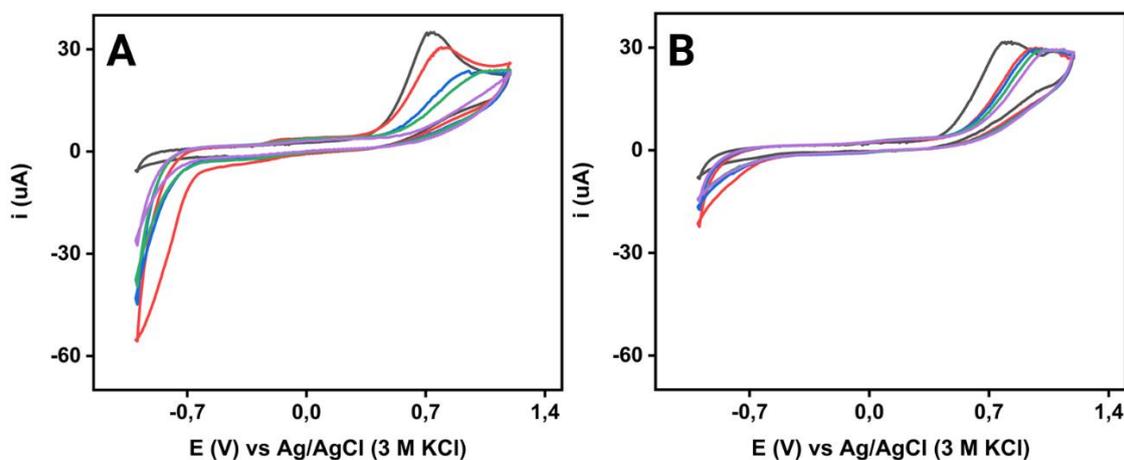


Figura B4. Voltamogramas cíclicos do AIA. (A) pH 4 e (B) pH 8. (—) tampão fosfato; (—) AIA 50 mg L^{-1} ; (—) AIA 100 mg L^{-1} ; (—) AIA 250 mg L^{-1} ; e (—) AIA 500 mg L^{-1} . Nos voltamogramas apresentados em (A) além de não ser possível observar um pico de redução definido, com o aumento da concentração os sinais de corrente diminuem, sendo o oposto do previsto. Os voltamogramas em (B) apresentam as mesmas semelhanças, mas com intensidade de corrente mais baixa quando comparado com (A), esse resultado pode estar relacionado com a diferença de pH do eletrólito suporte.

Fonte: Autor.

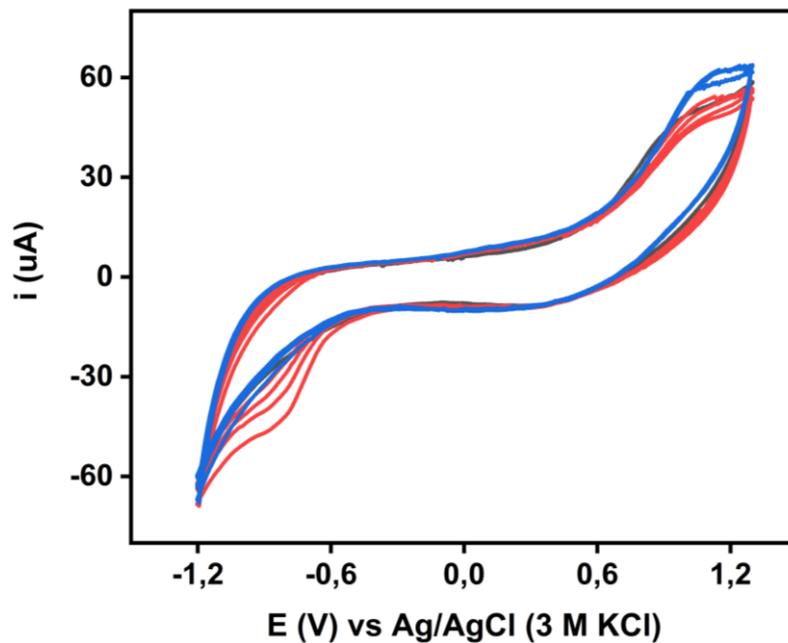


Figura B5. Voltamogramas cíclicos do AIA. (—) tampão PBS pH 7,4; (—) AIA 50 mg L⁻¹; (—) AIA 100 mg L⁻¹. Nos ciclos voltamétricos apresentados podemos observar a diminuição da intensidade de sinal de corrente para a redução do AIA. No primeiro ciclo na concentração de 50 mg L⁻¹ se observa um pico de redução em -0,84 V, o potencial que poderia ser utilizado para estudos de amperometria; contudo, como nos resultados já apresentados anteriormente, nesse eletrólito suporte pode também estar ocorrendo o envenenamento da superfície do eletrodo, possivelmente pela adsorção do analito em estudo.

Fonte: Autor.