



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Doutorado Multi-institucional em Química –
UFG/UFMS/UFU



DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
UM NOVO MATERIAL POLIMÉRICO PARA
APLICAÇÃO EM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO
NA DETECÇÃO DE DERIVADOS FENÓLICOS

UBERLÂNDIA

- 2011 -



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Doutorado Multi-institucional em Química –
UFG/UFMS/UFU



DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO MATERIAL POLIMÉRICO PARA APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS NA DETECÇÃO DE DERIVADOS FENÓLICOS

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Multi-
Institucional em Química UFG-UFMS-
UFU, como requisito para obtenção do
título de Doutor em Química.

Doutoranda: SABRINA NUNES VIEIRA

Orientador: Prof. JOÃO MARCOS MADURRO

Co-orientadora: Profa. ANA GRACI BRITO-MADURRO

UBERLÂNDIA

- 2011 –

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU – MG, Brasil

- V658d Vieira, Sabrina Nunes, 1982-
 Desenvolvimento e caracterização de um novo material polimérico
 para aplicação em biossensores eletroquímicos na detecção de derivados
 fenólicos [manuscrito] / Sabrina Nunes Vieira. - 2011.
 148 f. : il.
- Orientador: João Marcos Madurro.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
 Pós-Graduação em Química.
 Inclui bibliografia.
1. Polimerização - Teses. 2. Biossensores - Teses. I. Madurro, João
 Marcos. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Gra-
 duação em Química. III. Título.

CDU: 66.095.26



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Programa Multiinstitucional de Doutorado em Química
E-mail: cpgquimica@ufu.br - Fone: (34) 3239-4385

ALUNO(A): SABRINA NUNES VIEIRA

NÚMERO DE MATRÍCULA: 86344

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL DOUTORADO

TÍTULO DA TESE:

***“Desenvolvimento e caracterização de um novo material
polimérico para aplicação em biossensor eletroquímico na
detecção de derivados fenólicos”***

ORIENTADOR:

PROF. DR. JOÃO MARCOS MADURRO

A Tese foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Auditório C do Bloco 50, no Campus Santa Mônica, no dia 28 de fevereiro de 2011, às 14h00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

PROF. DR. JOÃO MARCOS MADURRO

(Instituto de Química / UFU)

PROF. DR. RONALDO CENSI FARIA

(Universidade Federal de São Carlos)

PROF. DR. GILBERTO MAIA

(Universidade Federal do Mato Grosso do Sul)

PROF. DR. SEBASTIÃO DE PAULA EIRAS

(Instituto de Química / UFU)

PROF. DR. EDMAR ISAIAS DE MELO

(Universidade Federal de Uberlândia)

Uberlândia, 28 de fevereiro de 2011.

“[...] talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito [...] Não somos o que deveríamos ser, mas somos o que iremos ser. E graças a Deus, não somos o que éramos”.

Martin Luther King

“Quem caminha só pode chegar mais rápido, mas quem caminha acompanhado com certeza chega mais longe.”

Autor Desconhecido

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ser finalizado sem prestar minha homenagem a algumas pessoas, as quais julgo terem contribuído de algum modo, para o êxito alcançado:

- ✓ *A Deus pelo Dom da vida e por sempre estar comigo em todos os momentos.*
- ✓ *Em memória ao meu pai, mostrando-se um verdadeiro guerreiro na luta contra o câncer, deixando-nos a lição de que jamais devemos desistir.*
- ✓ *A minha amada mãe Jalcira pelo amor incondicional, por acreditar e me incentivar em cada novo ideal. Agora deve estar chorando ao ler este humilde agradecimento, mas quero que saiba que não seria a metade do que sou hoje se não tivesse sua dedicação que revela em mim suas próprias virtudes.*
- ✓ *Ao meu marido Carlos que acreditou em mim mais do que eu mesma, que transformou a minha vida em um mar de alegria e amor. Seu olhar e suas palavras me guiaram até aqui.*
- ✓ *A minha irmã Simone, meu cunhado Arilson e aos meus sobrinhos Allan e Arthur pela confiança, dedicação e pelos maravilhosos momentos que dividimos. Vocês realmente fizeram diferença nestes anos.*
- ✓ *À minha avó Maria Aparecida que nunca precisou entender o que é um Doutorado para me incentivar a chegar ao final.*
- ✓ *Ao Prof. Dr. João Marcos Madurro, meu orientador, pela oportunidade oferecida e por acreditar em mim e na construção desta Tese. Obrigada pela orientação, estímulo, dedicação e pelas valiosas discussões em todos os momentos.*
- ✓ *À Profa. Dra. Ana Graci Brito-Madurro, minha co-orientadora, pela atenção, orientação e todo incentivo durante a execução deste trabalho.*
- ✓ *Em especial aos amigos e colegas de laboratório: Tatiana (Pink), Diego, Denise, Carla, Daniel (Cabeça), Leandro(17), Érik, Alex, Ana Cristina, Ana Consuelo, Héden, Pâmela, Miquéias, Lara, Luciano, Lucas de Paula, Natália, Leandra, e demais amigos os quais não são reportados nestas linhas mas me acompanharam obrigada pela amizade, momentos de descontração e os bons dias que me deram fôlego para seguir adiante.*
- ✓ *Aos meus primos, tios, padrinhos e demais companheiros por simplesmente ficarem ao meu lado e confiarem no meu potencial.*
- ✓ *À Mayta, secretária do Curso de Pós-Graduação em Química, pela paciência, colaboração e demonstração de amizade.*
- ✓ *Aos membros da Banca pela aceitação e valiosas contribuições concedidas para o aprimoramento do trabalho desenvolvido.*
- ✓ *A FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos, meu muito obrigado.*
- ✓ *Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pelo espaço físico concedido*

SUMÁRIO

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	ii
Lista de abreviaturas e siglas	iii
Resumo	iv
Abstract	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CÉLULA ELETROQUÍMICA	2
1.2 NATUREZA DA SUPERFÍCIE DOS ELETRODOS E TRANSPORTE DE MATERIAL	4
1.3 VOLTAMETRIA CÍCLICA	8
1.4 ELETRODOS MODIFICADOS (EMs)	10
1.5 POLÍMEROS INTRINSECAMENTE CONDUTORES	11
1.5.1 Histórico	12
1.5.2 Mecanismo de condução	14
1.5.3 Síntese de polímeros condutores	15
1.5.3.1 Polimerização eletroquímica – conceito e considerações gerais	18
1.5.3.2 Eletrodos	18
1.5.3.3 Monômeros	19
1.5.3.4 Elétrolitos	20
1.5.3.5 Dopagem (<i>Doping</i>)	20
1.4 BIOSSENSORES	21
1.4.1 Transdutor	24
1.4.2 Biorreceptor	26
1.4.2.1 Reconhecimento por biocatálise	27
1.4.2.2 Reconhecimento por bioafinidade	27
1.4.3 Técnicas de imobilização de biocomponentes	28
1.4.3.1 Adsorção física	29
1.4.3.2 Ligação cruzada	29
1.4.3.3 Ligação covalente	30
1.4.3.4 Aprisionamento	31
1.5 ENZIMAS	32

1.5.1 Cinética enzimática	33
1.5.2 Enzimas em biossensores	35
1.5.3 Horseradish peroxidase	36
1.5.3.1 Ciclo catalítico das peroxidases	38
1.6 ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)	39
1.7 AMPEROMETRIA	41
1.7.1 Detecção amperométrica	43
1.7.2 Sensores eletroquímicos	44
1.8 BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE FENÓIS	45
2. OBJETIVOS	46
3. SEÇÃO EXPERIMENTAL	48
3.1 REAGENTES UTILIZADOS	49
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	49
3.3 SOLUÇÕES	53
3.4 PREPARAÇÃO DE ELETRODOS	54
3.5 FORMAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS	55
3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS COM POLI(2-HFA)	55
3.6.1 Caracterização eletroquímica	55
3.6.2 Caracterização espectroscópica *	56
3.6.3 Caracterização piezelétrica *	56
3.6.4 Caracterização térmica *	56
3.6.5 Caracterização morfológica	56
3.7 CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	57
3.8 PREPARAÇÃO DOS BIOSSENSORES	57
3.8.1 Avaliação da resposta do biossensor amperométrico	58
3.8.1.1 Resposta do biossensor em função da vazão do fluxo	58
3.8.1.2 Resposta do biossensor em função do potencial aplicado	58
3.8.1.3 Resposta do biossensor em função do pH da solução transportadora	58
3.8.1.4 Resposta do biossensor em função da superfície eletródica	59
3.8.1.5 Resposta do biossensor em função da concentração de guaiacol	59
3.8.1.6 Utilização do biossensor para detecção de peróxido de hidrogênio	59
3.8.1.7 Resposta do biossensor em função do tempo de armazenamento	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 FORMAÇÃO DE FILME POLIMÉRICO	62

4.1.1 Caracterização eletroquímica de poli(2-hfa)	63
4.1.1.1 Caracterização eletroquímica do filme polimérico em função de troca iônica	63
4.1.1.2 Caracterização eletroquímica do filme polimérico em função do transporte de massa	67
4.1.1.3 Caracterização eletroquímica do filme polimérico em função da velocidade de varredura de formação do filme	70
4.1.1.4 Caracterização eletroquímica do filme polimérico em função do pH	73
4.2 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA	76
4.2.1 Análise de UV-Vis	76
4.2.2 Análise de Fluorescência	77
4.2.3 Análise de FTIR	78
4.3 CARACTERIZAÇÃO PIEZELÉTRICA	80
4.4 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA	82
4.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	84
4.6 PRODUÇÃO DE BIOSSENSORES	85
4.6.1 Cálculo da atividade enzimática	85
4.6.2 Testes iniciais com a enzima horseradish peroxidase	87
4.6.3 Testes em fluxo com a enzima horseradish peroxidase	89
4.6.3.1 Testes com eletrodos de grafite modificados com poli(2-HFA)	89
4.6.3.2 Testes com eletrodos de grafite sem modificação	96
4.6.3.3 Testes de variação da quantidade de enzima imobilizada	98
4.6.3.4 Resposta do biossensor em função da variação da concentração de guaiacol	99
4.6.3.5 Teste de curva de calibração e análise de interferente	101
4.6.3.6 Tempo de vida do biossensor	104
4.6.3.7 Avaliação da resposta do biossensor frente a um novo substrato (peróxido de hidrogênio)	106
4.7 esquema resumido dos resultados obtidos	108
5. CONCLUSÕES	109
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

<i>Figura 1: Representação de uma célula eletroquímica com três eletrodos (ET: eletrodo de trabalho; EA: eletrodo auxiliar e ER: eletrodo de referência).....</i>	<i>3</i>
<i>Figura 2: Visão qualitativa da dupla camada elétrica. PIH – plano interno de Helmholtz; PEH – plano externo de Helmholtz: x_1 – espessura da camada interna e x_2 espessura da camada externa. ϕ_M – potencial do metal (Agostinho, Villamil et al., 2004).</i>	<i>4</i>
<i>Figura 3: Dupla camada elétrica formada na superfície do eletrodo como resultado do potencial aplicado. (d_0 a d_1) camada interna compacta e (d_1 a d_2) camada difusa.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 4: (A) Variação linear do potencial no tempo, com inversões periódicas(1). (B) Resposta de corrente–potencial na voltametria cíclica.</i>	<i>9</i>
<i>Figura 5: Condutividade de polímeros condutores em comparação com outros materiais.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 6: Estrutura para o polipirrol (A) polímero neutro; (B) pólaron e (C) bipólaron.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 7: Mecanismo de eletropolimerização do pirrol.</i>	<i>17</i>
<i>Figura 8: Estrutura do ácido 2 hidroxifenilacético.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 9: Ligação cruzada envolvendo glutaraldeído e grupos amino residuais livres nas enzimas.</i>	<i>30</i>
<i>Figura 10: Reação via carbodiimida usada para a formação de ligação covalente entre a enzima e o suporte.</i>	<i>31</i>
<i>Figura 11: Efeito da concentração de substrato na velocidade da reação (concentração de enzima constante).</i>	<i>34</i>
<i>Figura 12: A - Representação tri-dimensional da estrutura da HRP C determinada por cristalografia de raio-x (Protein Data Bank, www.rcsb.org/pdb). O grupo prostético heme (em vermelho) está localizado entre os domínios distal e proximal, cada um contendo um íon Ca^{2+} (azul). As regiões de α-hélice e folha β da enzima são mostradas em violeta e amarelo, respectivamente; B – Estrutura da molécula de protoporfirina que é o sítio ativo de muitas peroxidases.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 13: Mecanismo geral do ciclo catalítico da HRP na presença de H_2O_2 (agente oxidante). AH representa o substrato redutor e $A^\bullet$ o radical formado (Naves, 2008).....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 14: Amperogramas de: a) sistema sobre agitação; b) um sistema em fluxo.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 15: Materiais utilizados nos estudos eletroquímicos. A- célula eletroquímica de três compartimentos; B- eletrodo de referência Ag/AgCl (3 mol.L⁻¹); C- eletrodo auxiliar de platina; D- eletrodo de trabalho de grafite</i>	

pirolítico; E- célula eletroquímica de três compartimentos contendo os três eletrodos.....	50
Figura 16: Equipamentos utilizados nos experimentos eletroquímicos e limpeza dos eletrodos. A- potenciostato; B- politriz.	50
Figura 17: Equipamento utilizado na análise morfológica dos eletrodos modificados; A- microscópio eletrônico de varredura; B- microscópio de força atômica.....	51
Figura 18: Diagrama esquemático do sistema em fluxo utilizado neste trabalho. R ₁ , solução transportadora (tampão fosfato de potássio 0,1mol.L ⁻¹ , pH 6,5; P, bomba peristáltica; W, resíduo; L, alças injetora; I, válvula injetora; A, soluções guaiacol e peróxido de hidrogênio preparados em solução transportadora; B, linha transportadora; C, detector amperométrico.	51
Figura 19: Equipamentos do sistema em fluxo: A- Bomba peristáltica; B-Injetor comutador de geometria circular.	51
Figura 20: Célula eletroquímica usada como sistema de detecção amperométrica. A- célula montada; B- a-suporte de teflon, pino de contato e eletrodo de grafite; b- peça de acrílico; c- eletrodo de referência Ag/AgCl; d- contra-eletrodo de platina.....	52
Figura 21: sistema utilizado para a microbalança eletroquímica de cristal de quartzo. A- célula eletroquímica de teflon desmontada; B- célula eletroquímica de teflon montada; C-eletrodo de cristal de quartzo.	52
Figura 22: Voltamogramas cíclicos de formação do filme polimérico derivado de 2-HFA. 100 varreduras feitas a uma velocidade de 50 mV.s ⁻¹ e num intervalo de -0,70 a 1,20 V.....	62
Figura 23: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite sem modificação (vermelho) e modificados com poli(2-HFA) (preto). (A) solução de ácido perclórico 0,50 mol.L ⁻¹ . (B) solução de K ₄ Fe(CN) ₆ /K ₃ Fe(CN) ₆ 5mmol.L ⁻¹ e KCl 0,1 mol.L ⁻¹ como eletrólito suporte. 100 mV.s ⁻¹	63
Figura 24: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite sem modificação (vermelho) e após a modificação com poli(2-HFA) (preto), feitos em solução de KCl 0,1 mol.L ⁻¹ contendo 5mmol.L ⁻¹ de ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio. Voltamogramas obtidos a 100 mV.s ⁻¹	64
Figura 25: Voltamogramas cíclicos: A- eletrodo modificado com poli(2HFA) em solução contendo KCl e par redox ferro/ferricianeto de potássio (curva preta) e respostas obtidas em solução contendo somente KCl (curva azul); B- subtração das respostas da figura 25 A (preto) e eletrodo de grafite sem modificação (vermelho).	65
Figura 26: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite sem modificação (vermelho) e após a modificação com poli(2-HFA) (preto), feitos em solução de	

<i>KCl</i> 0,1 mol.L ⁻¹ contendo 5mmol.L ⁻¹ de cloreto de hexaminrutênio. Voltamogramas obtidos a 100 mV.s ⁻¹	66
<i>Figura 27: Voltamogramas cíclicos: A- eletrodo modificado com poli(2HFA) em solução contendo KCl e cloreto de hexaminrutênio (curva preta) e respostas obtidas em solução contendo somente KCl (curva azul); B- subtração das curvas da figura 27 A (preto) e eletrodo de grafite sem modificação (vermelho).</i>	67
<i>Figura 28: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite modificados com poli(2-HFA) obtidos em solução de HClO₄ 0,5mol.L⁻¹, feitos em diferentes velocidades de varredura.</i>	68
<i>Figura 29: Valores de corrente de pico de oxidação e valores de corrente de pico de redução versus raiz quadrada da velocidade de varredura. A - Maiores valores de corrente de oxidação e redução da tabela 4; B - Menores valores de corrente de oxidação e redução da tabela 4.</i>	69
<i>Figura 30: Porcentagem de retenção de carga ao longo de 100 varreduras de potencial. Inserto: Voltamogramas cíclicos feitos em solução de ácido perclórico 0.50 mol.L⁻¹ na ausência de monômero. Faixa de varredura 0,00 e +0,85 V e velocidade de 50 mV.s⁻¹.</i>	70
<i>Figura 31: Voltamogramas cíclicos de formação de poli(2-HFA) feitos em solução de ácido perclórico 0.50 mol L⁻¹, em diferentes velocidades de varredura. (A) 20 mV.s⁻¹. (B) 250 mV.s⁻¹. (C) 500 mV.s⁻¹. 100 ciclos.</i>	71
<i>Figura 32: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite sem modificação (preto) e modificados com poli(2-HFA) formados em diferentes velocidades de varredura (vermelho) 20 mV.s⁻¹, (azul) 250 mV.s⁻¹, (verde) 500 mV.s⁻¹. (A) solução de ácido perclórico 0,50 mol.L⁻¹. (B) solução de K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ 5mmol.L⁻¹ e KCl 0,1 mol.L⁻¹ como eletrólito suporte. 100 mV.s⁻¹.</i>	72
<i>Figura 33: Micrografias eletrônicas de varredura para eletrodos de grafite modificados com poli 2-HFA formados a: (A) 20 mV.s⁻¹; (B) 250 mV.s⁻¹; (C) 500 mV.s⁻¹.</i>	73
<i>Figura 34: Simulação da curva de titulação de 50 mL de 2-HFA 0,1 mol.L⁻¹ com NaOH 0,05 mol.L⁻¹.</i>	73
<i>Figura 35: Espectro de UV do 2-HFA em solução aquosa em pH (a) 1,0; (b) 5,0; (c) 7,0 e (d) 12,0.</i>	74
<i>Figura 36: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite em solução aquosa de ácido perclórico 0,5 mol.L⁻¹ em diferentes valores de pH, contendo 2-HFA (1,5x10⁻² mol.L⁻¹). 100 varreduras de potencial a 50 mV.s⁻¹.</i>	75
<i>Figura 37: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados (—) a partir de solução monomérica em diferentes valores de pH (1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0 e 12,0) e eletrodo sem modificação (●) em solução de: (A) Fe²⁺/Fe³⁺ 5mmol.L⁻¹</i>	

contendo KCl 1mmol.L^{-1} , 100mV.s^{-1} e (B) solução de $HClO_4$ $0,5\text{ mol.L}^{-1}$, 50mV.s^{-1}	76
Figura 38: Espectro eletrônico de absorção molecular do 2-HFA e do Poli(2-HFA).....	77
Figura 39: Espectro de emissão de fluorescência do (---) 2-HFA e do (—) Poli(2-HFA).....	78
Figura 40: Espectro de FTIR obtidos em pastilha de KBr para o monômero (2-HFA) e para o polímero poli(2-HFA).....	79
Figura 41: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro em solução contendo 2-HFA $2,5\text{ mmol.L}^{-1}$ em meio de H_2SO_4 $0,2\text{mol.L}^{-1}$, 20 varreduras, 50mV.s^{-1}	81
Figura 42: (A) Perfil j_xE (—) e $dmxE$ (- - -) de 2-HFA $2,5\text{m mol.L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,2\text{ mol.L}^{-1}$, em pH 0. Duas varreduras. 50mV.s^{-1} . (B) Perfil dm versus número de ciclos, 20 varreduras.	82
Figura 43: Termograma de TGA obtido para o Poli(2-HFA).....	83
Figura 44: Micrografias de força atômica de eletrodo de grafite (A) e modificado com: poli(2HFA) eletrogerado em pH 0,5 (B); poli(2HFA) eletrogerado em pH 5 (C); poli(2HFA) eletrogerado em pH 12 (D); eletrodo modificado com poli(2HFA) eletrogerado em pH 0,5 + HRP (E).	84
Figura 45: Reação de oxidação do guaiacol na presença de peróxido de hidrogênio catalisada pela HRP (Weinheimer e White, 2003).....	86
Figura 46: Absorbância do tetraguaiacol a 470 nm em função do tempo de reação enzimática. Inserto: região linear da curvas. Condições: pH 6,5; tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$; peróxido de hidrogênio $165,8\text{ mmol L}^{-1}$; guaiacol $0,15\text{ mmol L}^{-1}$; HRP (1U).....	86
Figura 47: Voltamogramas lineares obtidos em solução tampão fosfato de potássio $0,10\text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,5. (---) somente eletrodo modificado com poli(2-HFA) em tampão e (—) eletrodo modificado com poli(2-HFA)/HRP em solução tampão contendo $32,60\text{ mmol.L}^{-1}$ de H_2O_2 e $9,10\text{ mmol.L}^{-1}$ de guaiacol.....	88
Figura 48: Voltamogramas lineares obtidos em solução tampão fosfato de potássio $0,10\text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,5. (---) somente eletrodo modificado com poli(2-HFA) em tampão e (—) poli(2-HFA)/HRP em solução tampão contendo H_2O_2 $32,60\text{ mmol.L}^{-1}$ e guaiacol $0,00$; $9,10$; $18,20$; $27,30$; $36,40\text{ mmol.L}^{-1}$ respectivamente.	88
Figura 49: Fiagrama de 12 injeções de guaiacol $45,8\text{ mmol.L}^{-1}$ e H_2O_2 $165,2\text{ mol.L}^{-1}$. Solução transportadora: tampão fosfato de potássio $0,10\text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,5. Vazão: $1,5\text{ mL.min}^{-1}$. Volume da alça de amostragem: $200\text{ }\mu\text{L}$. Potencial aplicado: $0,00\text{V}$. 10U de HRP usados na imobilização.	89
Figura 50: Fiagrama de 16 injeções de guaiacol $45,8\text{ mmol.L}^{-1}$ e H_2O_2 $165,2\text{ mmol.L}^{-1}$. Solução transportadora: tampão fosfato de potássio $0,10\text{ mol.L}^{-1}$, pH	

6,5. Vazões variadas: 2,5, 2,0, 1,5 e 1,0 mL.min ⁻¹ . Volume da alça de amostragem: 200 µL. Potencial aplicado: 0,00V. 10U de HRP usados na imobilização.....	90
Figura 51: Voltamogramas cíclicos feitos em fluxo. Injeção de guaiacol 45,8 mmol.L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 165,2 mmol.L ⁻¹ . Solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L ⁻¹ , pH 6,5. Vazão: 2,0 mL.min ⁻¹ . Volume da alça de amostragem: 200 µL. 10U de HRP usados na imobilização.	91
Figura 52: Fiagrama de 27 injeções de guaiacol 45,8 mmol.L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 165,2 mmol.L ⁻¹ . Solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L ⁻¹ , pH 6,5. Vazão: 2,0 mL.min ⁻¹ . Volume da alça de amostragem: 200 µL. Potenciais aplicados: -0,3;-0,2; -0,1; 0,0; 0,1; 0,2V. 10U de HRP usados na imobilização.	92
Figura 53: Gráfico de potencial aplicado versus altura da corrente de pico.	92
Figura 54: Fiagrama de 24 injeções de guaiacol 45,8 mmol.L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 165,20 mmol.L ⁻¹ . Solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L ⁻¹ , pH variado. Vazão: 2,0 mL.min ⁻¹ . Volume da alça de amostragem: 200 µL. Potencial aplicado: 0,00V. 10U de HRP usados na imobilização.....	93
Figura 55: Gráfico de pH da solução transportadora versus altura da corrente de pico.....	94
Figura 56: Fiagrama de 4 injeções de guaiacol 45,8 mmol.L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 165,20 mmol.L ⁻¹ . Solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L ⁻¹ , pH 6,5. Vazão: 2,0 mL.min ⁻¹ . Volume da alça de amostragem: 200 µL. Potencial de análise: 0,00V. 10U de HRP usados na imobilização. Eletrodo modificado com poli(2HFA) sem aplicação de potencial antes da incorporação da HRP.	95
Figura 57: Fiagrama de 4 injeções de guaiacol 45,8 mmol.L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 165,20 mmol.L ⁻¹ . Solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L ⁻¹ , pH 6,5. Vazão: 2,0 mL.min ⁻¹ . Volume da alça de amostragem: 200 µL. Potencial de análise: 0,00V. 10U de HRP usados na imobilização. Eletrodo modificado com poli(2HFA) submetido a potencial anódico antes da incorporação da HRP.	95
Figura 58: Fiagrama de 9 injeções de guaiacol 45,8 mmol.L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 165,20 mmol.L ⁻¹ . Solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L ⁻¹ , pH 6,5. Vazão: 2,0 mL.min ⁻¹ . Volume da alça de amostragem: 200 µL. Potencial de análise: 0,00V. 10U de HRP usados na imobilização.	96
Figura 59: Fiagrama de 6 injeções de guaiacol 45,8 mmol.L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 165,20 mmol.L ⁻¹ . Solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L ⁻¹ , pH 6,5. Vazão: 2,0 mL.min ⁻¹ . Volume da alça de amostragem: 200 µL. Potencial de análise: 0,00V. 10U de HRP usados na imobilização.	97
Figura 60: Gráfico de corrente de pico de redução versus números de injeções. Eletrodos de grafite (---) submetido a um potencial de redução e (—) sem aplicação de potencial antes da incorporação de enzima.	97

<i>Figura 61: Respostas de corrente de eletrodos de grafite/poli(2-HFA)/HRP com diferentes atividades enzimáticas imobilizadas: a) 5 u; b) 10 u; c) 15 u; d) 20 u. guaiacol 45,8 mmol.L⁻¹ e H₂O₂ 165,20 mmol.L⁻¹. Solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L⁻¹, pH 6,5. Vazão: 2,0 mL.min⁻¹. Volume da alça de amostragem: 200 µL. Potencial de análise: 0,00V.....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 62: Variação da corrente de pico de redução em função da quantidade de unidades enzimáticas imobilizadas.</i>	<i>99</i>
<i>Figura 63: Resposta de corrente para diferentes concentrações de guaiacol (46,56; 22,72; 11,36; 5,68; 2,84; 1,42; 0,71 e 0,36 mmol.L⁻¹ respectivamente), H₂O₂ 165,20 mmol.L⁻¹. Solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L⁻¹, pH 6,5. Vazão: 2,0 mL.min⁻¹. Volume da alça de amostragem: 200 µL. Potencial de análise: 0,00V. 10U de HRP usados na imobilização.....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 64: Gráfico de média da corrente de pico de redução versus concentração de guaiacol. Inserto: região linear do gráfico.</i>	<i>100</i>
<i>Figura 65: Diagrama de 26 injeções de H₂O₂ 165,2 mmol.L⁻¹ e guaiacol em diferentes concentrações (ver descrição na tabela). Solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L⁻¹, pH 6,5. Vazão: 2,0 mL.min⁻¹. Volume da alça de amostragem: 200 µL. Potencial de análise: 0,00V. 10U de HRP usados na imobilização.</i>	<i>101</i>
<i>Figura 66: Gráfico de média da corrente de pico de redução versus concentração de guaiacol. Curva de calibração. Inserto: região linear da curva de calibração.....</i>	<i>102</i>
<i>Figura 67: Gráfico variação da corrente de pico de redução em função do tempo em dias de armazenamento.</i>	<i>105</i>
<i>Figura 68: Diagrama de 30 injeções de diferentes concentrações de H₂O₂ (A - 665,06; B - 327,68; C - 161,30; D - 80,45; E - 39,67; F - 19,50; G - 9,49; H - 4,62; I - 2,28 e J - 1,31 mmol.L⁻¹ respectivamente). Solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L⁻¹, pH 6,5. Vazão: 2,0 mL.min⁻¹. Volume da alça de amostragem: 200 µL. Potencial de análise: 0,00V.....</i>	<i>106</i>
<i>Figura 69: Gráfico de média da corrente de pico de redução em função da concentração de peróxido de hidrogênio.</i>	<i>107</i>

<i>Tabela 1. Parâmetros importantes considerados em voltametria cíclica.....</i>	<i>9</i>
<i>Tabela 2: Tipos de transdutores utilizados na construção de biossensores e técnicas de detecção.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 3: Principais biorreceptores utilizados na construção de biossensores eletroquímicos.</i>	<i>26</i>
<i>Tabela 4: Valores de corrente de pico de oxidação e de redução bem como potencial de oxidação e de redução versus a velocidade de varredura.</i>	<i>68</i>
<i>Tabela 5: Descrição das 26 injeções da figura 65, a concentração de peróxido de hidrogênio foi constante em todas as injeções no valor de 165,2 mmol.L⁻¹.</i>	<i>102</i>
<i>Tabela 6: Valores de corrente de pico em μA de injeções de fenol, peróxido de hidrogênio e guaiacol, a concentração de peróxido de hidrogênio foi constante em todas as injeções no valor de 165,2 mmol.L⁻¹.</i>	<i>103</i>
<i>Tabela 7: Valores de corrente de pico em μA de injeções de peróxido de hidrogênio e guaiacol em função do tempo de armazenamento. Média e desvio padrão para as três amostras analisadas</i>	<i>105</i>

ΔE – Variação de potencial

μA – microampere (10^{-6})

2-HFA – ácido 2 hidroxifenilacético

BSA – albumina soro bovina

EA – Eletrodo auxiliar

E_p – Potencial de pico

ER – Eletrodo de referência

ET – Eletrodo de trabalho

FIA – Análise por injeção em fluxo

HRP – *Horseradish peroxidase*

I_p – Corrente de pico

mA – miliampere (10^{-3})

MECQ – Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo

min. - minutos

mV – milivolts (10^{-3})

PEH – Plano externo de Helmholtz

PH – Plano de Helmholtz

PIC's – Polímeros intrinsecamente condutores

PIH - Plano interno de Helmholtz

Poli(2-HFA) – Polímero derivado do ácido 2 hidroxifenilacético

s - segundos

V - Volts

Este trabalho relata estudos da eletropolimerização de ácido 2-hidroxifenilacético (2-HFA) sobre eletrodos de grafite visando à imobilização de biomoléculas para a construção de biossensores. O filme polimérico formado sobre o eletrodo de grafite foi caracterizado piezelétrica, espectroscópica, morfológica e eletroquimicamente. As análises indicaram um aumento na área relativa dos picos de oxi-redução, sugerindo formação de um filme polimérico com maior área superficial para o eletrodo modificado com 2-HFA formado a 20 mV.s^{-1} , se comparado aos filmes formados em diferentes velocidades de varredura. Foram realizados experimentos de formação de filme polimérico em diferentes valores de pH da solução monomérica pelo fato do monômero apresentar diferentes estados de protonação dos grupamentos fenol e carboxila de acordo com o pH do meio. Estes estudos indicaram que a preparação do polímero em meio ácido favorece a formação de um material com características condutoras. Os polímeros formados em diferentes valores de pH apresentam duas ondas de oxidação e duas de redução, resultado comum a todos os estudos realizados. Análises de microscopia de força atômica mostraram que os filmes formados em diferentes valores de pH apresentam características morfológicas distintas. As análises piezelétricas indicaram que durante a preparação do polímero em meio ácido ocorreu um aumento linear de massa chegando a um valor de 477,60 ng de material depositado sobre o eletrodo, ao final de 20 varreduras de potencial. O poli(2-HFA) bem como o 2-HFA apresentam alta intensidade de fluorescência, e ocorre um deslocamento batocrômico quando compara-se o monômero ao polímero, indicando a formação de uma cadeia polimérica com maior extensão de conjugação. Os dados de FTIR sugerem que a eletropolimerização produz um polímero com um átomo de oxigênio do grupo hidroxila de fenol formando a ligação entre os anéis aromáticos. O poli(2-HFA) apresentou biocompatibilidade para imobilização da enzima *horseradish peroxidase* (HRP), pois os eletrodos que não continham filme polimérico não retiveram a enzima durante as análises em fluxo, já os eletrodos modificados com o filme polimérico, contendo a enzima foram estáveis por mais de vinte injeções. Para a imobilização de HRP foi necessário submeter o eletrodo a um potencial de redução para melhorar a resposta de incorporação e minimizar a lixiviação. O eletrodo modificado com poli(2-HFA)/HRP apresentou resposta em presença de guaiacol com limite de detecção foi de $1,89 \text{ mmol.L}^{-1}$ e limite de quantificação de $6,31 \text{ mmol.L}^{-1}$. Os resultados mostraram que este biossensor pode ser usado também em análises de peróxido de hidrogênio além de análises de derivados fenólicos.

This work reports studies on the 2-hydroxyphenylacetic acid (2-HPA) electropolymerization over graphite electrodes in order to biomolecule immobilization for biosensor construction. The polymeric film formed over the graphite electrode was characterized piezoelectrically, spectroscopically, morphologically and electrochemically. The analysis pointed a redox peak relative area increase, suggesting a polymeric film formation with larger surface area for the 2-HPA modified electrode formed at 20mv.s^{-1} , comparing to films formed in different scan rates. Polymeric films formation experiments were performed at different pH values from the monomeric solution due the monomer present different protonation states of phenol and carboxyl groups according the medium pH. These studies pointed that the polymer prepared in acid conditions favors the formation of a material with conductive properties. The polymers formed at different pH values presented two oxidation and two reduction waves, ordinary result to all studies performed. Analysis of atomic force microscopy showed that the films formed at different pH values show distinct morphological characteristics. The piezoelectric analysis pointed that during the polymer preparation in acid medium, a linear mass increase occurred, reaching a deposit material mass over the electrode of 477,60 ng at the end of 20 cycles. Poly(2-HPA) as well 2-HPA presented fluorescence high intensity and a bathochromic shift from the monomer to the polymer, pointing a polymeric chain formation with larger conjugation extent. The FTIR data suggests that electropolymerization produces a polymer with an oxygen atom from phenol hydroxyl group forming the bond between the aromatic rings. Poly(2-HPA) presented biocompatibility for *horseradish peroxidase* (HRP) enzyme immobilization since the bare graphite electrodes did not retained it during the flow analysis. However the polymeric film modified electrode containing the enzyme was stable for more than twenty injections. For HRP immobilization it was necessary to drive the electrode at a reduction potential in order to improve the incorporation response and minimize lixiviation. The poly(2-HPA)/HRP modified electrode presented response in guaiacol presence with detection limit of 1.89 mmol.L^{-1} and quantification limit of 6.31 mmol.L^{-1} . The results showed that the biosensor can also be used in hydrogen peroxide analysis beyond the phenolic derivatives analysis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÉLULA ELETROQUÍMICA

Uma célula eletroquímica é um dispositivo no qual se processam reações químicas de óxido-redução, de modo que as reações de oxidação e redução ocorram separadamente. A reação de oxidação se processa sobre o ânodo e a de redução sobre o cátodo (Loretta Jones, 2006). Tais elementos, ânodo e cátodo, são chamados de eletrodos, os quais são conectados entre si através de um circuito elétrico externo e as reações que se processam em cada eletrodo são chamadas semi-reações de oxidação e redução. Os elétrons gerados através de uma semi-reação sobre um eletrodo atravessam o circuito externo em direção ao outro eletrodo e são consumidos sobre a sua superfície pela outra semi-reação. Isto ocorre por causa da diferença de potencial entre os dois eletrodos, devido às semi-reações que se processam sobre eles. O balanço global de elétrons é nulo e a reação global da célula é a soma das semi-reações em cada eletrodo (Douglas Skoog, 2005).

Uma célula eletroquímica é chamada galvânica quando a reação que se processa é espontânea e eletrolítica quando a reação é forçada. Para os sistemas, o eletrodo onde ocorre a redução é o cátodo e aquele onde ocorre a oxidação é o ânodo. Porém, para a célula galvânica, o cátodo é carregado positivamente enquanto que o ânodo é carregado negativamente, devido ao excesso ou déficit de elétrons causados pelas semi-reações que se processaram sobre o eletrodo. O contrário ocorre para uma célula eletrolítica, onde o cátodo é carregado negativamente e o ânodo positivamente, consequência da aplicação dos potenciais necessários para a efetivação da reação global da célula (Brett, 1996).

Geralmente, os compartimentos dos dois eletrodos (trabalho e referência) são separados quando ocorre interferência de uma semi-reação sobre a outra reação. Quando isto não ocorre, não é necessária a separação dos compartimentos, mas se ocorre interferência, é necessária a separação das soluções, envolta de cada eletrodo, em diferentes compartimentos chamados de semi-células. Os eletrodos são colocados em contato elétrico através de uma ponte salina ou uma membrana semipermeável para fechar o circuito da célula global, formada pela soma das semi-reações que se processam em cada semi-célula.

Introdução

Para medidas de potencial de uma semi-reação, o que se realiza é a medição da diferença de potencial da célula formada pela semi-célula do eletrodo onde se processa a semi-reação de interesse, o qual é chamado trabalho, e a semi-célula onde se processa uma semi-reação que está em equilíbrio, a qual não apresenta variações no potencial durante a medida. O eletrodo contido na semi-célula em equilíbrio é chamada de eletrodo de referência, pois a medida de potencial realizada é feita tomando o seu valor de equilíbrio como referencial (Vogel, 1981).

Um eletrodo de referência deve possuir características de um sistema idealmente não polarizável, o qual é caracterizado como um sistema químico que não apresenta mudanças em seu potencial devido à passagem de corrente sobre este. Porém tal sistema ideal não existe e deste modo deve-se tentar minimizar ao máximo a passagem de corrente por este eletrodo. Para minimizar a passagem de corrente elétrica pelo eletrodo de referência, passou-se a utilizar células eletroquímicas com três eletrodos (figura1), adicionando-se a célula um terceiro eletrodo chamado eletrodo auxiliar.

Sobre o eletrodo auxiliar se processa a reação complementar à célula eletroquímica, de maneira que, a transferência de elétrons ocorre entre os eletrodos auxiliar e de trabalho. Deste modo as medidas de corrente são realizadas entre estes dois eletrodos.



Figura 1: Representação de uma célula eletroquímica com três eletrodos (ET: eletrodo de trabalho; EA: eletrodo auxiliar e ER: eletrodo de referência).

Introdução

1.2 NATUREZA DA SUPERFÍCIE DOS ELETRODOS E TRANSPORTE DE MATERIAL

Antes de descrever os modelos que caracterizam a superfície do eletrodo, é necessário diferenciar os processos faradáicos dos processos capacitivos. Enquanto que o primeiro é responsável pela geração de uma corrente devido à transferência de cargas de espécies que reagem sobre o eletrodo, o segundo gera uma corrente que é resultante da acumulação de cargas, proveniente de íons inertes atraídos pelo campo elétrico resultante do potencial aplicado ao eletrodo.

O modelo que descreve a natureza da superfície dos eletrodos é o da dupla camada elétrica (Yoon, Jang *et al.*, 2005). Para tal existem diversos modelos os quais são mais complexos ou mais simplificados à medida que são considerados diversos efeitos sobre este sistema. O modelo mais simples é o de Helmholtz, o qual propõe que a partir da interface eletrodo solução em direção ao seio da solução existe uma queda de potencial linear em função da distância, até um ponto onde não ocorre diminuição significativa do potencial no interior da solução (figura 2).

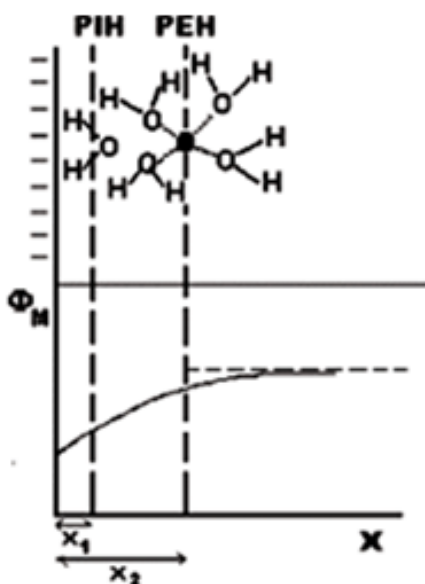


Figura 2: Visão qualitativa da dupla camada elétrica. PIH – plano interno de Helmholtz; PEH – plano externo de Helmholtz: x_1 – espessura da camada interna e x_2 espessura da camada externa. ϕ_M – potencial do metal (Agostinho, Villamil *et al.*, 2004).

Introdução

Tal modelo assim funciona, pois tem como base o sistema de um capacitor, formado pelas cargas na superfície do eletrodo e as cargas dos íons adjacentes a esta superfície devido a atração eletrostática, separadas pelo raio dos íons adjacentes à superfície do eletrodo. Deste modo a queda de potencial ocorre até o valor do raio dos íons atraídos pela carga do eletrodo. No modelo de Helmholtz a distância do eletrodo à solução, caracterizada pelo raio dos íons adjacentes a este, é denominada de plano de Helmholtz (PH), o qual é a máxima distância onde ocorre uma queda linear do potencial do eletrodo em direção a solução. Porém tal modelo não leva em consideração o fato de que moléculas do solvente, devido a sua polaridade, também podem estar atraídas pela superfície do eletrodo e que os íons adjacentes ao eletrodo, que ali permanecem devido a sua carga, podem estar solvatados ou não. Desta forma, foram desenvolvidos modelos os quais são diferenciados os íons especificamente adsorvidos sobre a superfície do eletrodo daqueles não especificamente adsorvidos. Os íons especificamente adsorvidos apresentam-se não solvatados e enquanto que os não especificamente adsorvidos possuem uma camada de moléculas de solvente ao seu redor, devido à carga do íon (Myland e Oldham, 2005).

Com isso, os novos modelos desenvolvidos passaram a ser chamados de modelos da dupla camada elétrica (figura3), pois passaram a considerar dois planos paralelos ao eletrodo, o primeiro formado pelas camadas de íons especificamente adsorvidos, denominada plano interno de Helmholtz (PIH), caracterizado pelo raio desses íons e moléculas do solvente, e o segundo formado pelas camadas de íons não especificamente adsorvidos, denominada plano externo de Helmholtz (PEH) (Kisza, 2006), caracterizado pelo raio dos íons solvatados adjacentes ao eletrodo. O modelo de dupla camada elétrica é encarado como um sistema de dois capacitores em série, o primeiro formado pelas cargas dos íons especificamente adsorvidos e o segundo pelas somas das cargas dos íons difusos no interior da solução, partindo do PEH. O conhecimento das características da superfície do eletrodo é baseado nas propriedades capacitivas desta superfície. Tal teoria é importante para o entendimento dos processos faradáicos, pois o estudo de reações de transferência de cargas depende da polarização da superfície do eletrodo (Giroto e De Paoli, 1999).

Introdução

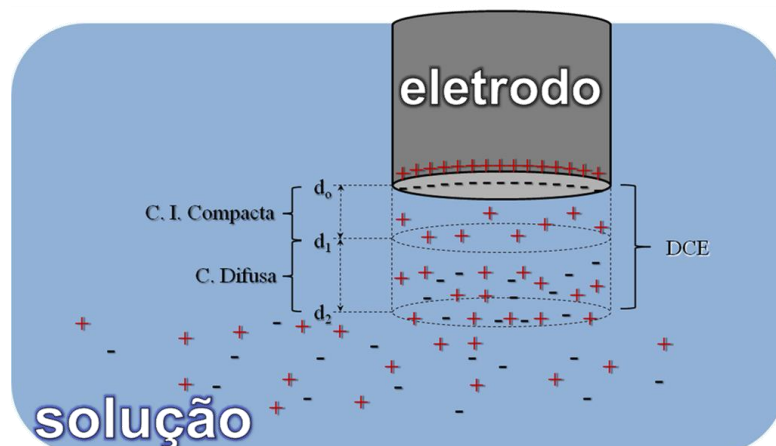


Figura 3: Dupla camada elétrica formada na superfície do eletrodo como resultado do potencial aplicado. (d_0 a d_1) camada interna compacta e (d_1 a d_2) camada difusa

O modelo que descreve o processo faradáico é baseado nos sobrepotenciais de superfície, o qual é o valor de potencial elétrico necessário para a transferência de elétrons entre a superfície e moléculas adjacentes sobre esta, de modo que este valor é o potencial onde se inicia a reação de oxidação ou redução de uma dada substância sobre o eletrodo.

Sabe-se que, para um determinado composto sofrer processos faradáicos de transferência de cargas, é preciso que atinja a superfície do eletrodo. Desta forma, o transporte é uma variável muito importante para a efetivação de uma reação de óxido-redução sobre a superfície de um eletrodo (Giroto e De Paoli, 1999).

Existem basicamente três tipos de processos de transporte de material até a superfície do eletrodo, os quais são: migração, convecção e difusão. O primeiro ocorre devido à atração de partículas carregadas pelo campo elétrico formado pela carga do eletrodo, o segundo devido a qualquer movimentação do fluido no interior da célula e o terceiro por um processo de diminuição de potencial químico devido a diferenças de concentração de determinada espécie entre a superfície do eletrodo e o seio da solução (Vorotyntsev, Badiali *et al.*, 1996; Freger e Bason, 2007).

O primeiro efeito (migração) é evitado através do uso de uma concentração de eletrólito de suporte com concentração muito superior (tipicamente 100 x) a da espécie eletroativa. A convecção forçada é útil em

Introdução

situações onde o processo de difusão é muito lento e quando é necessário fornecer espécies eletroativas até a superfície do eletrodo a uma taxa mais alta, (especialmente em casos de análises envolvendo baixas concentrações). No entanto é importante ter em mente que os processos convectivos nem sempre são extremamente reprodutíveis e que, por outro lado, eliminação da convecção nunca é total, pois flutuações de temperatura já proporcionam processos de convecção (Scrosati, 1993).

O processo de difusão ocorre por um efeito de diferença de concentrações de uma espécie entre porções da solução, de maneira que isso irá proporcionar o transporte das espécies à superfície do eletrodo, independentemente da carga da molécula (Tang, 1999). Para muitas aplicações voltamétricas, busca-se eliminar (ou melhor, minimizar ao máximo) a convecção e a migração, de forma que o processo passe a ser preponderantemente governado por difusão, condição prevista nas equações disponíveis para o tratamento dos dados experimentais (Bard, 2000).

Para processos conduzidos em presença de convecção a principal vantagem é que a quantidade de material que atinge o eletrodo é muito grande. A utilização de sistemas em fluxo (FIA – flow injection analysis) favorecem o transporte por convecção em formas de aumentar o transporte com uma reprodutibilidade maior que com agitação convencional.

Outro fator a ser considerado para o controle dos processos faradâicos é a cinética da transferência de elétrons, que depende do potencial aplicado ao eletrodo. Após ser atingido um valor de potencial onde a reação se processa, ocorre um aumento do sinal de corrente em consequência dos processos de transferência de elétrons. Tal processo torna-se mais efetivo à medida que se aumenta o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho. Este efeito ocorre até ser atingido um potencial, onde não mais são verificados aumento da corrente observada em função do potencial aplicado ao eletrodo. Nesta condição, todo o material que alcança a superfície do eletrodo é instantaneamente oxidado ou reduzido. Isto caracteriza a condição onde o processo é controlado apenas pelo transporte de material (Bard, 2000).

1.3 VOLTAMETRIA CÍCLICA

A voltametria cíclica é umas das técnicas mais utilizadas para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos (De La Escosura-Muñiz, Ambrosi *et al.* 2008), pois apesar de nem sempre fornecer resultados com elevada sensibilidade, permite que se obtenha rapidamente informações sobre um sistema eletroquímico (Svirskis, Travas-Sejdic *et al.* 2010). A causa de sua menor sensibilidade (comparada com outras técnicas voltamétricas) é a variação contínua do potencial aplicado. Ao ser variado o potencial, gera-se corrente capacitiva, que vai se somar á corrente faradaica. Em baixas concentrações de analito, a contribuição da corrente capacitiva se torna significativa e como não pode ser distinguida da faradaica, inviabiliza a análise.

As técnicas voltamétricas geralmente envolvem a aplicação de uma perturbação de potencial a um eletrodo (na forma de uma rampa linear de potencial). Um voltamograma cíclico indica em que região de potencial determinada reação redox (compostos eletroativos) irá ocorrer. A técnica também fornece outras informações a respeito de um sistema, como: se o processo é reversível, o número de elétrons envolvidos no processo, se ocorre à formação de espécies intermediárias (Xu, Chen *et al.* 2010), etc.

Para utilização das técnicas voltamétricas, necessita-se de um potenciostato ou galvanostato (Wu, Yuan *et al.*, 2008). Além disso, se utiliza uma célula composta por um sistema de três eletrodos: um de trabalho (ET), um de referência (ER) e um auxiliar (EA), mergulhados em uma solução em repouso na presença ou ausência de oxigênio (geralmente eliminado por borbulhamento de N₂ ou Ar). O eletrodo mais importante, onde ocorre a reação de interesse, é o de trabalho, que pode ser constituído de diferentes materiais, dentre os quais, as várias formas de carbono (carbono vítreo, pirolítico, diamante, nanotubos e pó de grafite) e os metais nobres (ouro, platina), que apresentam faixa de trabalho mais ampla. Metais menos nobres (cobre, níquel, cobalto...) e outros podem ser utilizados para determinadas aplicações. O eletrodo auxiliar (construído geralmente por material inerte, na maioria das vezes platina) deve ter área superior à do eletrodo de trabalho e tem a função de fornecer a corrente necessária para sustentar a reação. O eletrodo de referência tem o papel de monitorar o potencial aplicado pelo eletrodo de

Introdução

trabalho. Dessa forma, o ER não pode sofrer alterações de potencial resultantes do fluxo de corrente. Nos potenciostatos modernos, a elevada resistência do circuito evita um fluxo de corrente significativo através do eletrodo de referência e a conseqüente alteração de seu potencial.

A forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica está representada na Figura 4, o potencial é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho, em uma solução sem agitação, usando um potencial em forma de triângulo (Figura 4a). Dependendo da informação desejada, simples ou múltiplos ciclos podem ser utilizados. Durante a varredura do potencial, o potenciostato mede a corrente resultante desta corrente versus o potencial aplicado (Figura 4b). Os processos redox que acontecem no ET são representados tanto por correntes de picos anódicos ($i_{p,a}$) e catódicos ($i_{p,c}$) quanto por potenciais de picos anódicos ($E_{p,a}$) e catódicos ($E_{p,c}$). A tabela 1 mostra a definição desses parâmetros.

A Figura 4 mostra o esquema representativo de um experimento de voltametria cíclica.

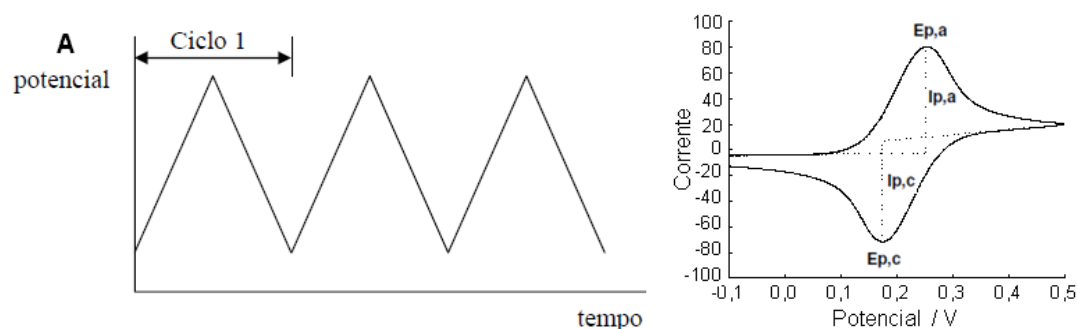


Figura 4: (A) Variação linear do potencial no tempo, com inversões periódicas(1). (B) Resposta de corrente–potencial na voltametria cíclica.

Tabela 1. Parâmetros importantes considerados em voltametria cíclica.

Termo definição	
$E_{p,a}$	Potencial de pico anódico. Potencial no qual a corrente anódica apresenta seu valor mais alto.
$i_{p,a}$	Corrente de pico anódica. O valor mais alto de corrente anódica.
$E_{p,c}$	Potencial de pico catódico. Potencial no qual a corrente catódica apresenta seu valor mais alto.
$i_{p,c}$	Corrente de pico catódico. O valor mais alto da corrente catódica.

1.4 ELETRODOS MODIFICADOS (EMs)

Para melhorar a reatividade e seletividade dos eletrodos clássicos (carbono, platina, metais, etc), foram desenvolvidos métodos para imobilizar espécies com diferentes atividades catalíticas na superfície destes eletrodos (Oni, Diab *et al.*, 2005; Hajjizadeh, Jabbari *et al.*, 2008; Silva, Ferreira *et al.*, 2009). Estes novos e diferenciados eletrodos receberam a denominação de eletrodos quimicamente modificados por Murray e col. na década de 70 (Murray, Moses *et al.*, 1975). Esta modificação da superfície objetiva pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, como forma de alterar sua reatividade e seletividade, ampliando o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações. Dentre elas estão a catálise de reações orgânicas e inorgânicas, transferência de elétrons em moléculas de interesse, desenvolvimento de sensores e biossensores, dentre outras (Villarreal, Morales *et al.*, 2001; Brito-Madurro, Ferreira *et al.*, 2007; De Castro, Vieira *et al.*, 2008; Huang, Xu *et al.*, 2009).

Os Ems apresentam vantagens dentre estas destaca-se interações seletivas e pré-concentração de analito na camada modificadora, eletrocatalise de reações redox de um analito com transferência lenta de elétrons sobre o eletrodo base, permeseletividade com uso de membranas para inibir interferentes eletroativos, detecção eletroquímica de analitos iônicos não-redox, incorporação de biomoléculas, particularmente enzimas, no desenvolvimento de biossensores, incorporação de monocamadas em grupamentos pré-definidos em eletrodos auto arrançados, bem como a incorporação de bicamadas lipídicas e monocamadas fosfolipídicas, explorando a permeabilidade destas membranas biológicas. Em termos analíticos, a sensibilidade e seletividade de uma determinação podem ser aumentadas com a utilização de um EMs para que seu emprego seja justificado (Silva, Ferreira *et al.*, 2009).

A modificação dos eletrodos pode ser feita através de: ligação covalente, onde o modificador é ligado covalentemente ao substrato; adsorção, onde o eletrodo é exposto a uma solução contendo o agente modificador; imobilização por oclusão, imobilizando o agente modificador através da oclusão em gel; materiais compósitos, que são formados pela combinação de duas ou mais

Introdução

fases de diferentes naturezas; uso de filmes poliméricos, os quais são eletrogerados na superfície do eletrodo, e podem ter diferentes características (Mohan e Prakash 2010; Oliveira, Vieira *et al.*, 2010; Ferreira, Boodts *et al.*, 2008; Franco, D. L., Afonso, A. S. *et al.*, 2008; Silva, Vieira *et al.*, 2008; Silva, Ferreira *et al.*, 2008).

Na literatura encontram-se técnicas de recobrimento da superfície do eletrodo com filmes poliméricos (Chen, Burrell *et al.*, 2002; Luo, Killard *et al.*, 2006; Ates e Sarac, 2009), os quais permitem a imobilização de muitas monocamadas da espécie ativa na superfície modificada, ampliando consideravelmente a resposta eletroquímica. Desta forma, filmes poliméricos têm sido usados na modificação de eletrodos no desenvolvimento de sensores para proteger a superfície dos eletrodos de impurezas, bloquear interferentes, imobilizar biocomponentes, incorporar mediadores e fornecer biocompatibilidade (Lakard, Herlem *et al.*, 2008).

Devido às diferentes características dos polímeros, pode-se explorá-las de acordo com o interesse. Polímeros condutores são amplamente usados devido à característica de aumentar a velocidade de transferência de elétrons (Ko, Park *et al.*, 2002; Biallozor e Kupniewska, 2005).

Polímeros não condutores apresentam alta resistividade e podem ser preparados por eletropolimerização. O crescimento de tais polímeros é limitado e o filme formado é muito mais fino que os típicos condutores. Devido à espessura limitada (cerca de 10-100 nm) substratos e produtos se difundem rapidamente diminuindo o tempo de resposta. Esses filmes são permeseletivos e podem ser usados evitar espécies interferentes ou contaminantes na superfície do eletrodo. Rápida resposta e alta seletividade podem ser esperadas de um sensor baseado em polímeros não condutores (Palmisano, Centonze *et al.*, 1993; Curulli, Kelly *et al.*, 1998; Yuqing, Jianrong *et al.*, 2004; Özalp-Yaman, Bastürkmen *et al.*, 2005).

1.5 POLÍMEROS INTRINSECAMENTE CONDUTORES

Uma nova classe de polímeros conhecida como polímeros intrinsecamente condutores (PIC) (Schultze, Morgenstern *et al.*, 1999; Pron e Rannou, 2002), ou polímeros conjugados, está sendo estudada devido às

Introdução

interessantes propriedades elétricas e ópticas (Han, Qiu *et al.*, 2006) que vêm suprir diversas demandas das áreas de microeletrônica, química analítica, biotecnologia, entre outras. A condução elétrica ocorre pelo fenômeno de conjugação de ligações duplas (Riess, 2000), resultando na sobreposição de seus orbitais moleculares parcialmente preenchidos e permitindo o livre movimento dos elétrons entre estas lacunas (Pron e Rannou, 2002).

Os polímeros condutores são conhecidos em aplicações físicas e físico-químicas, como inibidores de corrosão, capacitores compactos, revestimento eletrostático, proteção eletromagnética de computadores, entre outras (Tang, Kitani *et al.*, 1995; Ates e Sarac, 2009). Devido a algumas vantagens como baixo custo, capacidade de exclusão de interferentes, alta velocidade de transferência de elétrons e facilidade de deposição na superfície eletródica do sensor (Rajesh, Bisht *et al.*, 2005) os PIC's tem sido intensamente utilizados para a confecção de sensores (Xia, Wei *et al.*, 2010 ; Adhikari e Majumdar, 2004). Juntamente com a moderna instrumentação eletroquímica disponível atualmente, a associação dos PIC's aos eletrodos quimicamente modificados resulta em sensores com elevada seletividade e sensibilidade (Ojani, Raoof *et al.*, 2004).

1.5.1 HISTÓRICO

As pesquisas sobre polímeros condutores intensificaram-se em 1975 (Stenger-Smith, 1998; Gerard, Chaubey *et al.*, 2002). A descoberta do poliacetileno dopado, o qual é considerado o marco inicial dos PIC's, iniciou-se em 1974, quando este polímero – comumente conhecido como um pó preto – foi sintetizado via catálise com catalisadores do tipo Ziegler-Natta (Sahin, Pekmez *et al.*, 2002), formando um filme de aparência metálica (Stenger-Smith, 1998; Pron e Rannou, 2002). Apesar disto, as propriedades condutoras não chegaram a obter alterações significativas. No entanto, em 1977 Shirakawa, MacDiarmid e Heeger (MacDiarmid, Shirakawa *et al.*, 1977) descobriram que a oxidação com vapor de cloro, bromo ou iodo tornou o filme de acetileno dez vezes mais condutor do que o original (Guimard, Gomez *et al.* 2007; Pron e Rannou, 2002). Este tratamento com halogênios foi chamado de “doping” (dopagem) pela analogia com a dopagem de semicondutores. A forma “dopada” do poliacetileno chegou a uma condutividade de 10 Siemens por

Introdução

metro (S.m^{-1}), um valor maior do que qualquer outro polímero conhecido. Como comparação, o teflon apresenta uma condutividade de $10^{-16} \text{ S.m}^{-1}$ enquanto a prata e o cobre 10^8 S.m^{-1} , como mostra a Figura 5:

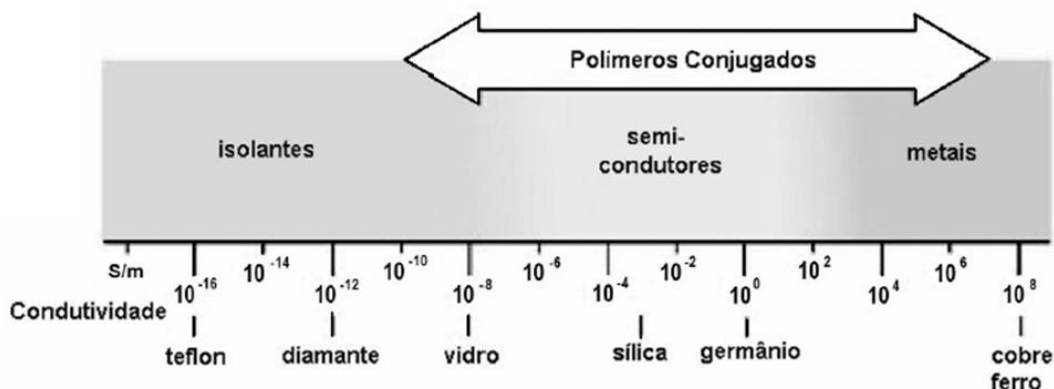


Figura 5: Condutividade de polímeros condutores em comparação com outros materiais.

Em 1979 Diaz e colaboradores (Diaz e Kanazawa, 1979) eletrodepositaram um filme de polipirrol de boa resistência mecânica e com condutividades elétricas muito mais altas (100 S.cm^{-1}) e excelente estabilidade ao ar abrindo o caminho para intensivas sínteses e estudos de uma nova classe de materiais, os polímeros condutores heterocíclicos e aromáticos (Diaz, Vallejo *et al.*, 1981; Ahuja, Mir *et al.*, 2007).

Na década de 80 estudos de polimerização anódica (Joachim, Shamsheer *et al.*, 1983) estenderam-se para outros monômeros heterocíclicos como o politiofeno, polifurano, entre outros (Frank, 1981). Entre estes, o mais estudado é o politiofeno, por sua estabilidade ao ar e a água, tendo aplicações em dispositivos ópticos e baterias secundárias.

No mesmo período houve o primeiro grande interesse sobre a polianilina, quando Diaz e colaboradores (Diaz e Logan, 1980) conseguiram depositá-la sobre platina como um filme fino e, assim, algumas propriedades foram estudadas, tais como, a eletroatividade e o eletrocromismo. A polianilina e seus derivados são hoje em dia muito estudados, pois estes podem ser dopados por processos não redox e por possuírem diferentes estados de oxidação, como as formas esmeraldina, pernigranilina e leucoesmeraldina.

Introdução

1.5.2 MECANISMO DE CONDUÇÃO

O mecanismo da condução em alguns polímeros é muito complexo, já que um mesmo material pode exibir uma condutividade dentro de uma escala de até quinze ordens de valor e muitos envolvem diferentes mecanismos dentro de regimes diferentes (Gerard, Chaubey *et al.*, 2002; Bhadra, Khastgir *et al.*, 2009).

Em geral, os PIC's apresentam uma configuração de ligações conjugadas (Han, Qiu *et al.*, 2006) – ligações simples e duplas alternadas ao longo das cadeias – responsável pelo processo de condução eletrônica. Além da condutividade elétrica, estes elétrons alternados são responsáveis por outras propriedades, como baixa energia de transição ótica, baixo potencial de ionização e alta afinidade elétrica. Devido a isto, os PIC's são também chamados de "metais sintéticos" (MacDiarmid, 2001), e têm sido utilizados em eletrocatalise, separação por membranas e cromatografia, porém a aplicação destes na modificação de eletrodos convencionais criou novas possibilidades no desenvolvimento de sensores.

A origem da condutividade dos polímeros vem dos estados de oxidação e redução, nestes estados há perda ou ganho de elétrons nas estruturas dos polímeros. Quando os polímeros estão eletricamente carregados, o contra-íons da solução eletrolítica entra na cadeia polimérica produzindo uma eletroneutralidade. Nos polímeros condutores os transportadores de carga são gerados dentro da cadeia do polímero e os contra-íons, são denominados dopantes (Pron e Rannou, 2002).

O modelo de condução em polímeros condutores aceito atualmente é o que envolve a formação de pólarons e bipólarons (figura 6), isto é, a formação de níveis de energia entre as bandas de condução e de valência. Neste modelo os pólarons e bipólarons estão livres para apresentarem movimentos ao longo da cadeia do polímero, resultando desta forma em condutividade eletrônica.

Quando o nível de oxidação é aumentado pelo aumento da diferença de potencial aplicado, quando da polimerização eletroquímica, a concentração de pólarons aumenta, ficando muito próximos, aumentando a chance de formarem bipólarons. Neste ponto do processo de oxidação, a condutividade aumenta acentuadamente. Isto ocorre porque as componentes do radical do polaron se combinam formando a ligação π , e então as cargas positivas alcançam uma

Introdução

mobilidade muito alta dentro da cadeia. Para baixos níveis de oxidação, forças coulômbicas de repulsão dos pólarons carregados positivamente previnem a combinação dos radicais que poderiam levar ao bipólaron.

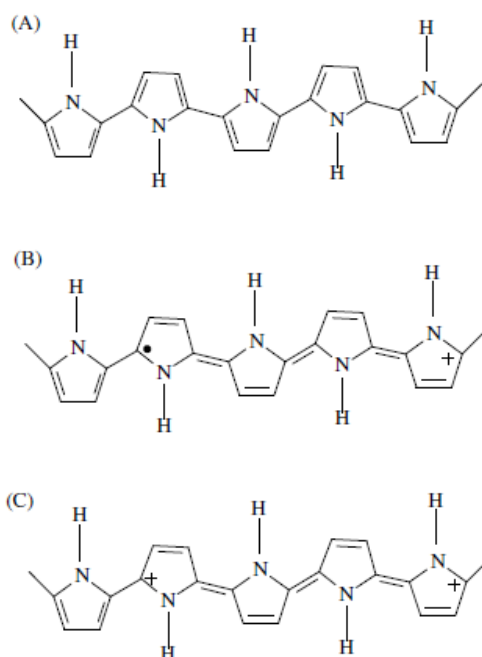


Figura 6: Estrutura para o polipirrol (A) polímero neutro; (B) pólaron e (C) bipólaron

1.5.3 SÍNTESE DE POLÍMEROS CONDUTORES

As reações de síntese de PIC's podem ser obtidas via química ou eletroquímica (Guimard, Gomez *et al.* 2007 ; Liu, Ren *et al.*, 2006; Franco, Diego L., Afonso, André S. *et al.*, 2008). Na síntese química a oxidação é feita pelo contato com um agente oxidante capaz de produzir um potencial de oxidação igual ou superior ao necessário para oxidar o monômero em um meio adequado. Polimerização induzida quimicamente não é muito eficiente no recobrimento de superfícies, pois forma um material de baixa aderência ao contrário do observado na eletropolimerização (Ramanavicius, Ramanaviciene *et al.*, 2006).

Uma das principais vantagens da síntese química é a possibilidade de obtenção de grandes quantidades do polímero. Na técnica de

Introdução

eletropolimerização, a dopagem ocorre de forma mais uniforme por ser simultânea à polimerização (Tahir, Alocilja *et al.*, 2005).

A formação do filme a partir de polímero condutor em uma superfície envolve um número subsequente de passos. De uma forma geral, pode-se simplificar o mecanismo de síntese dos PIC's citando-se as etapas principais de transporte de difusão do monômero à superfície do eletrodo e os sucessivos passos de acoplamentos oxidativos (Gerard, Chaubey *et al.*, 2002):

- i. oxidação do monômero a um cátion radical seguido pelo acoplamento para formar um dímero (dimerização);
- ii. oxidação eletroquímica dos oligômeros formados;
- iii. propagação da cadeia devido às reações de acoplamento;
- iv. precipitação das cadeias do polímero policatiônico na superfície do ânodo quando o comprimento destas ultrapassar o limite de solubilidade.

Após a formação do cátion radical do pirrol por eletro-oxidação na superfície do eletrodo, ocorre a dimerização e então aromatização por desprotonação. O dímero se oxida ligeiramente mais facilmente do que o monômero e permite assim que reações sucessivas de acoplamento prossigam, pois o potencial de oxidação do polímero é sempre mais baixo do que o do monômero (Ahuja, Mir *et al.*, 2007). O polímero é ionizado eletroquimicamente a um estado condutor, sendo a neutralidade de cargas do composto como um todo mantida pela incorporação do contra-íon proveniente do eletrólito. Isto é essencial porque a precipitação do polímero não oxidado, por estar no estado isolante, pararia a reação.

Os passos anteriormente citados do mecanismo da reação de polimerização são mostrados na Figura 7 (Ahuja, Mir *et al.*, 2007; Singh, Kathuroju *et al.*, 2009).

Introdução

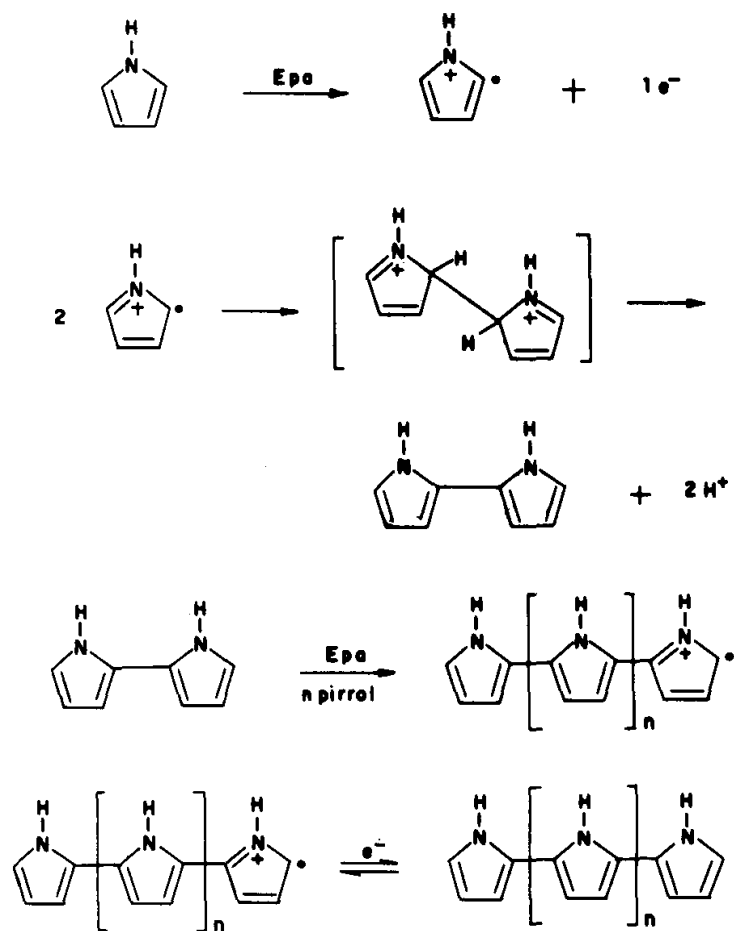


Figura 7: Mecanismo de eletropolimerização do pirrol.

As propriedades do filme polimérico (porosidade, espessura) podem ser facilmente controladas pelos parâmetros eletroquímicos (Stanca e Popescu, 2004): por exemplo, o valor da corrente ou potencial (método galvânico ou potenciostático, respectivamente), influencia diretamente na homogeneidade e densidade do filme obtido (Muñoz, Heras *et al.*, 2007).

A eletropolimerização pode ser realizada em temperatura ambiente (Peng, Zhang *et al.*, 2009) na maioria dos casos, sofrendo menor influência da temperatura que a oxidação química (Guimard, Gomez *et al.*). A grande vantagem é que o filme polimérico pode ser produzido em qualquer objeto metálico inerte no meio e na faixa de potencial aplicada, sobre qualquer forma e tamanho, ou mesmo em eletrodos de áreas muito pequenas, com um bom grau de aderência, o que favorece na criação de microcélulas eletroquímicas, reduzindo assim as quantidades de reagentes consumidos nos experimentos.

Introdução

1.5.3.1 POLIMERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA – CONCEITOS E CONSIDERAÇÕES GERAIS

A polimerização eletroquímica, ou eletropolimerização, consiste em conduzir de forma potenciostática (isto é, sob tensão constante), potenciodinâmica (medida de corrente pela variação de potencial aplicado) ou galvanostática (sob corrente constante) o monômero em um potencial acima de seu potencial de oxidação (Gerard, Chaubey *et al.*, 2002). É uma técnica realizada normalmente em uma célula eletroquímica na configuração padrão de três eletrodos, em solução geralmente aquosa de um monômero e de um eletrólito (Ahuja, Mir *et al.*, 2007).

Filmes eletroquimicamente polimerizados de monômeros aromáticos heterocíclicos, tais como pirrol (Han, Qiu *et al.*, 2006), tiofeno (Guimard, Gomez *et al.* 2007), fenileno (Ahuja, Mir *et al.*, 2007) e a polianilina (Malinauskas, Garjonyte *et al.*, 2004) têm sido fonte de muitos estudos encontrados na literatura (Eftekhari, 2004), que mostram como as condições de síntese (concentração do eletrólito, concentração do monômero, número de ciclos e velocidade de varredura) influenciam nas propriedades físicas, eletroquímicas e morfológicas do filme (Villarreal, Morales *et al.*, 2001).

1.5.3.2 ELETRODOS

A eletropolimerização geralmente é conduzida em um sistema padrão de célula de três eletrodos consistindo de um eletrodo de trabalho, um contra-eletrodo e de um eletrodo de referência. O eletrodo de trabalho atua como suporte para a formação do polímero. Como os filmes são produzidos por um processo oxidativo, é necessário que o material do eletrodo não seja propenso à oxidação. Por esta razão, são utilizados materiais como o ouro, platina, titânio, níquel e paládio, eletrodos de carbono e eletrodos de vidro revestido com óxido de estanho (Pereira, Santos *et al.*, 2002).

A função do contra-eletrodo é fornecer a corrente requerida pelo eletrodo de trabalho sem influenciar nas características dos dados medidos e, como consequência, o contra-eletrodo deve ter uma área grande quando comparada ao eletrodo de trabalho (Bard, 2000).

Para que seja obtido um filme de espessura uniforme e homogêneo, a célula deve ser configurada com o contra-eletrodo equidistante de todos os

Introdução

pontos do eletrodo de trabalho, mantendo as linhas de força entre o ânodo e o cátodo o mais semelhantes possível. Isto garante uma densidade de corrente uniforme durante a eletropolimerização, o que interfere na natureza do filme. O eletrodo de referência tem a função de medir o potencial e servir como um parâmetro para o potenciostato mantê-lo estável durante a eletropolimerização.

1.5.3.3 MONÔMEROS

Os monômeros eletroquimicamente polimerizáveis apresentam potenciais de oxidação relativamente baixos, suscetíveis a reações de substituição eletrofílica e decréscimo no potencial de oxidação no decorrer das reações de acoplamento, o que favorece o crescimento das cadeias.

Nesse trabalho, o monômero utilizado para os estudos de eletropolimerização em eletrodo de carbono grafite foi o ácido 2-hidroxifenilacético (2-HFA). Existem trabalhos na literatura que utilizam os isômeros 3-HFA e 4-HFA para modificação de eletrodos (Oliveira, Vieira *et al.* 2010; Silva, Ferreira *et al.*, 2008; Silva, Ferreira *et al.*, 2009). O monômero 2-HFA (Figura 8) apresenta um grupo hidroxila (-OH) e uma carboxila (-COOH) em sua estrutura, que faz com que a solubilidade deste composto seja maior em solventes mais polares. O grupo -OH ligado ao anel aromático pode ser oxidado gerando um cátion radical, dando origem a espécie reativa fundamental para a polimerização (Kaya e Baycan, 2007).

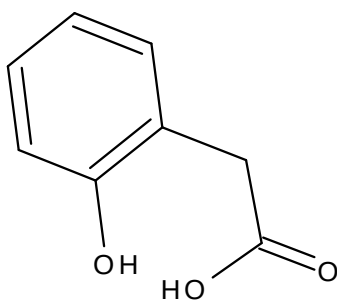


Figura 8: Estrutura do ácido 2 hidroxifenilacético

Em pesquisas feitas na literatura não foi encontrado publicações de trabalhos envolvendo a eletropolimerização deste monômero como agente modificador de superfície eletródica de grafite pirolítico, portanto o ineditismo deste trabalho é a justificativa para essa escolha. O LAFIPE tem desenvolvido

Introdução

trabalhos relativos aos isômeros *meta* e *para* do ácido 2-hidroxifenilacético portanto os resultados deste trabalho poderão ser usados para comparações com os demais.

1.5.3.4 ELETRÓLITOS

Eletrólito é uma substância que, quando dissolvida em um dado solvente, produz uma solução com uma condutividade elétrica maior que a condutividade do solvente. Considerando como solvente a água, servem de exemplos como eletrólitos: sais (cloreto de sódio), ácidos (ácido sulfúrico) e bases (hidróxido de sódio).

Em sistemas eletroquímicos o eletrólito suporte (ou eletrólito de suporte) é um eletrólito que, adicionado em altas concentrações (cerca de cem vezes maior que a da espécie eletroativa), pode conferir à solução e à interface (do tipo metal-solução) em estudo uma série de propriedades. Tais propriedades, em geral são resultantes da manutenção da força iônica alta e constante da solução, o que, como será visto, simplifica a análise dos sistemas eletroquímicos (Agostinho, Villamil *et al.*, 2004).

1.5.3.5 DOPAGEM (DOPING)

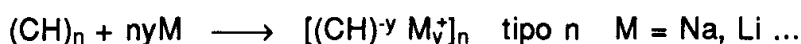
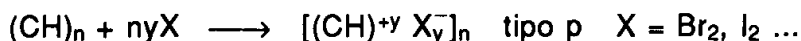
Tratando-se de PIC's, o conceito de dopagem é crucial para a observação de que estes materiais exibem uma propriedade bastante particular de variarem seu comportamento elétrico de isolante a supercondutor, dependendo da modificação química aplicada (Pron e Rannou, 2002).

O termo “dopagem” significa a conversão de um polímero neutro (ou seja, na forma isolante) em um complexo iônico condutor por um processo de oxi-redução. O equilíbrio de cargas como um todo é conseguido pela incorporação dos contra-íons, ou seja, dos íons dopantes (Guimard, Gomez *et al.* 2007). Com o nível de dopagem é possível controlar a condutividade elétrica do polímero. Quanto mais facilmente os elétrons das cadeias poliméricas puderem ser removidos ou adicionados para formarem compostos iônicos (mobilidade do ânion dentro e fora da película), mais o polímero é propenso à dopagem.

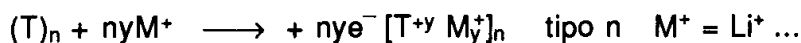
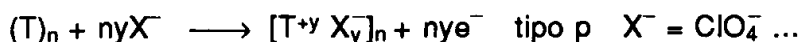
Introdução

A dopagem química com uso de agente oxidante corresponde à dopagem tipo "p". O polímero forma um complexo catiônico, incorporando a forma reduzida do agente oxidante como íon dopante. A dopagem química com agente redutor é denominada tipo "n", onde é formado um complexo polimérico aniônico, incorporando a forma oxidada do agente redutor (Guimard, Gomez *et al.*, 2007 ; MacDiarmid, 2001; Ahuja, Mir *et al.*, 2007).

Dopagem química do poliacetileno (CH)_n:



Dopagem eletroquímica do politiofeno (T)_n:



As reações redox apresentadas no esquema anterior são chamadas de dopagem tipo p ou n, por analogia aos semicondutores inorgânicos, e estas são responsáveis pela condutividade elétrica e propriedades eletroquímicas e eletrocromáticas dos polímeros condutores intrínsecos (Paoli e Zoppi, 1993).

O mesmo efeito pode ser obtido eletroquimicamente submetendo o polímero neutro ao potencial correspondente de oxidação ou redução (dopagem eletroquímica). Neste caso, os íons dopantes são provenientes do eletrólito presente na solução eletrolítica, podendo-se assim trocar o íon dopante do polímero (Guimard, Gomez *et al.* 2007).

1.4 BIOSSENSORES

Os biossensores são sensores modificados com material biológico intimamente ligado à superfície de um transdutor (Marques e Yamanaka, 2008); D'souza, 2001). A princípio, é possível construir um biossensor para qualquer molécula orgânica capaz de interagir com uma espécie biológica. Das várias definições encontradas, a que parece mais completa define biossensores como: "uma ferramenta ou sistema analítico que consiste em um material biológico imobilizado em contato íntimo com um dispositivo adequado

Introdução

de transdução o qual converte o sinal bioquímico em um sinal elétrico quantificável” (Scheller, Wollenberger *et al.*, 2001; Mousty, 2004).

No que diz respeito aos biossensores eletroquímicos, ou seja, os que convertem o sinal biológico em uma grandeza tal como corrente ou potencial elétrico, a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) criou algumas definições, classificações e nomenclaturas, as quais definem biossensor eletroquímico como "um dispositivo integrado auto-referente (self-contained), capaz de fornecer informação analítica específica, quantitativa ou semiquantitativa, utilizando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico), o qual é mantido em contato espacial direto com um elemento de transdução eletroquímica" (Thévenot, Toth *et al.*, 2001; [IUPAC] *Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification*, 2009).

Admitindo que princípios biológicos são amplamente utilizados para o reconhecimento molecular de substâncias, os biossensores podem ser aplicados nas mais diversas áreas: em diagnósticos clínicos, incluindo os testes rápidos para dosagens bioquímicas, no controle ambiental para a monitoramento de substâncias como fenóis, pesticidas e metais pesados, no controle de qualidade de matéria prima e produto processado da indústria de alimentos, avaliação de contaminação microbiana, concentração de nutrientes e corantes, e na indústria de fermentações, na monitoramento e controle contínuo da composição de biomassa, substrato, produtos e subprodutos presentes no meio (Zhang, Wright *et al.*, 2000; Chen, Burrell *et al.*, 2002). As características de reconhecimento dos biossensores são geralmente determinadas por elementos seletivos presentes na membrana de reconhecimento (Zhang, Wright *et al.*, 2000). Composição tanto da espécie de interesse quanto do elemento de reconhecimento biológico são de grande importância para garantir o desempenho do sensor, e podem ser relacionados a parâmetros como seletividade, sensibilidade, estabilidade, tempo de resposta e possibilidade de reutilização do mesmo (Rahman, Park *et al.*, 2006).

A camada de reconhecimento biológico deve estar intimamente associada a um transdutor físico, para que seja detectado o sinal de interação entre a espécie analítica de interesse, e o bioelemento presente na superfície de detecção (Wilson e Gifford, 2005). Uma vez ocorrida a interação, o sinal

Introdução

deve ser amplificado de forma a ser facilmente detectado e amplificado por um transdutor. Para o desenvolvimento de um biossensor, alguns fatores devem ser levados em consideração, como a seleção do bioelemento adequado ao analito a ser detectado, a escolha de um método de imobilização, transdutor adequado, e considerações como a faixa de medição, linearidade e minimização de interferência, além da caracterização física do biossensor, o que proporcionará o desenvolvimento de métodos com mínimo de interferência. Um dos exemplos mais conhecidos e bem sucedidos de biossensor, utilizado principalmente por pacientes diabéticos, é o de verificação da concentração de glicose, já disponível comercialmente.

Ainda que um biossensor ideal não exista de fato, uma das características mais importantes está relacionada à elevada especificidade conferida pelo bioelemento seletivo a que está associado (Wilson e Gifford, 2005). Desta forma, para um bom desempenho, é necessária uma concentração adequada do bioelemento, além de baixas interações não específicas e estabilidade do biocomponente imobilizado (Conroy, Hearty *et al.*, 2009). A capacidade seletiva do biossensor está diretamente relacionada com a estrutura, a função do bioelemento e sua interação com o analito. Fatores interferentes, mesmo em concentrações significativamente superiores às moléculas a serem detectadas na amostra biológica, não devem exercer influência na resposta analítica.

O limite de detecção e sensibilidade do método podem estar relacionados à habilidade do biocomponente imobilizado em diferenciar a espécie analítica de interesse com confiança e precisão (García-Aljaro, Bangar *et al.* 2010). A seletividade do reconhecimento das moléculas presentes na amostra pelo componente biológico, aliada à sensibilidade do transdutor, tem gerado grande número de trabalhos científicos na área de sensores (Dennison e Turner, 1995; D'orazio, 2003; Hu, Lu *et al.*, 2008).

Um biossensor ideal deve ter reduzido o seu tempo de resposta, o que possibilita sua aplicação no monitoramento e detecção em tempo real da presença ou atividade de um determinada substância (Wilson e Gifford, 2005). Processos analíticos que apresentem um longo tempo de resposta devido a um processo cinético lento, por exemplo, podem limitar suas possíveis aplicações e impedem que as respostas sejam obtidas em tempo real. Adicionalmente

Introdução

deve possuir elevada estabilidade, tanto operacional como de armazenamento, o que depende significativamente do método de imobilização escolhido para o bioelemento.

A possibilidade de reutilização é outra característica relevante para os biossensores, que, além de diminuir os gastos com reagentes, e conseqüentemente, o custo de cada ensaio, geralmente assegura maior reprodutibilidade aos resultados. A dificuldade de reutilização tem sido um problema recorrente em biossensores baseados, por exemplo, em reações imunológicas, pois a elevada afinidade da ligação antígeno-anticorpo não permite a sua separação após o evento de reconhecimento.

A necessidade de métodos analíticos mais versáteis para o monitoramento ambiental tem estimulado a produção de uma grande variedade de métodos analíticos. Os biossensores revelam grandes perspectivas quanto a sua utilização no monitoramento "*on-line*" de efluentes (e outras matrizes de interesse ambiental), possibilitando uma rápida adaptação nos processos de tratamento. A incorporação de moléculas com atividade biológica associado a análise por injeção em fluxo em metodologias analíticas tem aumentado sensivelmente nos últimos anos, obtendo sucesso nos mais variados procedimentos analíticos, principalmente nos que visam a área de controle ambiental.

1.4.1 TRANSDUTOR

O transdutor é o elemento que recebe os sinais físico-químicos do processo biocatalítico, geradas pela interação biorreceptor-analito e as converte em um sinal que pode ser eletronicamente visualizado, amplificado e armazenado (Tothill, 2001; Hu, Lu *et al.*, 2008). O sistema de transdução deve ser adequado ao sensor de acordo com a natureza da interação bioquímica com as espécies de interesse (Luong, Male *et al.*, 2008).

O *design* do transdutor deve ser altamente específico para o analito de interesse e responder em uma faixa de concentração apropriada, ter um tempo de resposta baixo, apresentar a possibilidade de miniaturização e compensar efeitos externos (como temperatura e umidade) com o propósito de ser utilizado em aplicações práticas (Türkarslan, Kayahan *et al.*, 2009).

Introdução

Destaca-se a utilização dos seguintes transdutores: eletroquímicos, óticos, térmicos e de massa, (tabela 2). Os transdutores eletroquímicos se destacam na construção de biossensores, principalmente devido à sua simplicidade, ao seu amplo intervalo de linearidade e sua rápida resposta (Barsan e Brett, 2009; Conroy, Hearty *et al.*, 2009).

Tabela 2: Tipos de transdutores utilizados na construção de biossensores e técnicas de detecção.

Transdutores	Técnicas
Eletroanalítico	Amperometria Potenciometria Condutimetria Impedância
Ótico	Espectrofotometria Fluorimetria Elipsometria Interferometria Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)
Térmico	Termômetros de precisão Termístores
Massa	Microbalança de Quartzo

Os transdutores amperométricos e potenciométricos têm sido mais empregados na construção de biossensores por apresentarem maior sensibilidade (Wang, 1999). Dentre outras vantagens dos biossensores amperométricos e potenciométricos, quando comparados a outros sistemas de transdução, pode-se citar a facilidade de construção, baixo custo e estabilidade, enquanto que os problemas mais frequentes são a velocidade de resposta e a interferência e/ou inibição por substâncias não-específicas presentes na amostra (Conroy, Hearty *et al.*, 2009).

Introdução

1.4.2 BIORRECEPTOR

O biorreceptor (tabela 3) é o elemento biologicamente ativo, o qual interage de forma específica com o analito, gerando uma alteração em um ou mais parâmetros físico-químicos associados com esta interação (Tothill, 2001). O biorreceptor é responsável pelo reconhecimento do analito e também pela especificidade do sensor (Luong, Male *et al.*, 2008; Conroy, Hearty *et al.*, 2009).

Tabela 3: Principais biorreceptores utilizados na construção de biossensores eletroquímicos.

Biorreceptores	Descrição
Anticorpos	Possuem estrutura tridimensional que pode se ligar com o antígeno de forma específica.
Ácidos Nucleicos	Possuem alta especificidade dos pares de bases distribuídos ao longo da dupla hélice que forma a cadeia de DNA
Microorganismos (bactérias, fungos, etc)	Possuem a capacidade de assimilar compostos orgânicos e produzir enzimas que podem ser detectadas por um transdutor
Tecidos orgânicos (de plantas ou animais)	Possuem grande quantidade de enzimas imobilizadas, não apresentam alta seletividade, porém possuem uma vida útil elevada
Enzimas	São proteínas capazes de catalisar reações químicas de maneira bastante seletiva
Proteínas	Possuem estrutura tridimensional que pode sofrer mudanças conformacionais em reações

A especificidade de um biossensor está intimamente ligada à seleção da molécula do biorreceptor usada (D'souza, 2001). Apesar de anticorpos e ácidos nucléicos geralmente apresentarem maior especificidade, as enzimas são

Introdução

muito mais utilizadas, principalmente devido à facilidade de obtenção em condições de elevada pureza (Ahuja, Mir *et al.*, 2007).

Em relação ao sistema de reconhecimento biológico, os biossensores podem ser classificados em duas categorias: biocatalíticos e bioafinidade (Mello e Kubota, 2002).

1.4.2.1 RECONHECIMENTO POR BIOCATÁLISE

O biossensor biocatalítico é baseado em uma reação catalisada por um componente biológico. Três tipos de biocatalisadores são comumente utilizados: enzimas, células e tecidos. Os biossensores enzimáticos são os mais conhecidos e estudados atualmente e têm sido aplicados em matrizes biológicas com grande frequência (Barlett e Cooper, 1993; Andreescu, Njagi *et al.*, 2008). Compreende de forma geral um suporte no qual a enzima é imobilizada, mantendo suas propriedades ativas e reconhecendo o analito a ser analisado de forma seletiva. Os biossensores enzimáticos estão se tornando muito úteis em aplicações analíticas, tais como monitoramento ambiental, detecção de doenças entre outras devido à possibilidade de se combinar a seletividade e sensibilidade da enzima com a simplicidade dos transdutores eletroquímicos (Davis, Huw Vaughan *et al.*, 1995; Dennison e Turner, 1995; D'orazio, 2003).

1.4.2.2 RECONHECIMENTO POR BIOAFINIDADE

Biossensores por bioafinidade envolvem DNA ou oligonucleotídeos, anticorpos e/ou antígenos, ligação protéica ou receptor protéico, o qual forma um composto estável com o correspondente ligante e resultam em um sinal de transdução (Hu, Lu *et al.*, 2008).

Os mais desenvolvidos exemplos de receptores biocomplexos são os imunossensores. O princípio básico de todos os imunossensores é a especificidade do reconhecimento molecular de antígenos por anticorpos formando um complexo estável, de forma similar à metodologia dos imunoensaios. Resultam em sensores altamente seletivos, baseados nos princípios de fase sólida de imunoensaios e nos eventos físico-químicos resultantes da interação anticorpo - antígeno.

Introdução

Diversos métodos de imobilização foram relatados para o desenvolvimento de técnicas de ligação antígeno-anticorpo para aumentar a sensibilidade da detecção ou para a ligação covalente do anticorpo ou da proteína na superfície (Hu, Lu *et al.*, 2008).

1.4.3 TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO DE BIOCOMPONENTES

O objetivo de qualquer metodologia de imobilização é manter a máxima atividade da biomolécula na superfície do transdutor. Analisando os fatores que influenciam os biocomponentes, como as condições do meio ou o procedimento de imobilização, é possível definir a técnica que possui as condições mais adequadas ao sistema em estudo (Albareda-Sirvent, Merkoçi *et al.*, 2000).

Em um biossensor, a biomolécula incorporada atribui um alto grau de seletividade, porém é influenciado por condições extremas do meio, tais como temperatura, pH e força iônica. A atividade do biocomponente imobilizado depende da área superficial, porosidade e caráter hidrofílico da matriz, assim como das condições da reação e método de imobilização. Em alguns casos, o próprio produto de reação pode causar o decréscimo da atividade de reação (auto-inativação).

Uma das maiores dificuldades na construção de biossensores enzimáticos, está relacionado com a estabilidade da molécula biológica. Fora do seu ambiente bioquímico, a proteína, da qual a enzima faz parte, tende, naturalmente, a se desnaturar diminuindo ou anulando sua atividade catalítica (Ahuja, Mir *et al.*, 2007), prejudicando o desempenho do biossensor (Teles e Fonseca, 2008). A perda de atividade pode ser diminuída pela imobilização adequada da enzima, o que diminui a velocidade de desnaturação da mesma. Desta forma, uma das etapas muito importante para construção do biossensor é a imobilização da enzima, pois a imobilização de forma eficiente diminui o custo por análise, aumenta a rapidez e exatidão do processo (Albareda-Sirvent, Merkoçi *et al.*, 2000).

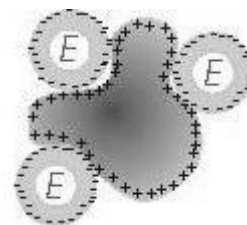
Como a estabilidade é um dos principais problemas que afetam o potencial comercial, uma grande variedade de técnicas de imobilização tem sido investigadas para a produção de biossensores mais estáveis (Ahuja, Mir *et al.*, 2007). As técnicas utilizadas para a imobilização de biocomponentes são

Introdução

bastante diversificadas, entre as quais se destacam a adsorção física, a ligação cruzada, a ligação covalente e o aprisionamento.

1.4.3.1 ADSORÇÃO FÍSICA

A adsorção consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado e na exposição do eletrodo a esta solução (Albareda-Sirvent, Merkoçi *et al.*, 2000; Teles e Fonseca, 2008). Proporciona incorporação simples e rápida do composto em uma ampla gama de eletrodos base e é bastante empregada, dada sua simplicidade e eficiência em muitos casos. As forças de ligação são principalmente devidas a ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e formação de sítios complexos de transferência de elétrons. As vantagens desta técnica são: ausência de modificação da biomolécula, baixo custo e possibilidade de regeneração da matriz, entretanto, as forças de ligação são susceptíveis a mudança de pH, temperatura e força iônica do meio (Hafaid, Chebil *et al.* 2010). Como a adsorção é um processo de equilíbrio, pode haver a ocorrência de dessorção do modificador para o meio durante a sua utilização, resultando na perda de reprodutibilidade e redução da vida útil do sensor preparado por este método.



1.4.3.2 LIGAÇÃO CRUZADA

A técnica de ligação cruzada baseia-se na imobilização como resultado da reação da enzima com um agente bifuncional em que se forma uma ligação covalente (Albareda-Sirvent, Merkoçi *et al.*, 2000; Teles e Fonseca, 2008). Os reagentes que permitem o uso desta técnica contêm grupos reativos terminais específicos para os grupos funcionais (por exemplo aminas, figura 9) que se encontram nas outras moléculas a imobilizar. Para a maioria das aplicações é necessário manter a estrutura original da proteína, por isso a ligação cruzada é feita em condições pouco agressivas tanto de pH como de tampões. É também importante obter um grau de conjugação entre o agente de ligação cruzada e a proteína, pois em alguns casos (incluindo enzimas em particular) é conveniente

Introdução

que não seja muito elevado de modo a permitir a manutenção da atividade biológica do fixado. Reagentes bi ou multifuncionais (glutaraldeído; 2-isocianato-4-isotiocianato tolueno; 2,4, biscloreto sulfonil fenol; etc.) são empregados tanto para imobilização quanto para a estabilização da enzima. O método baseia-se na formação de partículas microscópicas (ou rede polimérica) em decorrência de ligações covalentes cruzadas, entre moléculas de enzimas e/ou moléculas do suporte com reagentes funcionais. A imobilização da enzima com glutaraldeído é freqüentemente empregada, pois se observa boa estabilidade da enzima frente às variações de pH, força iônica, solventes e temperatura.

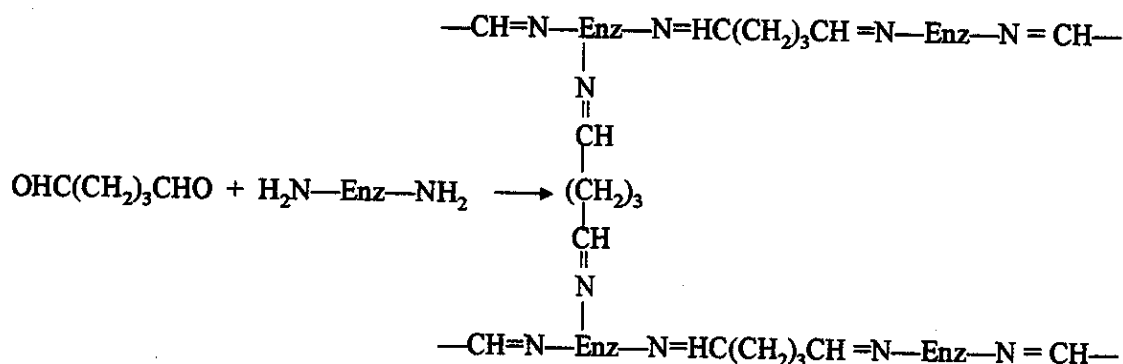


Figura 9: Ligação cruzada envolvendo glutaraldeído e grupos amino residuais livres nas enzimas.

1.4.3.3 LIGAÇÃO COVALENTE

Esta técnica é efetuada através da ligação entre grupos funcionais da molécula biológica de interesse e uma matriz de suporte, incorporando de forma estável o agente modificador através da manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes na superfície do eletrodo (Ahuja, Mir *et al.*, 2007). Esta técnica apresenta como vantagens a baixa resistência difusional e boa retenção da molécula durante a análise, e como desvantagens podem ser citadas o fato de que a matriz suporte não é regenerável e a ligação pode comprometer o sítio de interesse. Seu emprego é de especial interesse para a imobilização de enzimas, sendo amplamente empregado nesta área (Eftekhar, 2004). É importante que os aminoácidos essenciais para a atividade catalítica da enzima não sejam envolvidos na ligação covalente ao suporte. Por isso

Introdução

quando este método é utilizado, pode haver perda de atividade da enzima. Um exemplo desta técnica é a ligação covalente de uma enzima a um suporte via uma carbodiimida, como mostrado na figura 10. Um grupo carboxílico sobre o suporte reage com uma carbodiimida, este então acopla com um grupo amino sobre o material para formar uma ligação amida entre o suporte e a enzima (Oliveira e Vieira, 2006).

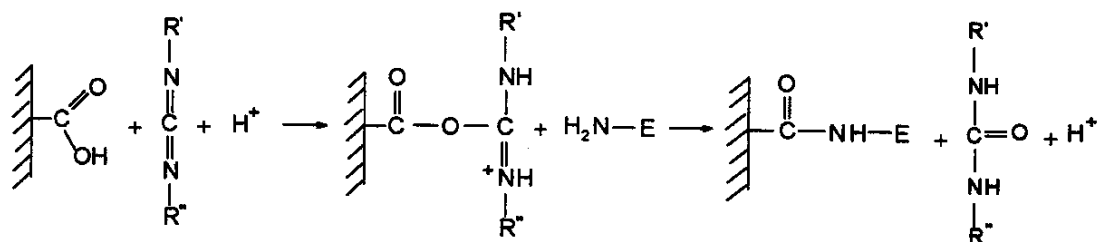
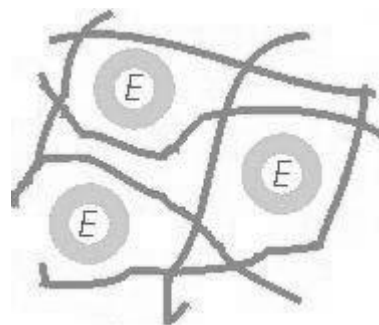


Figura 10: Reação via carbodiimida usada para a formação de ligação covalente entre a enzima e o suporte.

1.4.3.4 APRISIONAMENTO

Este método pode ser baseado na imobilização do biocomponente durante o crescimento de polímeros gerados por oxidação eletroquímica do monômero em solução com o biocomponente (Eftekhari, 2004). Os polímeros, cujos monômeros são solúveis em água, são mais utilizados, pois apresentam a vantagem de não desnaturarem enzimas. O aprisionamento ocorre sem reação química que possa afetar a atividade do material (Lei, Chen *et al.*, 2006). A vantagem da polimerização eletroquímica é que o filme pode ser preparado facilmente em um rápido procedimento e neste método há a possibilidade de eletrogerar um polímero cobrindo parte da superfície de um eletrodo de geometria complexa, apresentando um baixo custo. Como desvantagem, esta técnica apresenta uma alta barreira de difusão. Além disso, o procedimento de imobilização em



Introdução

uma etapa permite a fácil funcionalização da superfície de eletrodos, assim como o controle eletroquímico da espessura do filme polimérico.

A modificação com membranas poliméricas permite a imobilização de muitas monocamadas da espécie ativa na superfície modificada, com o recobrimento com filmes poliméricos condutores ou permeáveis ao eletrólito suporte e à espécie de interesse, ampliando consideravelmente a resposta eletroquímica (Ahuja, Mir *et al.*, 2007). Os filmes poliméricos ainda oferecem a vantagem de proteger a superfície do sensor contra impurezas, bloquear interferentes, permitir alta velocidade de transferência de elétrons e fornecer biocompatibilidade. No entanto este método sofre algumas limitações: é necessária uma grande quantidade do biocomponente em solução para que a imobilização seja perceptível. E, embora a quantidade de polímero depositada possa ser controlada, a quantidade de enzima imobilizada na matriz polimérica não pode ser estimada.

1.5 ENZIMAS

Enzimas são em sua maioria proteínas de elevado peso molecular, com propriedades catalíticas específicas presentes em todos os seres vivos. Consistem de uma estrutura tridimensional complexa com um centro ativo, local onde se processam as reações com determinados substratos. Este centro ativo é geralmente formado por resíduos de aminoácidos da cadeia protéica e um grupo não-protéico (resíduos de carboidratos, por exemplo), responsável pela atividade biológica da enzima.

Existem certos fatores no uso de enzimas, os quais devem ser considerados no planejamento de pesquisas e estudos sobre o tema: as enzimas trabalham sob condições estreitas de temperatura, pressão e pH; em particular, o alto custo de isolamento e purificação e a natureza instável quando fora de seu meio natural são as principais barreiras para o seu uso ainda maior.

Como outros catalisadores, elas aceleram as reações promovendo o alcance do equilíbrio sem alterá-las, através da diminuição da energia de ativação. Além de sua função catalítica, enzimas são caracterizadas por sua alta especificidade. Elas catalisam uma reação química com um único reagente

Introdução

ou número de reagentes estruturalmente similares, sendo estes reagentes denominados substratos. Dessa forma, a razão principal para o amplo uso de enzimas em biossensores envolve sua especificidade e propriedades catalíticas.

As reações catalisadas por enzimas podem ser usadas para a determinação de substratos, ativadores, inibidores e também da própria enzima. As enzimas apresentam diversas vantagens sobre os catalisadores químicos convencionais, com destaque para a especificidade e a seletividade, não apenas para reações particulares como também na diferenciação entre partes similares das moléculas (regioespecificidade) ou isômeros óticos (estereoespecificidade). Elas catalisam as reações apenas de uma faixa bastante estreita de reagentes (substratos), a qual pode consistir de um pequeno número de compostos intimamente relacionados (como a *tripsina*, que catalisa a hidrólise de alguns peptídeos e ésteres); uma única classe de compostos (a *hexoquinase* catalisa a transferência de um grupo fosfato da ATP para algumas hexoses); ou um simples composto (*glicose oxidase* oxida apenas a glicose entre os diversos tipos de açúcares existentes). Isto significa que além das altas velocidades de reação atingidas pela catálise enzimática, a especificidade deste sistema mantém o controle das reações paralelas, eliminando co-produtos indesejados. Além disto, algumas reações estereoespecíficas – como a conversão de glicose em frutose – não podem ser atingidas por métodos químicos clássicos sem o consumo de grande quantidade de tempo e trabalho.

1.5.1 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Os princípios gerais da cinética das reações químicas se aplicam às reações catalisadas por enzimas, porém mostra também um aspecto distinto que não se observa usualmente em reações não-enzimáticas, a saturação com o substrato. O efeito da concentração do substrato $[S]$ sobre a velocidade da reação catalisada pela enzima pode ser visto na Figura 11. Observa-se que em uma concentração baixa de substrato, a velocidade inicial da reação (V_0) aumenta quase linearmente com os aumentos da $[S]$, desta forma a reação é considerada de primeira ordem com relação ao substrato. Entretanto em

Introdução

concentrações maiores de substrato a velocidade aumenta por incrementos menores em respostas aos aumentos da [S], sendo neste intervalo a reação considerada de ordem mista. Posteriormente, com o aumento da concentração do substrato, a velocidade da reação torna-se independente da concentração do substrato e aproxima-se de uma velocidade constante. Nesta faixa de concentração a reação é de ordem zero com relação ao substrato, e a enzima é considerada saturada com seu substrato (Paiva, Balcão *et al.*, 2000; Krohn e Link, 2003).

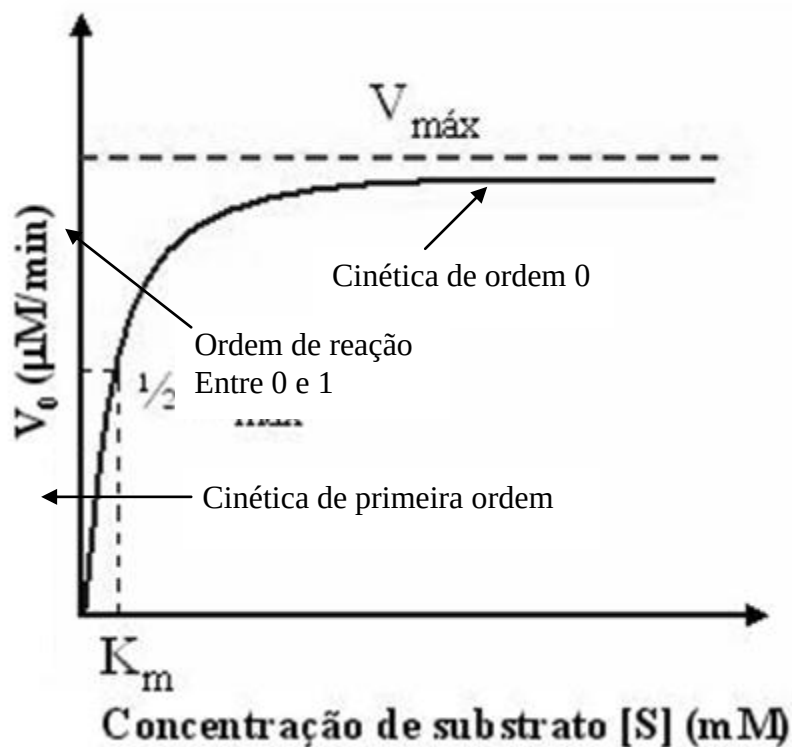
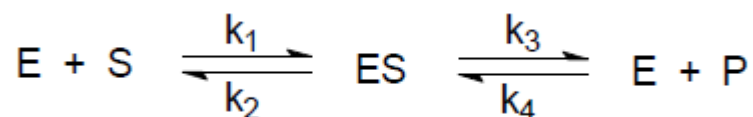


Figura 11: Efeito da concentração de substrato na velocidade da reação (concentração de enzima constante).

A teoria geral da cinética e ação enzimática foi desenvolvida por L. Michaelis e M.L. Menten em 1913 (Michaelis e Menten, 1913). Essa teoria considera que a enzima E combina com o substrato S para formar o complexo enzima-substrato ES, este se rompe para formar a enzima livre e o produto P. Essas reações são consideradas reversíveis:



Introdução

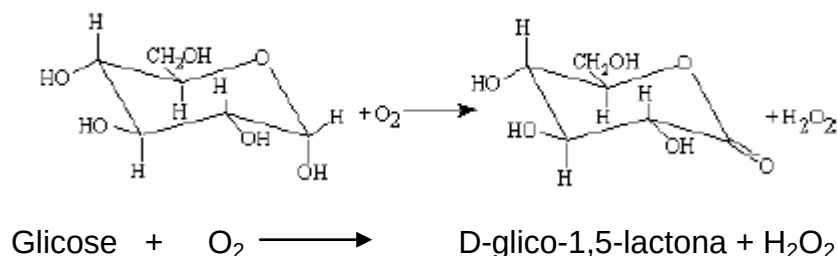
A equação de Michaelis-Menten expressa a relação entre a velocidade de uma reação enzimática e a concentração do substrato, podendo ser facilmente deduzida a partir da reação acima, onde milissegundos após a enzima e o substrato serem misturados, uma concentração ES é obtida e permanece constante enquanto a concentração de S estiver em excesso e k_1 for maior que k_3 . Essa condição é chamada estado estacionário da reação, uma vez que a velocidade de decomposição de ES se iguala à sua velocidade de formação.

1.5.2 ENZIMAS EM BIOSENSORES

Entre as diversas espécies de biocomponentes a serem imobilizados, as enzimas e os anticorpos são os mais utilizados em biossensores, com maior destaque para as enzimas (Gaspar, Habermüller *et al.*, 2001; Eftekhari, 2004; Haccoun, Piro *et al.*, 2006). Dentre estas, as mais utilizadas são a glicose oxidase (GOx), para biossensores de detecção e quantificação de glicose (Xian, Hu *et al.*, 2006) e a *horseradish peroxidase* (HRP), para peróxidos, principalmente para o H_2O_2 (Ricci e Palleschi, 2005; Sun, Zhang *et al.*, 2007; Wang, Li *et al.*, 2009; Yang, Yang *et al.*, 2009).

A multiplicidade dos processos de imobilização de enzimas reduz os custos de análises. A enzima imobilizada pode facilmente ser combinada com um transdutor apropriado no conjunto do biossensor (Haccoun, Piro *et al.*, 2006).

A GOx, extraída do *Aspergillus niger* catalisa a conversão da D-glicose e oxigênio a D-glico-1,5-lactona que é hidrolisada em ácido glucônico e H_2O_2 .



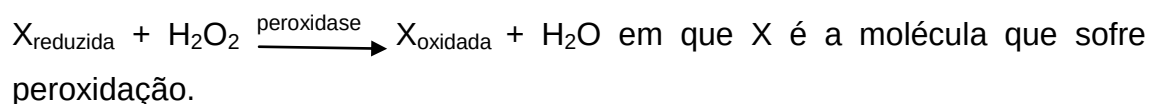
A GOx é uma flavoproteína, altamente específica à D-glicose, e é largamente usada para estimar a concentração de glicose no sangue e na urina através da formação de compostos coloridos (Pan, Chen *et al.*, 2005).

Introdução

A HRP é muito usada na construção de biossensores, e a mais citada como exemplo para as reações de enzimas do tipo peroxidase (Xu, Peng *et al.*, 2004). A utilização de outras peroxidases para a construção de biossensores é limitada por diversas razões, como a pouca disponibilidade comercial, instabilidade à temperatura ambiente e baixa taxa de transferência eletrônica atingida (Yang, Yang *et al.*, 2009). A HRP é considerada uma enzima de comportamento relativamente conhecido, a qual foi imobilizada com sucesso em diferentes tipos de suportes e métodos.

1.5.3 HORSERADISH PEROXIDASE

As peroxidases são enzimas oxirredutases (catalisam reações de óxido-redução) que oxidam substratos orgânicos, tendo o peróxido de hidrogênio como molécula aceitadora de elétrons (Varfolomeev, Kurochkin *et al.*, 1996; Songa, Arotiba *et al.*, 2009). A reação é descrita pela equação:



Estruturalmente, as peroxidases podem ser divididas em quatro classes: peroxidases bacterianas, peroxidases de origem animal, peroxidases fúngicas e peroxidases de plantas. As peroxidases podem também ser divididas quanto à presença de um grupo heme, ou seja, podem ser classificadas como hêmicas ou não-hêmicas. As peroxidases hêmicas catalisam reações de hidrólise usando o íon de ferro do grupo heme. As peroxidases não-hêmicas, também conhecidas como peroxirredoxinas, usam cisteínas com atividade redox no seu centro ativo. As peroxidases têm papel importante na desintoxicação celular ao eliminar o peróxido de hidrogênio.

O grupo heme nas peroxidases hêmicas tem o íon de ferro no estado de oxidação Fe(III) entre ciclos catalíticos. Uma molécula de peróxido oxida este íon, formando a espécie $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$, com alta capacidade oxidante, reduzindo-se quando oxida o substrato orgânico da peroxidase. No fim do ciclo catalítico, o ferro volta ao estado de oxidação Fe^{3+} . As peroxidases não-hêmicas possuem uma cisteína no centro ativo, que é oxidada por uma molécula de peróxido de hidrogênio, a “S”-hidroxicisteína. Esta cisteína forma então uma ligação dissulfeto com a cadeia lateral de outra cisteína da peroxirredoxina. Tal ligação

Introdução

química constitui uma forma oxidada das cisteínas e sua redução química é feita por um substrato orgânico (Ruzgas, Csöregi *et al.*, 1996).

A *horseradish peroxidase*, mostrada na figura 12A, é uma glicohemeproteína e consiste em 308 resíduos de amino ácidos, dois Ca^{2+} , e uma porção de ferriprotoporfirina IX (heme), figura 12B, ligada não covalentemente à cadeia polipeptídica que forma o sítio ativo da enzima. A massa molecular da HRP é 44 KDa, incluindo a cadeia polipeptídica (33,9 KDa), um grupo heme oxidado mais dois Ca^{2+} (aproximadamente 0,7 KDa), e uma cadeia polissacarídica (9,4 KDa). Ela é extraída da *Amoracia Rusticana*, uma raiz de plantas cultivadas em regiões temperadas com grande valor na culinária como molho ou tempero (Uliana, Riccardi *et al.*, 2008). A produção da horseradish peroxidase (HRP) ocorre relativamente em larga escala por causa de sua vasta gama de aplicações comerciais. Destacam-se a biodegradação de efluentes na indústria de papel e celulose, compostos fenólicos e detecção de peróxidos, oxidação de toxinas devido ao peróxido e biossensores de peróxido de hidrogênio, entre outras aplicações clínicas e biomédicas. Devido à catálise para formação de peróxido de hidrogênio, essa enzima promove oxidação de muitos doadores de hidrogênio cromogênicos. O pH ótimo varia na faixa de 6,0 a 6,5; sendo estável na faixa de pH entre 5,0 e 9,0.

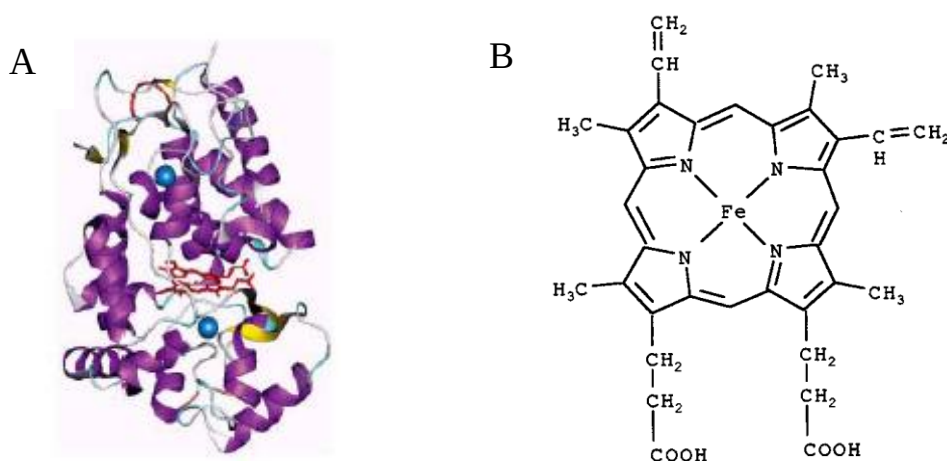
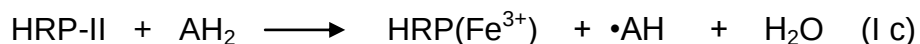
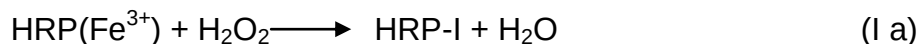


Figura 12: A - Representação tri-dimensional da estrutura da HRP C determinada por cristalografia de raio-x (Protein Data Bank, www.rcsb.org/pdb). O grupo prostético heme (em vermelho) está localizado entre os domínios distal e proximal, cada um contendo um íon Ca^{2+} (azul). As regiões de α -hélice e folha β da enzima são mostradas em violeta e amarelo, respectivamente; B – Estrutura da molécula de protoporfirina que é o sítio ativo de muitas peroxidases.

Introdução

1.5.3.1 CICLO CATALÍTICO DAS PEROXIDASES

As enzimas peroxidases catalisam a redução de peróxidos oxidando o grupo heme do sítio ativo da enzima (grupo prostético). De uma forma simplificada, o ciclo normal da HRP pode ser representado pelas equações:



Onde HRP-I e HRP-II são os intermediários oxidados da enzima, AH_2 é o substrato redutor e $\bullet\text{AH}$ é um radical livre.

O mecanismo geral de catálise da HRP está ilustrado na figura 13. Primeiramente ocorre a clivagem do peróxido de hidrogênio (agente oxidante) catalisada pela HRP. O grupo heme o qual contém Fe^{3+} é oxidado pelo peróxido de hidrogênio ao Composto I. Um dos oxigênios do peróxido fica retido neste grupamento e o restante da molécula sai na forma de água. Na ausência de doadores fortes de elétrons o composto I pode usar um elétron do substrato e se transformar no Composto II, que por sua vez aceita um elétron de outra molécula de substrato e retorna ao estado fundamental da enzima. Nesta etapa, a perda de um elétron do substrato geralmente é acompanhada pela perda de um próton, determinando a formação de um radical. A alta reatividade e baixa seletividade comumente associada aos radicais orgânicos torna a química dos produtos originários de peroxidases muito complicada (Kummer, Valeur *et al.*, 1996; Bronnikova, Schaffer *et al.*, 2000).

Os substratos que reduzem os Compostos I e II são chamados “substratos redutores” e a interação destes com o sítio ativo acontece através da posição delta da ponte heme. Não somente o peróxido de hidrogênio, como também muitos compostos contendo ligações peroxo podem gerar o Composto I (HRP-I). A redução do Composto II é geralmente a etapa determinante da velocidade da reação. O excesso de H_2O_2 pode inibir o ciclo catalítico normal, assim, o Composto II passa à forma de Composto III, que por perda de oxigênio pode chegar ao Composto IV, o qual pode reagir com H_2O_2 e retornar à forma de Composto II. Este caminho, além de possuir uma velocidade de reação muito inferior, ainda apresenta um agravante que é a possibilidade de o

Introdução

Composto III passar a uma forma inativa irreversível, ocasionando a perda total da atividade enzimática (Veitch, 2004).

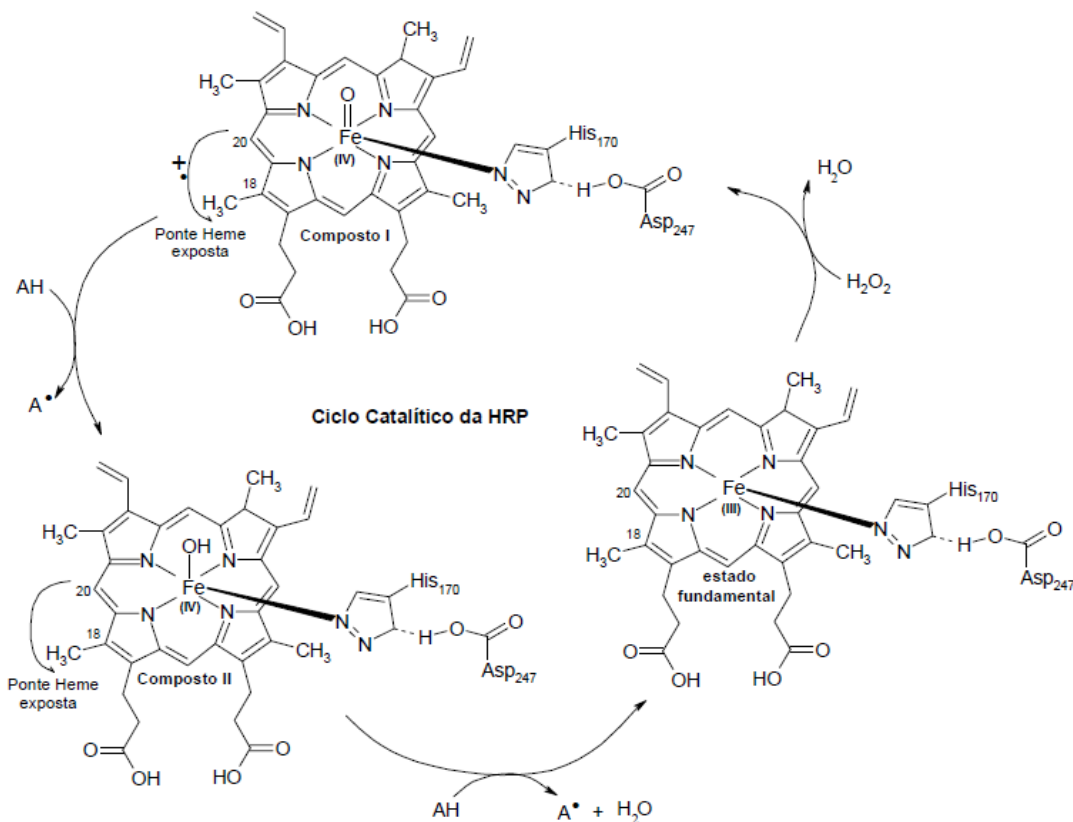


Figura 13: Mecanismo geral do ciclo catalítico da HRP na presença de H_2O_2 (agente oxidante). AH representa o substrato redutor e $A^\bullet$ o radical formado (Naves, 2008).

1.6 ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)

A análise por injeção em fluxo foi proposta em 1975 (Ruzicka e Hansen, 1975; Ruzicka e Hansen, 2008). Em mais de duas décadas, estes métodos assumiram grande importância, como se pode aquilatar pela quantidade de artigos relacionados ao assunto (Christian, 2003; Gallignani e Brunetto, 2004; Moreno-Cid, Yebra *et al.*, 2004; Magalhães, Lúcio *et al.*, 2009; Silvestre, Santos *et al.*, 2009; Moreno-Cid, Yebra *et al.*, 2004).

O crescente interesse na análise em fluxo se deve principalmente às características peculiares como (Ruiz-Medina e Llorent-Martínez, ; Mervartová, Polásek *et al.*, 2007):

- facilidade de automação;
- auto otimização;

Introdução

- condições de análise altamente reprodutíveis, já que o tempo de trânsito entre o injetor e o sistema de detecção é exatamente o mesmo para amostras e soluções de referência;
- relativa facilidade de obtenção de uma alta frequência analítica;
- baixo consumo de reagentes e amostras quando comparados aos procedimentos em batelada (alíquotas da ordem de microlitros);
- a manipulação das soluções é realizada através de bombas, injetores e tubulações apropriadas, melhorando a precisão e reduzindo contaminações, visto que a reação ocorre em sistema fechado, diminuindo a influência do operador e minimizando desvios nos resultados (Campanella, Pyrzynska *et al.*, 1996; Saurina e Hernández-Cassou, 2001).

A análise por injeção em fluxo pode ser definida como “*um processo de automatização de procedimentos analíticos, no qual a amostra em solução aquosa (e eventualmente os reagentes) é introduzida em um fluxo contínuo e não-segmentado de um fluido transportador*” (Tzanavaras e Themelis, 2007). A zona de amostra sofre dispersão durante o transporte, sendo então misturada com as soluções transportadora e reagente. A zona de amostra resultante é conduzida em direção ao sistema de detecção, gerando um sinal transiente, que é registrado em um sistema de aquisição de dados e usualmente quantificado em relação à altura máxima (Barnett, Lenehan *et al.*, 1999). Durante o transporte, a amostra pode sofrer tratamentos em linha através de colunas contendo reagentes sólidos para separação e pré-concentração, ou conversão a outra espécie mais adequada para a quantificação (Mesquita e Rangel, 2009).

Um sistema de análises em fluxo típico consiste de quatro partes principais (Van Staden e Stefan-Van Staden, 2010):

- sistema de propulsão de fluidos, que pode ocorrer a vazão constante, empregando geralmente uma bomba peristáltica, ou a pressão constante, podendo ser empregados dispositivos de ação gravitacional. Porém, neste caso, o módulo de análise é usualmente limitado à configuração em linha única e a vazão depende da viscosidade das soluções e dimensões do percurso analítico.
- sistema de injeção, que é o dispositivo fundamental do sistema, pois além de introduzir amostras e reagentes, também pode ser empregado para introduzir

Introdução

componentes e redirecionar o fluxo, aumentando a versatilidade do processo. Existem vários tipos de injetores, mas os mais comuns são a válvula de seis vias e o injetor comutador proporcional (Reis, 1996). Este último consiste em três partes de acrílico, sendo duas fixas e uma parte central móvel, que pode ser deslocada em relação às laterais, um passo para frente ou para trás. Por meio deste movimento, o injetor coleta uma alíquota da amostra e a insere no percurso analítico, podendo ser empregado também para inserção de reagentes e outras soluções que porventura sejam necessárias.

- percurso analítico, considerado todo o espaço pelo qual o fluido transportador conduz à zona de amostra desde o injetor até o sistema de detecção. É onde ocorrem as reações químicas necessárias à detecção do analito. Seu dimensionamento deve levar em consideração a cinética da reação química empregada, e consequentemente o tempo de residência da zona de amostra, definido também em função das vazões do transportador e dos reagentes.
- sistema de detecção, podendo ser empregados praticamente todos os detectores usuais em química analítica (Chen e Karube, 1992; Lüdi, Garn *et al.*, 1992; Schmidt, 1993; Hansen, 1994).

1.7 AMPEROMETRIA

A amperometria se constitui em técnica vastamente utilizada em eletroanálise, principalmente em aplicações típicas envolvendo titulações amperométricas, sensores amperométricos e células em fluxo (Adeloju, Shaw *et al.*, 1996). É utilizada com grande vantagem, comparada com a voltametria cíclica para a quantificação de baixas concentrações de analitos pelo fato de se utilizar um valor fixo de potencial, minimizando assim as variações de carga da dupla camada elétrica e em consequência da corrente capacitiva (que virtualmente deve ser igual a zero). Medidas amperométricas são muito úteis para avaliar biossensores e dentre as formas mais utilizadas para tais experimentos é a realização de medidas amperométricas em células convencionais, (sob agitação – Figura 14a) e em fluxo (Figura 14b). Nas medidas utilizando células eletroquímicas convencionais, inicia-se com o biossensor imerso em eletrólito e, sob agitação, são feitas adições do analito. A

Introdução

corrente inicial, medida no eletrólito é muito baixa e resulta apenas de pequenas quantidades de impureza do eletrólito e de eventuais espécies adsorvidas na superfície do eletrodo.

Estudos prévios envolvendo técnicas de varredura de potencial são fundamentais para selecionar o potencial de oxidação (ou redução) adequado à análise (bem como para minimizar o efeito dos interferentes). A cada adição, corresponde um aumento de corrente, que é proporcional ao analito adicionado. O registro resultante indica o tempo de resposta do sensor (indicado pelo tempo necessário para que um novo patamar de corrente seja atingido) e a faixa de resposta que pode ser atingido, até a saturação do mesmo. Medidas envolvendo análise em fluxo geram sinais, que são proporcionais a diversos parâmetros, dentre os quais o volume de amostra injetado, o fluxo da solução e o percurso analítico.

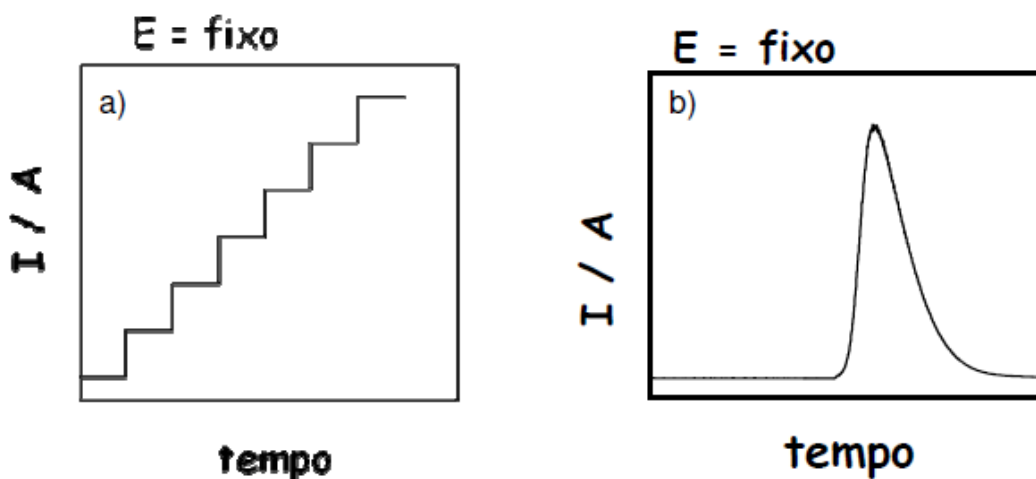


Figura 14: Amperogramas de: a) sistema sobre agitação; b) um sistema em fluxo.

A técnica amperométrica, quando associada a métodos de análise em fluxo, torna-se uma ferramenta interessante para aplicações práticas, em especial quando envolve um significativo número de análises. Uma das limitações desta técnica consiste na sua baixa seletividade. Se a análise é realizada em potenciais elevados (positivos ou negativos), promove-se a oxidação ou a redução de todas as espécies que são eletroativas em potenciais abaixo do valor estabelecido. Portanto, é aconselhável empregar valores mínimos de potencial.

1.7.1 DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA

A detecção amperométrica baseia-se na medida de uma corrente a um potencial (E) fixo aplicado, ou seja, um sensor amperométrico mantido num potencial constante (Dzyadevych, Arkhypova *et al.*, 2008 ; Kappes, Galliker *et al.*, 2001). Esse tipo de detecção é muito utilizado em detectores eletroquímicos em fluxo (Nagels e Staes, 2001). A detecção amperométrica à potencial constante utiliza instrumentação simples e de baixo custo, razão pela qual foi a mais explorada em sistemas de injeção em fluxo e em cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de uma grande variedade de compostos eletroativos (Osborne e Tyson, 1988; Ruzicka e Hansen, 2008).

A limitação associada a esse modo de detecção está na estabilidade do sinal eletroquímico, quando determinados compostos são analisados, comprometendo a repetibilidade da corrente eletroquímica (sinal eletroquímico) e a reprodutibilidade dos resultados da análise. A estabilidade do sinal eletroquímico é governada pela taxa de transferência de carga (elétron) entre o eletrodo e a espécie eletroativa (presente na interface eletrodo-solução) que, por sua vez, depende das condições da superfície do eletrodo. A superfície do eletrodo pode ser modificada durante a análise, dependendo do tipo de composto que está envolvido no processo eletroquímico. Ou seja, quando a espécie eletroativa ou o produto formado na reação de eletrodo ou ambos são adsorvidos na superfície do eletrodo de modo irreversível ou quase-irreversível, ocorre a contaminação ou a passivação do eletrodo. A passivação ou a contaminação da superfície do eletrodo pode afetar a taxa de transferência de carga entre o eletrodo e o analito, como também pode produzir sinais eletroquímicos devido aos produtos adsorvidos, que interferem no sinal desejado. Para muitos casos, a detecção amperométrica em fluxo minimiza o problema da contaminação do eletrodo, pois um volume pequeno de amostra ou de soluções padrão (em geral, 20 a 100 mL) é injetado no sistema. Assim, a extensão do processo é limitada pela quantidade de analito disponível na superfície do eletrodo. Além disso, a passagem contínua de eletrólito suporte sobre o eletrodo (mantido em potencial constante) promove a limpeza do eletrodo, mantendo sua superfície nas mesmas condições por maior período de tempo (Trojanowicz, 2009).

1.7.2 SENSORES ELETROQUÍMICOS

Os sensores amperométricos se baseiam em reações de oxidação e redução, que envolvem um determinado analito para medição de suas concentrações (Harwood e Pouton, 1996). Estas reações geram um fluxo de corrente entre os eletrodos, a qual, dentro de certas condições, é proporcional à concentração do analito que se deseja mensurar. O controle deliberado da reatividade eletrodo/solução é um dos objetivos básicos do eletroquímico, e tais conhecimentos também são muito relevantes nas áreas de eletrocatalise, eletroanálise e corrosão, entre outras. Para propostas analíticas, sensores obtidos a partir de diversos substratos metálicos são aplicados na determinação de várias substâncias de interesse. Os eletrodos baseados em metais nobres, como platina e ouro, têm sido amplamente utilizados na detecção de substâncias orgânicas (Davis, Huw Vaughan *et al.*, 1995). Esses compostos tendem a adsorver-se sobre a superfície dos dispositivos, sofrendo conseqüentes reações anódicas. Esse fenômeno de adsorção pode representar um dos maiores problemas associados ao uso de eletrodos de platina e ouro: o acúmulo do produto de oxidação, que levará à passivação do eletrodo e, conseqüentemente, ao decréscimo na resposta analítica.

Umas das variáveis utilizadas para controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução é o potencial aplicado. No entanto, tal operação permite somente variações modestas, (via de regra imposta pelas características do solvente, do eletrólito suporte ou ainda do eletrodo) e geralmente, apresenta baixa seletividade (Liu, Honma *et al.*, 2005). Desta forma, muitos pesquisadores dedicam-se a estudos envolvendo a modificação deliberada da superfície de eletrodos, como um meio de impor e controlar suas propriedades químicas e físico-químicas do agente modificador para a superfície do substrato, de tal modo que seja possível obter um comportamento previamente planejado do conjunto eletrodo-reagente. A construção de interfaces eletroquímicas com sistemas organizados de forma racional pode levar a obtenção de reatividade e seletividade desejadas para aplicações de interesse como no caso dos biossensores (Garcia, Chen *et al.*, 2010; Védrine, Fabiano *et al.*, 2003).

1.8 BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE FENÓIS

Compostos fenólicos são produtos químicos extensamente usados e liberados no meio ambiente por um grande número de indústrias, incluindo as indústrias de plásticos, resinas, preservação de madeiras, refino de petróleo, tinturas, produtos químicos, têxteis, herbicidas e pesticidas (Dennison e Turner, 1995; Wang, Liu *et al.*, 2009). Fenóis formam uma classe de poluentes químicos facilmente absorvíveis por animais e seres humanos através da pele e membranas mucosas (Bogdanovskaya e Tarasevich, 1996; Guan, Miao *et al.*, 2004). A toxicidade destes compostos é dirigida a uma variedade de órgãos e tecidos, tais como, pulmão, fígado e sistema genito-urinário (Rajesh e Kaneto, 2005). Sua quantificação é de grande relevância devido a sua toxicidade e persistência no meio ambiente.

Alguns métodos usados para determinação de compostos fenólicos são: calorimetria, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar e análise espectrofotométrica (Topçu, Sezgintürk *et al.*, 2004). Entretanto estes métodos envolvem um pré-tratamento complicado da amostra, não são apropriados para monitoramento *in situ* e requerem instrumentação cara (Rajesh e Kaneto, 2005). De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas, os métodos de análise de fenóis totais não determinam os fenóis *para*-substituídos onde a substituição é um radical alquila, arila, nitro, benzoíla ou um grupo aldeído (NBR 10740). Portanto a determinação rápida, seletiva e precisa dos compostos fenólicos é de grande interesse no controle ambiental (Mello e Kubota, 2007).

Biossensores eletroquímicos surgiram como uma alternativa sobre os métodos analíticos convencionais, pois apresentam algumas vantagens como simplicidade no uso, baixo custo de produção, alta seletividade e estabilidade bem como potencial para miniaturização (Dennison e Turner, 1995; Yang, Chen *et al.*, 2006; Yang, Li *et al.*, 2006; Mello e Kubota, 2007).

2. OBJETIVOS

Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver eletrodos de grafite modificados com filmes poliméricos derivados de ácido 2-hidroxifenilacético, visando aplicação destes como transdutor amperométrico de um biossensor a base de *horseradish peroxidase*, para detecção de derivados fenólicos.

Os objetivos específicos consistiram em:

- ✓ Modificar superfícies eletródicas de grafite com filmes poliméricos derivados de ácido 2-hidroxifenilacético;
- ✓ Realizar ensaios de formação de filmes em diferentes velocidades de varredura e diferentes valores de pH da solução monomérica;
- ✓ Caracterização eletroquímica, piezelétrica, espectrofotométrica e morfológica do material polimérico.
- ✓ Realizar ensaios de imobilização de peroxidase nos eletrodos modificados;
- ✓ Verificar as respostas dos eletrodos modificados na presença do alvo de interesse (derivados fenólicos).

3. SEÇÃO EXPERIMENTAL

Seção experimental

3.1 REAGENTES UTILIZADOS

- Ácido 2 hidroxifenilacético, (2-HFA), $C_8H_8O_3$, P.M.= 152,15 g.mol⁻¹.
- Ácido nítrico 65%, Cinética, HNO_3 , d = 1,50, P.M.=63,01g.mol⁻¹.
- Ácido perclórico 70%, Reagen, $HClO_4$, d= 1,66, P.M.=100,46 g.mol⁻¹.
- Adesivo epóxi 24hs, Araldite.
- Albumina soro bovino (ASB), Gold Lab.
- Alumina 0,3 µm Buehler.
- Cloreto de potássio 99,5%, Vetec, KCl , P.M. = 74,55 g.mol⁻¹.
- Ferricianeto de potássio, Reagen, $K_3Fe(CN)_6$, P.M.= 329,25 g.mol⁻¹.
- Ferrocianeto de potássio, Vetec, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, P.M.= 422,39 g.mol⁻¹.
- Fosfato de potássio monobásico anidro 99%, CINÉTICA, KH_2PO_4 P.M.= 136,09 g.mol⁻¹.
- Grafite em bastão, Alfa Aesar, 99.9995%, diâmetro 6mm.
- Hidróxido de sódio 98%, Vetec, $NaOH$, P.M.= 40 g.mol⁻¹..
- Horseradish peroxidase (HRP), SIGMA.
- Guaiacol 99% $C_7H_8O_2$, P.M.= 124,13 g.mol⁻¹.
- Peróxido de hidrogênio 33%, Vetec, H_2O_2 , P.M.=34 g.mol⁻¹.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Toda a vidraria utilizada foi deixada em banho de ácido nítrico concentrado por aproximadamente 24 horas e lavada, com água deionizada.

Água deionizada foi obtida de ultrapurificador microprocessado Master System Gehaka. Medidas de pH foram realizadas utilizando pHmetro Digital PG1800. Foi utilizado ainda um ultrassom Ultrasonic Cleaner 1450 USC para remoção de partículas residuais dos eletrodos.

Para os estudos eletroquímicos (voltametria cíclica e amperometria) e formação de filmes poliméricos, foi utilizada uma cela eletroquímica de três compartimentos (Figura 15 A). Todos os potenciais são referidos a um eletrodo de referência de $Ag/AgCl$ (3 mol.L⁻¹) (Figura 15 B). Como eletrodo auxiliar foi utilizado uma placa de platina de 2cm² de área aparente (Figura 15 C). O eletrodo de trabalho utilizado foi um disco de carbono grafite, com 6 mm de diâmetro, (Figura 15 D). Um sistema montado pode ser visto na figura 15 E.

Seção experimental

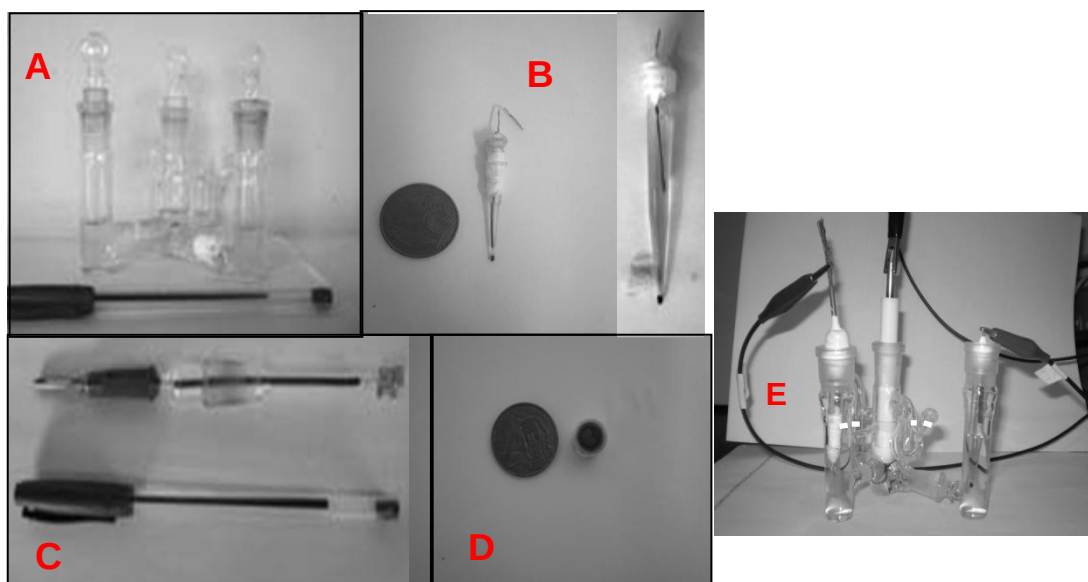


Figura 15: Materiais utilizados nos estudos eletroquímicos. A- célula eletroquímica de três compartimentos; B- eletrodo de referência Ag/AgCl (3 mol.L^{-1}); C- eletrodo auxiliar de platina; D- eletrodo de trabalho de grafite pirolítico; E- célula eletroquímica de três compartimentos contendo os três eletrodos.

Para as medidas eletroquímicas e de piezelétricas foi utilizado um potenciostato CH Instruments modelo 420 A (Figura 16 A). Uma politriz Aropol 2V da Arotec (Figura 16 B) foi utilizada para polimento mecânico dos eletrodos de trabalho.

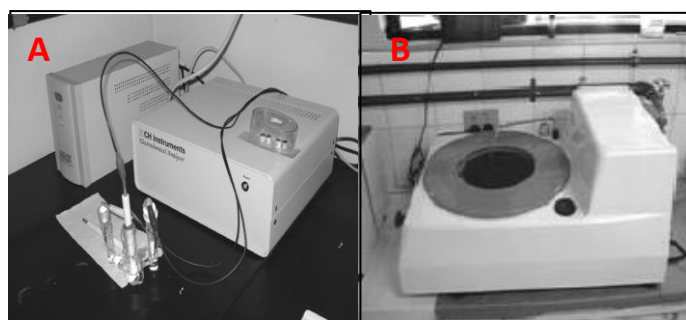


Figura 16: Equipamentos utilizados nos experimentos eletroquímicos e limpeza dos eletrodos. A- potenciostato; B- politriz.

As superfícies modificadas dos eletrodos foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 940A, marca ZEISS (Figura 17 A) e em microscópio de força atômica Nanoscope III da Digital Instruments (Figura 17 B).

Seção experimental

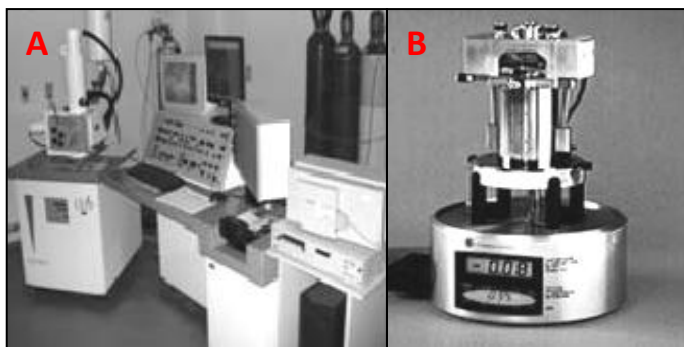


Figura 17: Equipamento utilizado na análise morfológica dos eletrodos modificados; A- microscópio eletrônico de varredura; B- microscópio de força atômica.

A figura 18 mostra o sistema em fluxo utilizado neste trabalho. Tubos de polietileno (0,8 mm de diâmetro) foram usados para alças de injeção e linhas de transmissão.

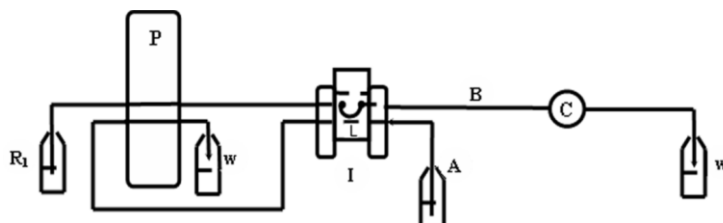


Figura 18: Diagrama esquemático do sistema em fluxo utilizado neste trabalho. R₁, solução transportadora (tampão fosfato de potássio 0,1mol.L⁻¹, pH 6,5; P, bomba peristáltica; W, resíduo; L, alças injetora; I, válvula injetora; A, soluções guaiacol e peróxido de hidrogênio preparados em solução transportadora; B, linha transportadora; C, detector amperométrico.

As soluções foram bombeadas usando uma Bomba peristáltica Minipuls 3 da Gilson e tubos de Tygon® (figura 19 A) para bombeamento e as injeções de amostras foram feitas utilizando um injetor comutador circular (figura 19 B).

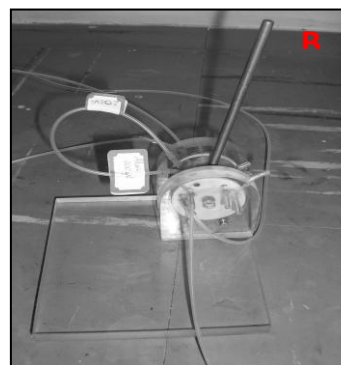
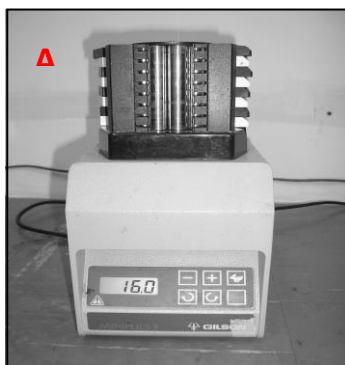


Figura 19: Equipamentos do sistema em fluxo: A- Bomba peristáltica; B- Injetor comutador de geometria circular.

Seção experimental

O sistema de detecção proposto, ilustrado na figura 20, é uma célula eletroquímica, onde o eletrodo de referência é Ag/AgCl, o eletrodo de trabalho é um disco de grafite de 6 mm de diâmetro e o eletrodo auxiliar é um fio de platina. O compartimento interno da célula possui capacidade para 460 μ L de solução.

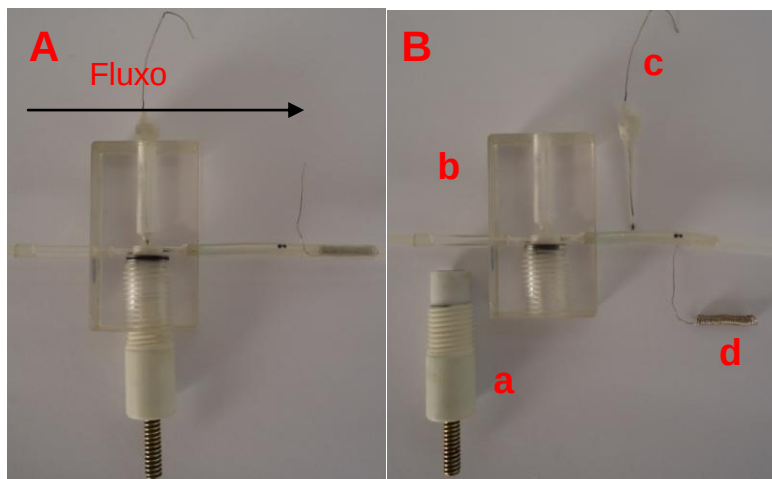


Figura 20: Célula eletroquímica usada como sistema de detecção amperométrica. A- célula montada; B- **a**-suporte de teflon, pino de contato e eletrodo de grafite; **b**- peça de acrílico; **c**- eletrodo de referência Ag/AgCl; **d**- contra-eletrodo de platina.

Para os estudos com a Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ), o sistema foi conectado a uma célula eletroquímica de teflon com capacidade de 4ml de solução (figura 21A, 21B). Os eletrodos auxiliar e referência foram conectados ao potenciostato e os dois contatos elétricos do eletrodo de trabalho conectados a um freqüencímetro. O eletrodo de trabalho foi um cristal de quartzo de 13,7 mm de diâmetro (corte AT), com o recobrimento, em ambas as superfícies, com uma película de ouro com 5,11 mm de diâmetro (figura 21 C). Um fio de platina de 1cm de comprimento foi usado como eletrodo auxiliar e um eletrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl 3 mol.L⁻¹) como eletrodo de referência.

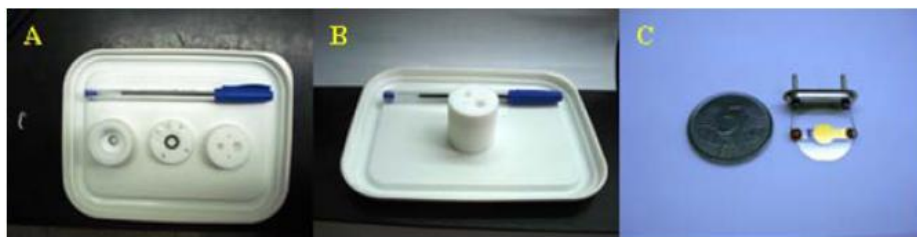


Figura 21: sistema utilizado para a microbalança eletroquímica de cristal de quartzo. A- célula eletroquímica de teflon desmontada; B- célula eletroquímica de teflon montada; C-eletrodo de cristal de quartzo.

Seção experimental

3.3 SOLUÇÕES

Foram preparadas soluções imediatamente antes de cada procedimento e deaerados com N_2 por cerca de 40 minutos. Quantidades adequadas de reagentes com grau analítico, utilizados como recebidos, foram solubilizados em água ultra pura ($0,05\mu S$).

Solução de Fe^{2+}/Fe^{3+}

Soluções padrão contendo o par redox Fe^{2+}/Fe^{3+} foram preparadas utilizando-se $K_4Fe(CN)_6$ (5 mmol L^{-1}) / $K_3Fe(CN)_6$ (5 mmol L^{-1}) em $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 .

Solução de ácido perclórico

A solução de ácido perclórico usada nos testes de limpeza do eletrodo e como eletrólito suporte da solução monomérica foi preparada pipetando-se 43,2 mL de ácido perclórico concentrado e transferiu para um balão de 1000mL sendo completado com água deionizada. Concentração final de $0,5\text{ mol.L}^{-1}$.

Solução de ácido 2-hidroxifenilacético (2-HFA)

A solução monomérica de concentração $1,5 \times 10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em ácido perclórico $0,5\text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte.

Solução tampão fosfato de potássio

Uma solução estoque de tampão fosfato ($0,1\text{ mol L}^{-1}$) foi preparada pesando-se 13,6 g de K_2HPO_4 e transferido para um balão de 1000 mL que foi completado com água deionizada e teve seu pH ajustado para 6,5 usando uma solução saturada de hidróxido de sódio. Esta solução foi usada no preparo das soluções de trabalho de guaiacol e peróxido de hidrogênio.

Solução de albumina de soro bovino a 0,5% m/v (ASB)

Esta solução foi preparada em tampão fosfato ($0,1\text{ mol L}^{-1}$; pH de 6,5) pesando-se 0,03 g de albumina de soro bovino que foi transferida para um balão de 10 mL. Desta solução estoque de 3% foi pipetado $2\mu L$ e transferido para $10\mu L$ da solução enzimática de forma que a concentração final fosse de 0,5% de ASB.

Seção experimental

Solução de Horseradish Peroxidase (HRP)

A solução foi preparada a partir da dissolução de 0,001g de HRP liofilizada (124 U.mg^{-1}) em 124 μL de tampão fosfato de potássio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH de 6,5). A atividade enzimática teórica final foi de $1 \text{ U. } \mu\text{L}^{-1}$. Para incorporação nos eletrodos a cada 10 μL de solução enzimática foram adicionados 2 μL Albumina soro bovino (BSA) 3% de forma final tivesse 10 U de HRP e 0,5% de BSA.

Solução de guaiacol e peróxido de hidrogênio

Preparou-se a solução de guaiacol $45,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ em tampão fosfato de potássio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH de 6,5) e a esta solução foi adicionado peróxido de hidrogênio 165 mmol.L^{-1} , as soluções eram preparadas imediatamente antes do uso. Para os ensaios de curva de calibração a concentração de guaiacol foi alterada de 0; 0,5; 2,3; 11,5; 22,9; 45,8; 91,6; 114,5 a $183,2 \text{ mmol.L}^{-1}$, mantendo a concentração de peróxido constante (165 mmol.L^{-1}), e posteriormente variou-se a concentração de peróxido de 1,3; 2,3; 4,6; 9,5; 19,5; 39,7; 80,5; 161,3; 327,7 a $665,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ na ausência de guaiacol.

3.4 PREPARAÇÃO DE ELETRODOS

ELETRODO DE REFERÊNCIA

O eletrodo de Ag/AgCl foi obtido por eletrodeposição de AgCl na superfície de um fio de Ag como anodo, e como cátodo foi utilizado uma placa de platina de 2 cm^2 de área aparente, e solução de cloreto de potássio $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$. A eletrodeposição de AgCl no anodo foi realizada sob potencial constante de 1,4 volts, durante três minutos, utilizando um Potenciostato-Galvanostato Autolab 302N. Terminada a eletrodeposição, o fio de prata foi colocado no interior de uma ponteira com extremidade inferior devidamente vedada, e preenchida com uma solução de cloreto de potássio $3,00 \text{ mol L}^{-1}$ (Pedrotti, Angnes *et al.*, 1996).

ELETRODO DE TRABALHO

O eletrodo de trabalho (carbono grafite) foi polido mecanicamente em feltro umedecido com uma suspensão de alumina $0,30 \mu\text{m}$ e água deionizada

Seção experimental

em politriz e manualmente. Após esse tratamento, os eletrodos foram levados a um ultrassom para remoção de partículas residuais de alumina.

Os eletrodos polidos foram transferidos para a célula eletroquímica, contendo a solução com o par redox $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$. Com objetivo de manter sempre o mesmo “padrão de superfície” para os eletrodos utilizados, foram feitos voltamogramas cíclicos variando-se o potencial entre -0,10 V a +0,50 V a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Foram feitos testes também em solução de ácido perclórico numa faixa de -0,7 a 1,2 V. Após esse processo, os eletrodos pré-selecionados foram lavados, secos e transferidos para uma célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte, na ausência do monômero.

3.5 FORMAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS

Os eletrodos previamente selecionados e limpos foram transferidos para a célula eletroquímica contendo aproximadamente 25 mL da solução do monômero 2-HFA. Foram realizados 100 ciclos de potencial a uma velocidade de 50mV.s^{-1} , variando-se o potencial limite entre -0,70 a +1,2 V, vs. Ag/AgCl, a temperatura ambiente ($25\pm 1^\circ\text{C}$). Os eletrodos modificados após eletropolimerização, foram lavados com água deionizada para remoção do excesso de monômero não polimerizado.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS COM POLI(2-HFA)

3.6.1 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

► Os eletrodos modificados com poli(2-HFA) foram caracterizados por voltametria cíclica em função da velocidade de varredura de 20 a 1000 mV.s^{-1} . Experimento realizado em solução de ácido perclórico $0,5\text{ mol.L}^{-1}$ na ausência de monômero.

► Os eletrodos modificados com poli(2-HFA) foram colocados na presença de par redox com carga negativa ($K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$) e avaliados na faixa de potencial de -0,1 a 0,5V, e posteriormente foram colocados na presença de par redox com carga positiva ($Ru(NH_3)_6Cl_2$) na faixa de potencial de -0,5 a 0,2V, ambos experimentos realizados a uma velocidade de varredura de 100mV.s^{-1} .

Seção experimental

► Para medidas de estabilidade eletroquímica foram feitas sucessivas varreduras de potencial (0 a 0,9V) em solução de ácido perclórico, usando o eletrodo modificado com poli(2-HFA). Foram feitos 100 varreduras de potencial a uma velocidade de 50mV.s^{-1} .

3.6.2 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA *

► Foi feito um estudo de caracterização espectroscópica usando um espectrofotômetro UV-Vis da Shimadzu modelo UV-1650PC e cubeta de quartzo com caminho ótico de 1cm. Soluções monoméricas com diferentes valores de pH foram colocadas em uma cubeta de 700 μL de capacidade e foi feito uma varredura de comprimento de onda de 190 a 1100 nm.

► Espectros de infravermelho (FTIR) foram obtidos para o monômero e para o polímero em um intervalo de 500 a 4500 cm^{-1} , usando 20 ciclos e resolução de 2 ou 4 cm^{-1} .

► Foram feitas análises de fluorescência para o monômero e para o polímero em meio de acetonitrila.

3.6.3 CARACTERIZAÇÃO PIEZELÉTRICA *

A caracterização piezométrica foi feita utilizando um potenciostato da CH Instruments modelo 420A. O eletrodo de trabalho foi limpo eletroquimicamente em solução de ácido sulfúrico $0,25\text{ mol.L}^{-1}$ utilizando uma faixa de varredura de -0,25 a 1,25V e variando a velocidade de varredura entre 100 e 500 mV.s^{-1} . As medidas eletroquímicas da microbalança foram feitas simultaneamente a voltametria cíclica, 10 varreduras sucessivas de potencial.

3.6.4 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA *

A estabilidade térmica foi feita por meio de análise termogravimétrica (TG), feita em atmosfera de nitrogênio com taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ de 25 a 600°C num equipamento da TA Instruments SDT.

3.6.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

► Foram feitas análises morfológicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de eletrodos modificados com filmes poliméricos feitos em diferentes velocidades de varredura.

Seção experimental

► Foram feitas análises morfológicas de microscopia de força atômica (AFM) de eletrodos modificados com filme polimérico em diferentes velocidades de varredura.

* Para as caracterizações espectroscópicas, piezelétrica e térmica o polímero foi preparado em uma barra de grafite de tamanho maior (com área geométrica de 6,21 cm²) e extraído em acetonitrila num banho de ultrasson por 1 hora.

3.7 CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O estudo da cinética enzimática para o cálculo da atividade enzimática na solução estoque de HRP, foi realizado utilizando-se um espectro UV-Vis, onde se colocou em uma cubeta 2975 µL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 6,5 com 15,3 µL de peróxido de hidrogênio (32%), 10,0 µL de guaicol (45,8 mmol L⁻¹) e 1,0 µL de solução estoque de enzima. No momento da adição da solução estoque da enzima o espectrofotômetro foi acionado no modo cinético, monitorando a absorbância a 470nm. O ensaio foi realizado em triplicata e a atividade enzimática foi determinada de acordo com a equação:

$$U = \frac{A}{\varepsilon} \times \frac{1}{V_e} \times FD \times \frac{1}{t}$$

Onde A corresponde a absorbância a 470nm; ε o coeficiente de absorvidade molar do guaiacol (26,6 mmol⁻¹cm⁻¹) (Maioli, Santos *et al.*, 2008); V_e é o volume de solução enzimática (mL); t é o tempo de reação em min e FD o fator de diluição da solução enzimática.

3.8 PREPARAÇÃO DOS BIOSSENSORES

A construção do biossensor amperométrico foi feita a partir de eletrodo modificado com poli(2-HFA). A superfície do eletrodo foi preparada para imobilização da enzima HRP, realizando varreduras de potencial na faixa de 0,3 a -0,4V. Após as varreduras em potencial catódico, foi gotejada na superfície do eletrodo 12 µL da solução enzimática contendo 0,5% de BSA, e o eletrodo foi deixado em repouso até a secagem completa da superfície. O experimento foi conduzido a temperatura ambiente (25°C ± 1°C). A atividade enzimática utilizada foi de 10u.

Seção experimental

3.8.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO

► Os testes iniciais dos biossensores foram feitos usando voltametria linear como técnica eletroquímica de detecção. Os ensaios foram conduzidos na faixa de 0,4 a -0,6V numa velocidade de 50mV.s⁻¹.

► Os demais testes foram feitos por análise de injeção em fluxo (FIA). Usando um sistema como o descrito nas figuras 18 a 20, usando uma alça de 200 µL de volume. E curva amperométrica *i* vs *t* como técnica de detecção.

3.8.1.1 RESPOSTA DO BIOSSENSOR EM FUNÇÃO DA VAZÃO DO FLUXO

Os valores de vazão da solução transportadora avaliados foram: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mL.min⁻¹. Usando eletrodo contendo 10 U de HRP imobilizados, solução de guaiacol 45,8 mmol.L⁻¹ em tampão fosfato de potássio (0,1mol L⁻¹; pH de 6,5) e a esta solução foi adicionado peróxido de hidrogênio 165 mmol.L⁻¹, potencial de 0 V.

3.8.1.2 RESPOSTA DO BIOSSENSOR EM FUNÇÃO DO POTENCIAL APLICADO

Para avaliação da resposta do biossensor, foram testados diferentes potenciais de análise (0,1; 0,2; 0; -0,1; -0,2; -0,3 V). Usando eletrodo contendo 10 U de HRP imobilizados, solução de guaiacol 45,8 mmol.L⁻¹ em tampão fosfato de potássio (0,1mol L⁻¹; pH de 6,5) e a esta solução foi adicionado peróxido de hidrogênio 165 mmol.L⁻¹, vazão de 2 mL.mim⁻¹.

3.8.1.3 RESPOSTA DO BIOSSENSOR EM FUNÇÃO DO pH DA SOLUÇÃO TRANSPORTADORA

O biossensor amperométrico foi avaliado em função do pH do meio reacional. Foram preparadas soluções de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹) em pH variando de 4,0 a 8,0. O pH da solução do analito foi ajustado de acordo com o pH da solução transportadora. Usando eletrodo contendo 10 U de HRP imobilizados, solução de guaiacol 45,8 mmol.L⁻¹ em tampão fosfato de potássio (0,1mol L⁻¹; pH de 6,5) e a esta solução foi adicionado peróxido de hidrogênio 165 mmol.L⁻¹, vazão de 2 mL.mim⁻¹ e potencial de análise de 0 V.

Seção experimental

3.8.1.4 RESPOSTA DO BIOCSENSOR EM FUNÇÃO DA SUPERFÍCIE ELETRODICA

Foram feitos ensaios usando eletrodo modificado com poli(2-HFA) e sem modificação. Os eletrodos modificados foram pré-condicionados em solução de tampão fosfato pH6,5 aplicando potencial catódico (0,3 a -0,4V) e em outro eletrodo aplicando-se potencial anódico (0 a 1,2V). Usando eletrodo contendo 10 U de HRP imobilizados, solução de guaiacol 45,8 mmol.L⁻¹ em tampão fosfato de potássio (0,1mol L⁻¹; pH de 6,5) e a esta solução foi adicionado peróxido de hidrogênio 165 mmol.L⁻¹, vazão de 2 mL.mim⁻¹ e potencial de análise de 0 V.

3.8.1.5 RESPOSTA DO BIOCSENSOR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GUAIACOL

Foram feitos diversos testes usando eletrodo contendo 10 U de HRP imobilizados, solução de guaiacol com diferentes concentrações (0; 0,5; 2,3; 11,5; 22,9; 45,8; 91,6; 114,5 a 183,2 mmol.L⁻¹) em tampão fosfato de potássio (0,1mol L⁻¹; pH de 6,5) e a esta solução foi adicionado peróxido de hidrogênio 165 mmol.L⁻¹, vazão de 2 mL.mim⁻¹ e potencial de análise de 0 V.

3.8.1.6 UTILIZAÇÃO DO BIOCSENSOR PARA DETECÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Foram feitos testes mudando o analito de interesse do biossensor. Os ensaios realizados até então partia de um derivado fenólico (guaiacol) como analito de interesse, então foi feito um teste usando o biossensor para detecção e quantificação de peróxido de hidrogênio. Para isso a solução do analito foi feita somente com peróxido de hidrogênio em diversas concentrações (1,3; 2,3; 4,6; 9,5; 19,5; 39,7; 80,5; 161,3; 327,7 a 665,1 mmol.L⁻¹), livre de qualquer derivado fenólico solução feita em tampão fosfato de potássio (0,1mol L⁻¹; pH de 6,5), vazão de 2 mL.mim⁻¹ e potencial de análise de 0 V.

Seção experimental

3.8.1.7 RESPOSTA DO BIOSSENSOR EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO

O tempo de vida do biossensor foi avaliado para uma atividade enzimática de 10U, durante um período de quarenta e cinco dias. Neste período, utilizando o sistema em fluxo descrito, foram injetados em triplicata solução de guaiacol contendo peróxido de hidrogênio, e a resposta de corrente foi observada. Entre uma avaliação e outra, o eletrodo foi armazenado, no escuro, em solução tampão pH 6,5, no freezer até a próxima avaliação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FORMAÇÃO DE FILME POLIMÉRICO

Os voltamogramas cíclicos (figura 22) mostram informações sobre o processo de eletropolimerização do filme polimérico derivado do ácido 2-hidroxifenilacético (2-HFA). Em meio de ácido perclórico 0,5 mol.L⁻¹ a primeira varredura de potencial feita a 50 mV.s⁻¹ e num intervalo de -0,70 e 1,20 V, apresenta um pico de oxidação irreversível ($E_{p,a} = +1,06V$) atribuído a oxidação do monômero. Repetidas varreduras de potencial mostraram o aparecimento, e contínuo crescimento, de um par redox em +0,58 e +0,69 V, atribuídas à formação do filme polimérico.

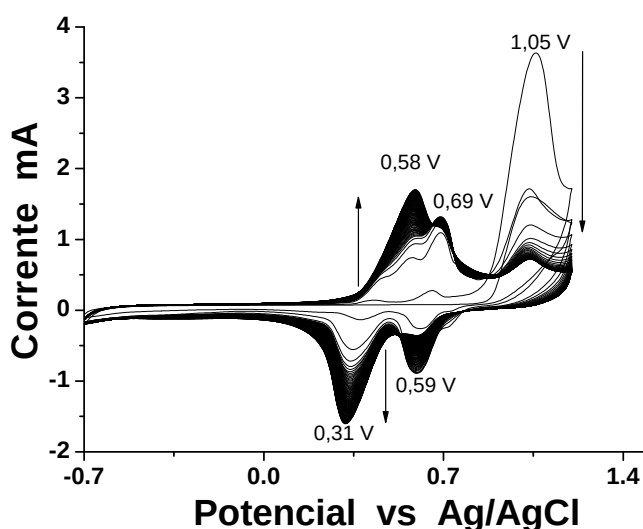


Figura 22: Voltamogramas cíclicos de formação do filme polimérico derivado de 2-HFA. 100 varreduras feitas a uma velocidade de 50 mV.s⁻¹ e num intervalo de -0,70 a 1,20 V.

O comportamento eletroquímico do eletrodo modificado foi analisado em solução de ácido perclórico 0,5 mol.L⁻¹ sem a presença de monômero (figura 23). Para o eletrodo modificado com poli(2-HFA) (figura 23A) são observadas duas ondas de oxidação (0,56 e 0,67 V) e duas de redução (0,29 e 0,58 V) atribuídas a modificação da superfície de grafite com filme polimérico derivado de 2-HFA. Análises feitas em solução contendo o par redox K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ (figura 23B) mostra um aumento no ΔE , atribuído ao aumento de resistência a transferência de carga, devido a presença de um material polimérico na superfície do eletrodo.

Resultados e discussão

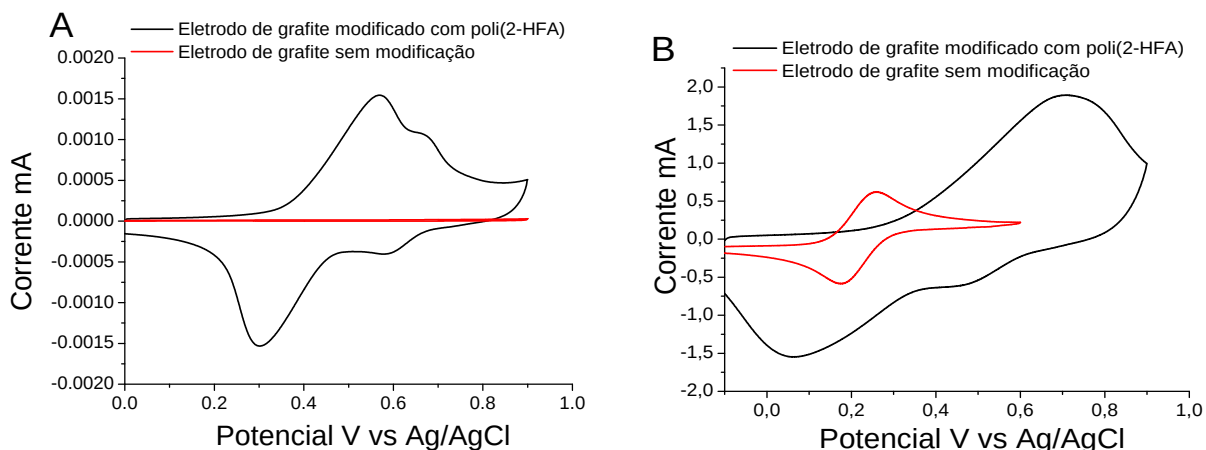


Figura 23: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite sem modificação (vermelho) e modificados com poli(2-HFA) (preto). (A) solução de ácido perclórico 0,50 mol.L⁻¹. (B) solução de K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ 5mmol.L⁻¹ e KCl 0,1 mol.L⁻¹ como eletrólito suporte. 100 mV.s⁻¹.

4.1.1 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DE POLI(2-HFA)

4.1.1.1 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO FILME POLIMÉRICO EM FUNÇÃO DE TROCA IÔNICA

Ensaio eletroquímico foram realizados a fim de avaliar as propriedades de troca iônica do material polimérico eletrogerado.

Os eletrodos limpos foram testados em solução de KCl 0,1 mol.L⁻¹ contendo 5mmol.L⁻¹ do par redox Fe²⁺/Fe³⁺, e após a modificação com poli(2-HFA). O eletrodo foi novamente submetido a varreduras de potencial na solução citada anteriormente, a fim de estudar o comportamento eletroquímico do polímero frente ao par redox Fe²⁺/Fe³⁺.

Analisando a figura 24 B pode-se observar que o eletrodo modificado com poli(2-HFA) aumenta a resposta de corrente e desloca substancialmente o potencial quando comparada as respostas dos eletrodos de grafite sem modificação e modificados com polímero. Após sucessivas varreduras de potencial nesta solução, observa-se uma diminuição da resposta de corrente, fato atribuído a repulsão dos íons negativos (ferrocianeto e ferricianeto) pelo filme polimérico que apresenta caráter aniônico, bem como a expulsão dos contra-íons da malha polimérica.

Resultados e discussão

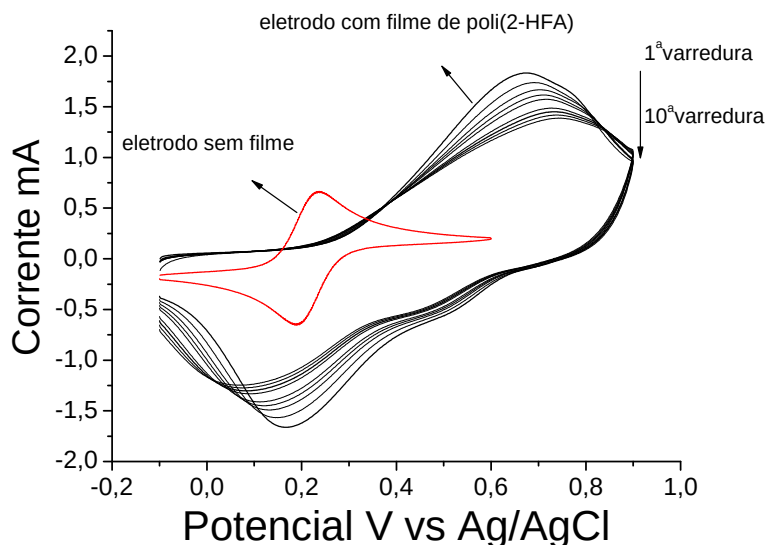


Figura 24: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite sem modificação (vermelho) e após a modificação com poli(2-HFA) (preto), feitos em solução de KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo 5 mmol.L^{-1} de ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio. Voltamogramas obtidos a 100 mV.s^{-1} .

A figura 25 A representa os voltamogramas de eletrodos modificados com poli(2HFA) obtidos em solução contendo KCl e ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio (curva preta) e em solução contendo somente KCl (curva azul). A subtração da curva preta menos a curva azul foi feita com a finalidade de analisar a interação do poli(2HFA) somente com o par redox ferrocianeto e ferricianeto.

A figura 25 B mostra o perfil da resposta dos eletrodos frente à interação somente com íons ferrocianeto e ferricianeto. Nesta figura os resultados obtidos em solução de KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo 5 mmol.L^{-1} de ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio foram subtraídos dos voltamogramas obtidos em solução contendo somente KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

Resultados e discussão

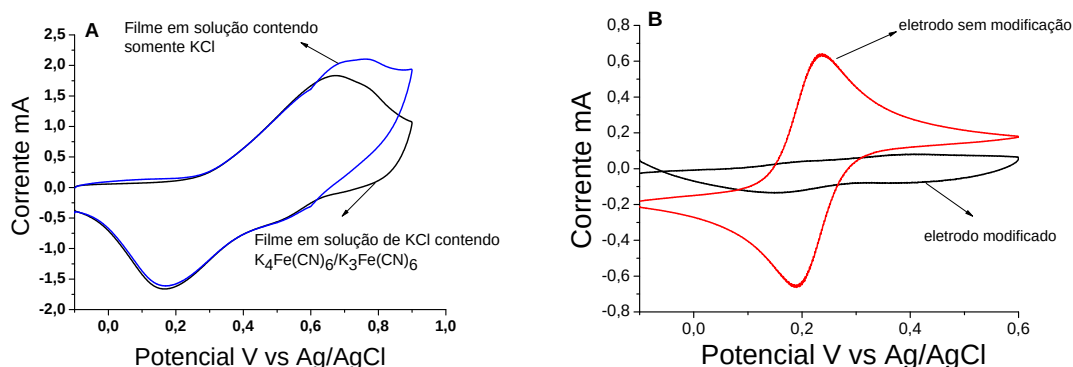


Figura 25: Voltamogramas cíclicos: A- eletrodo modificado com poli(2HFA) em solução contendo KCl e par redox ferro/ferricianeto de potássio (curva preta) e respostas obtidas em solução contendo somente KCl (curva azul); B- subtração das respostas da figura 25 A (preto) e eletrodo de grafite sem modificação (vermelho).

É possível observar que o eletrodo de grafite sem modificação interage muito bem com os íons ferrocianeto e ferricianeto, o que já não ocorre de forma semelhante com o eletrodo modificado com poli(2-HFA) confirmando assim a teoria que o filme apresenta caráter aniônico e não interage com cargas negativas.

Foi feito um estudo em solução de KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo 5 mmol.L^{-1} de cloreto de hexaminrutênio (figura 26). Há um aumento de corrente quando comparamos o eletrodo de grafite sem modificação e o eletrodo modificado com poli(2-HFA) e com sucessivas varreduras a resposta de corrente continua aumentando, este aumento é atribuído à interação do filme de caráter aniônico com os íons positivos de hexaminrutênio.

Resultados e discussão

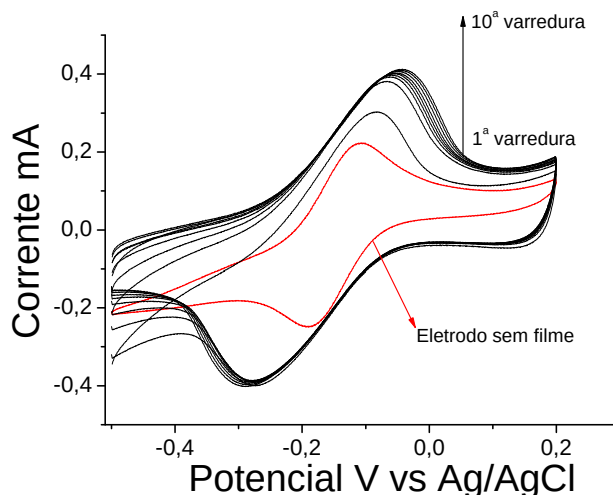


Figura 26: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite sem modificação (vermelho) e após a modificação com poli(2-HFA) (preto), feitos em solução de KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo 5 mmol.L^{-1} de cloreto de hexaminrutênio. Voltamogramas obtidos a 100 mV.s^{-1} .

Os eletrodos sem modificação e contendo poli(2-HFA) foram colocados em uma célula eletroquímica contendo solução de KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ na ausência de cloreto de hexaminrutênio. Este estudo foi feito com a finalidade de fazer uma linha base das respostas dos diferentes eletrodos e posteriormente usá-las para descontar da resposta obtida na figura 26.

A figura 27 A representa os voltamogramas de eletrodos modificados com poli(2HFA) obtidos em solução contendo KCl e cloreto de hexaminrutênio (curva preta) e em solução contendo somente KCl (curva azul). A subtração da curva preta menos a curva azul foi feita com a finalidade de analisar a interação do poli(2HFA) somente com cátions hexaminrutênio.

A figura 27 B mostra o perfil da resposta dos eletrodos frente à interação somente com íons hexaminrutênio. Nesta figura os resultados obtidos em solução de KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo 5 mmol.L^{-1} cloreto de hexaminrutênio foram subtraídos dos voltamogramas obtidos em solução contendo somente KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

Resultados e discussão

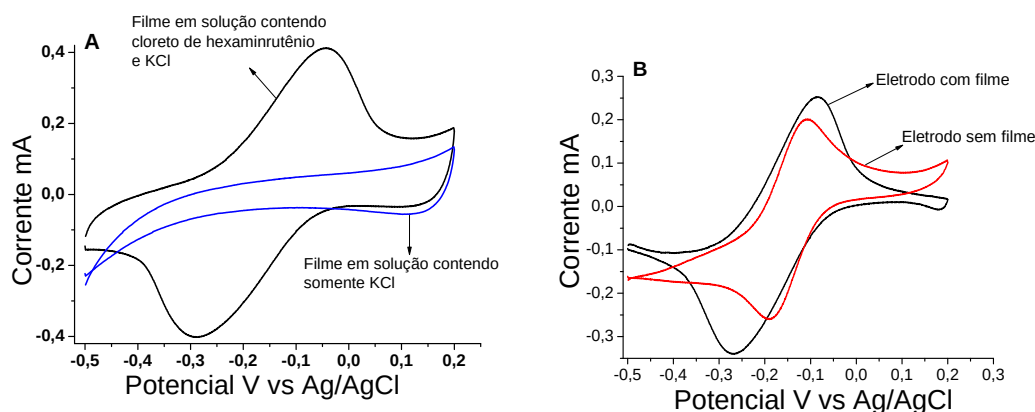


Figura 27: Voltamogramas cíclicos: A- eletrodo modificado com poli(2HFA) em solução contendo KCl e cloreto de hexaminrutênio (curva preta) e respostas obtidas em solução contendo somente KCl (curva azul); B- subtração das curvas da figura 27 A (preto) e eletrodo de grafite sem modificação (vermelho).

É possível observar que o eletrodo de grafite sem modificação interage muito bem com o complexo de rutênio, resultado observado também para o eletrodo modificado com poli(2-HFA). Observando os resultados obtidos frente a interação do polímero com o complexo de hexaminrutênio os resultados da figura 25 B pode-se dizer que o poli(2HFA) apresenta caráter aniônico o qual interage bem com complexos catiônicos e não interage com complexos aniônicos.

4.1.1.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO FILME POLIMÉRICO EM FUNÇÃO DO TRANSPORTE DE MASSA

Estes ensaios foram realizados com a finalidade de testar o tipo de transporte de massa ao longo da malha polimérica.

O eletrodo modificado com poli(2-HFA) foi colocado em solução contendo ácido perclórico $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e foram feitas sucessivas varreduras de potencial variando a velocidade de varredura.

A figura 28 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura e a partir desta figura os resultados de corrente de pico de oxidação e redução bem como o potencial de oxidação e de redução foram tabelados versus a velocidade de varredura (tabela 4).

Resultados e discussão

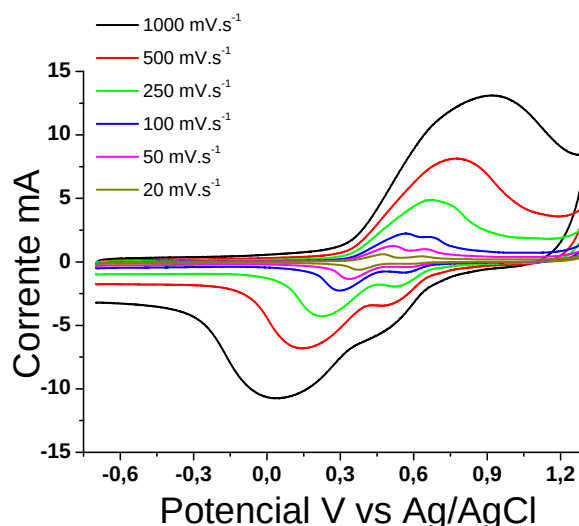


Figura 28: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite modificados com poli(2-HFA) obtidos em solução de HClO_4 $0,5\text{mol.L}^{-1}$, feitos em diferentes velocidades de varredura.

Com base nos dados apresentados na figura 28 podemos observar que em velocidades de varredura menores que 250mV.s^{-1} é possível diferenciar duas ondas de oxidação atribuídas ao polímero, resultados que não são possíveis de observar em altas velocidades de varredura provavelmente pela cinética da reação.

Na tabela 4 a partir da velocidade de 100 mV.s^{-1} as colunas são divididas em duas para apresentar separadamente os valores de corrente de pico e potencial de pico das duas ondas observadas.

Tabela 4: Valores de corrente de pico de oxidação e de redução bem como potencial de oxidação e de redução versus a velocidade de varredura.

Velocidade de varredura (V.s^{-1})	I_{oxi} (mA)		I_{red} (mA)		E_{oxi} (V)		E_{red} (V)	
1	13		-10	-5,59	0,91		0,036	0,47
0,5	8,13		-6,79	-3,4	0,77		0,22	0,50
0,25	4,85		-4,27	-1,8	0,67		0,14	0,53
0,1	2,22	1,97	-2,25	-0,83	0,56	0,66	0,29	0,56
0,05	1,26	1,00	-1,33	-0,42	0,51	0,64	0,33	0,57
0,02	0,59	0,44	-0,62	-0,15	0,47	0,63	0,37	0,58

Resultados e discussão

A partir da tabela 4 a figura 29 foi montada. Na figura 29 A foram usados os maiores valores de corrente de oxidação e de redução que estão representados na tabela em negrito, para a construção da figura 29 B foram usados os outros valores de corrente de pico de oxidação e de redução da tabela. Nesta figura é possível observar que a corrente de pico de oxidação e também a corrente de pico de redução responde linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura. O resultado que permite dizer que o transporte de massa no interior do filme polimérico pode ser regido por difusão.

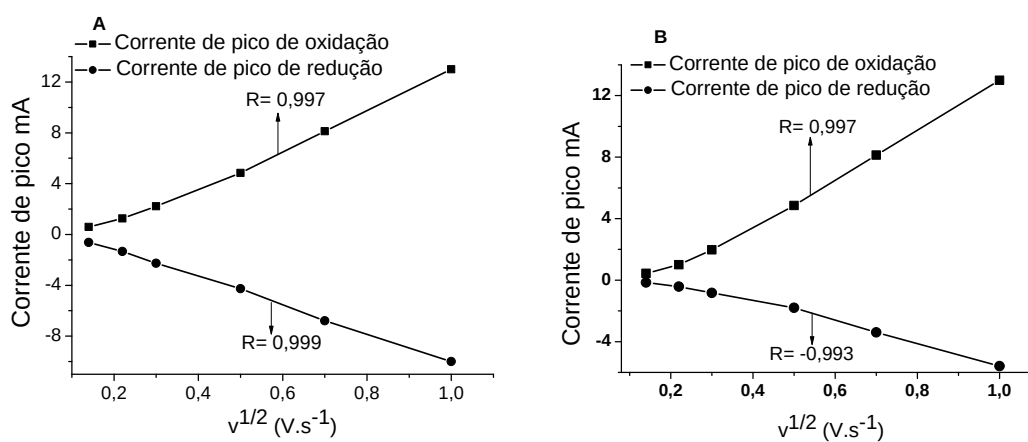


Figura 29: Valores de corrente de pico de oxidação e valores de corrente de pico de redução versus raiz quadrada da velocidade de varredura. A - Maiores valores de corrente de oxidação e redução da tabela 4; B - Menores valores de corrente de oxidação e redução da tabela 4.

Experimentos de degradação eletroquímica do poli(2-HFA) sobre eletrodos de grafite foram feitos por sucessivas varreduras de potencial em solução de ácido perclórico 0.50 mol L^{-1} entre 0,00 e +0,85 V (figura 30) a uma velocidade de 50 mV.s^{-1} . As áreas de pico anódico e catódico foram usadas para cálculo de carga. Este estudo mostrou que após 100 varreduras de potencial, o filme manteve 72,3% de resposta de carga anódica e 88% de resposta de carga catódica, após estes estudos pode-se afirmar que polímero apresenta uma boa estabilidade eletroquímica.

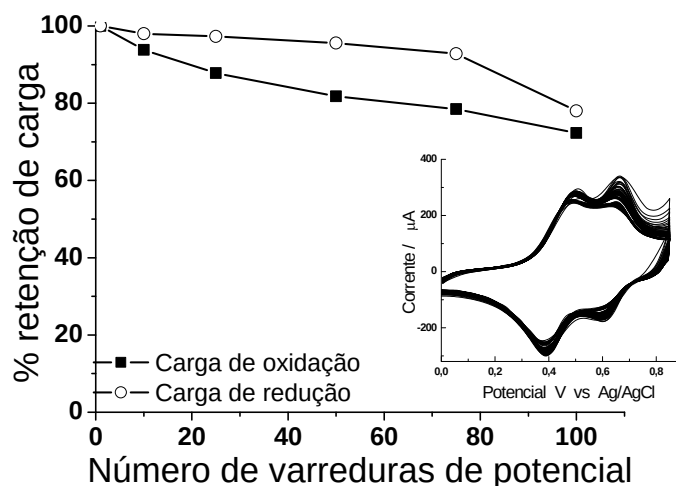


Figura 30: Porcentagem de retenção de carga ao longo de 100 varreduras de potencial. Inserto: Voltamogramas cíclicos feitos em solução de ácido perclórico 0.50 molL^{-1} na ausência de monômero. Faixa de varredura 0,00 e +0,85 V e velocidade de 50 mV.s^{-1} .

4.1.1.3 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO FILME POLIMÉRICO EM FUNÇÃO DA VELOCIDADE DE VARREDURA DE FORMAÇÃO DO FILME

Foram feitos filmes derivados de 2-HFA em diferentes velocidades de varredura, com o interesse de estudar o comportamento do material polimérico. Na primeira varredura de potencial, em todas as velocidades de varredura estudadas, observou-se uma onda irreversível em de +1,06 V, atribuída à oxidação do monômero. Para o filme formado a 20 mV.s^{-1} (figura 32A) a partir da segunda varredura, foram observadas duas ondas de oxidação em +0,51V e + 0,66V, e duas ondas de redução em +0.62 V e +0.39 V, atribuídas ao polímero. Estudos feitos a 250 (figura 32B) e 500 mV.s^{-1} (figura 32C) as ondas de oxidação observadas a partir da segunda varredura se sobrepõem não sendo possível a separação dos potenciais de oxidação, mas as duas ondas de redução observadas são bem definidas em qualquer velocidade de varredura estudada. Com o aumento do número de varreduras de potencial, ocorreu aumento dos picos de oxi-redução.

Resultados e discussão

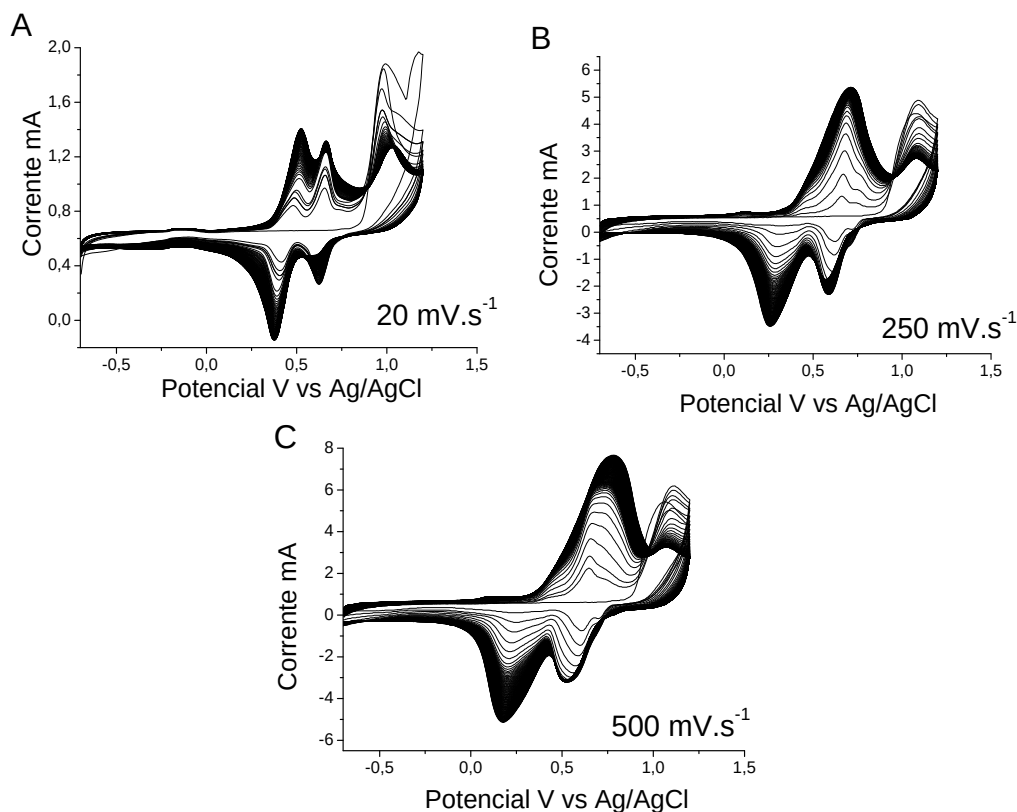


Figura 31: Voltamogramas cíclicos de formação de poli(2-HFA) feitos em solução de ácido perclórico 0.50 mol L⁻¹, em diferentes velocidades de varredura. (A) 20 mV.s⁻¹. (B) 250 mV.s⁻¹. (C) 500 mV.s⁻¹. 100 ciclos.

O comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados foi analisado em solução de ácido perclórico, em ausência do monômero (figura 32 A). Observou-se aumento na resposta de corrente, bem como aumento de área relativa aos picos de oxi-redução, sugerindo formação de um filme polimérico com maior área superficial para o eletrodo modificado com 2-HFA formado a 20 mV.s⁻¹, se comparado aos filmes gerados em outras velocidades de varredura. Análise feita em solução contendo ferrocianeto/ferricianeto de potássio (figura 32 B) revela aumento de ΔE , atribuído ao aumento da resistência de transferência de carga devida à presença do material polimérico na superfície do eletrodo.

Resultados e discussão

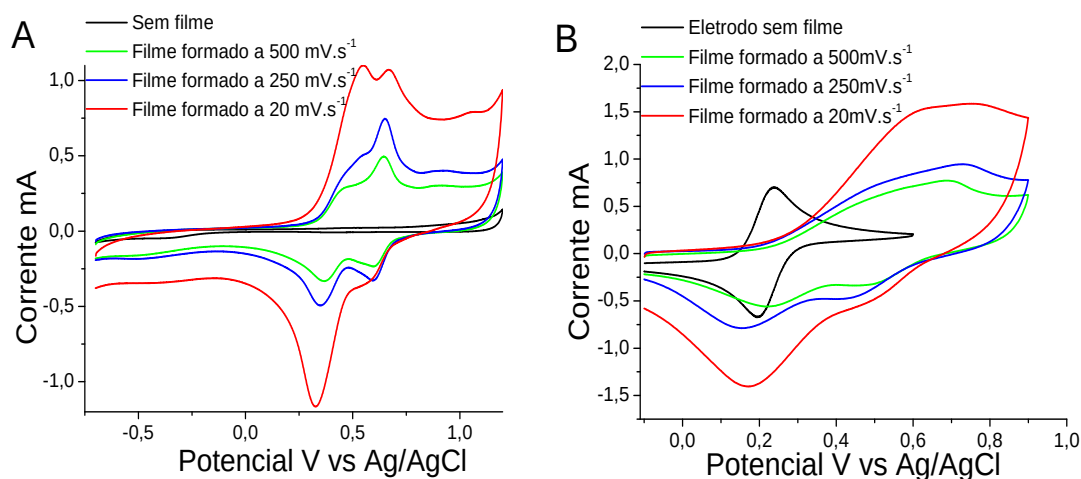


Figura 32: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite sem modificação (preto) e modificados com poli(2-HFA) formados em diferentes velocidades de varredura (vermelho) 20 mV.s^{-1} , (azul) 250 mV.s^{-1} , (verde) 500 mV.s^{-1} . (A) solução de ácido perclórico $0,50 \text{ mol.L}^{-1}$. (B) solução de $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6/\text{K}_4\text{Fe(CN)}_6$ 5 mmol.L^{-1} e KClO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ como eletrólito suporte. 100 mV.s^{-1} .

O polímero eletrogerado a 20 mV.s^{-1} apresenta característica morfológica com aspecto globular, diferente do que foi obtido a partir dos eletrodos recobertos com polímero eletrogerado a 250 e 500 mV.s^{-1} , que apresentam aspecto laminar (figura 33 A, B e C respectivamente). Estes resultados sugerem que as velocidades mais baixas (20 mV.s^{-1}) favorecem a formação de um polímero de forma mais organizada. Os pontos de nucleação da reação vão sendo recobertos com material depositado originando a forma globular, tendo maior quantidade de material eletroativo depositado, justificando as maiores respostas de corrente obtidas. Já nas eletrodeposições utilizando velocidades maiores (250 e 500 mV.s^{-1}), devido ao fato da passagem pelos potenciais se processar muito mais rapidamente, o polímero se deposita de forma laminar mas irregular, sendo depositado menor quantidade de material eletroativo, o que origina menores respostas de corrente, quando comparadas a velocidades de varredura menores.

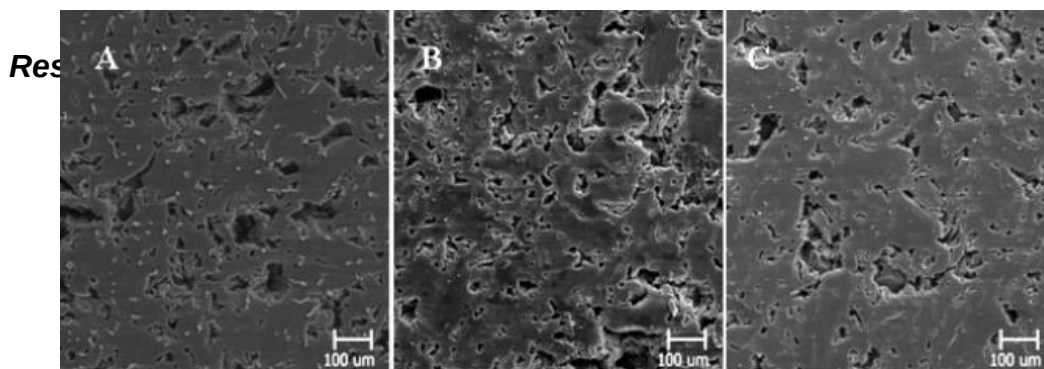


Figura 33: Micrografias eletrônicas de varredura para eletrodos de grafite modificados com poli 2-HFA formados a: (A) 20 mV.s^{-1} ; (B) 250 mV.s^{-1} ; (C) 500 mV.s^{-1} .

4.1.1.4 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO FILME POLIMÉRICO EM FUNÇÃO DO pH

Foram realizados estudos variando o pH da solução monomérica a fim de analisar os diferentes estados de protonação/desprotonação monomérica.

Foi estudada a formação de filme polimérico derivado de ácido 2-HFA em eletrodos de grafite preparados por sucessivas varreduras de potencial, em meio aquoso em diferentes valores de pH (pH 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0 e 12,0).

A predição da variação estrutural do 2-HFA em função do pH foi feita usando um programa de simulação de curva de titulação CurTiPot versão 3.3.2 (figura 34). Os valores de pK_a do 2-HFA ($pK_{a1} = 4,30$ e $pK_{a2} = 10,13$) foram obtidos usando o programa de simulação de constantes SPARC Physical/Chemical property calculator.

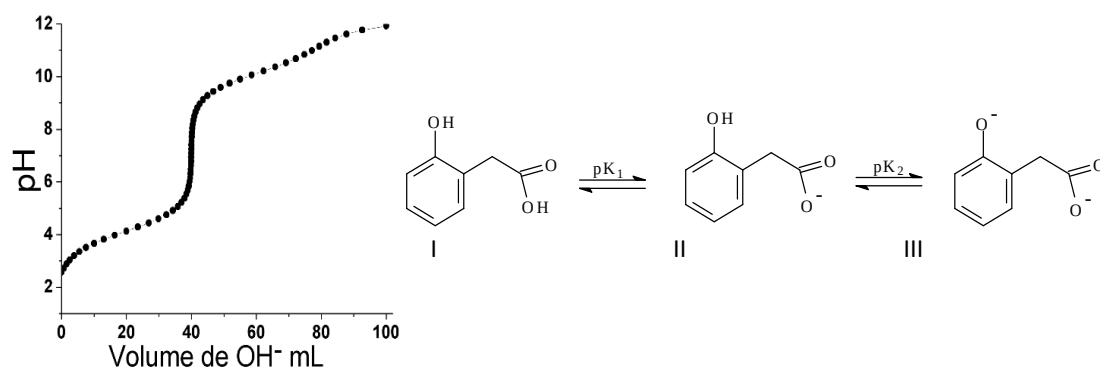


Figura 34: Simulação da curva de titulação de 50 mL de 2-HFA $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ com NaOH $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$.

Em meio ácido, o 2-HFA é encontrado na forma neutra (estrutura I). Com o aumento do valor de pH ocorre a desprotonação do grupamento carboxila (estrutura II). Quando o pH é igual ao pK_1 a concentração das formas neutra e desprotonada são iguais (estrutura I e II). No pH 7,2 ocorre a estrutura II em

Resultados e discussão

solução. Com o aumento de pH ocorre a desprotonação do grupo fenólico. Em valores de pH igual ao pK_2 há o equilíbrio equimolar fenol/fenóxido (estruturas II e III). Em pH mais básico a concentração do íon fenóxido aumenta.

A figura 35 mostra o espectro de UV-Vis do 2-HFA em diferentes valores de pH.

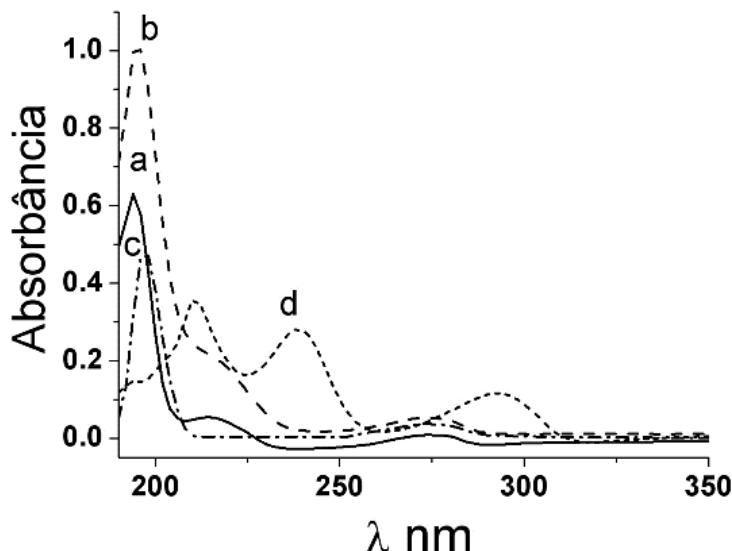


Figura 35: Espectro de UV do 2-HFA em solução aquosa em pH (a) 1,0; (b) 5,0; (c) 7,0 e (d) 12,0.

Como esperado, em soluções de pH mais ácidos, não são observadas alterações importantes nos espectros, pois, mesmo com a dissociação do grupo carboxílico, o ânion formado não entra em ressonância com o anel aromático, o que poderia causar deslocamento das bandas. Em solução de pH 12,0 ocorre maior concentração do íon fenóxido (estrutura III) que resulta em deslocamento batocrômico das bandas devido a presença de OH/O^- , grupo auxocrômico ligado ao anel benzênico, pois neste caso os elétrons livres do ânion estão disponíveis para interação com elétrons π do anel.

A figura 36 representa a polimerização feita em meio ácido, neutro e básico.

Resultados e discussão

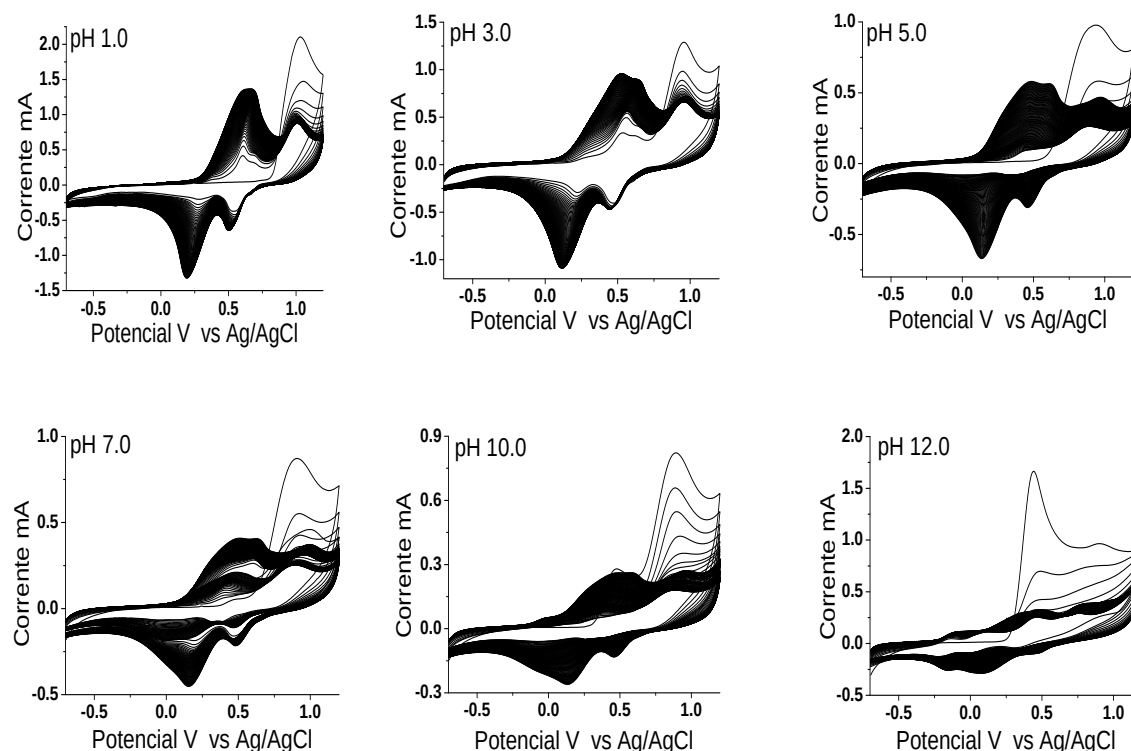


Figura 36: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite em solução aquosa de ácido perclórico $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ em diferentes valores de pH, contendo 2-HFA ($1,5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$). 100 varreduras de potencial a 50 mV.s^{-1} .

Para os estudos realizados a pH 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 10,0, observa-se um aumento gradual na corrente entre -0,25 V e +0,90 V, região do voltamograma onde são observadas duas ondas de oxidação e duas de redução, indicando a formação dos filmes poliméricos, e a diminuição de uma onda irreversível de oxidação na região de +0,70 V a +1,10 V, atribuída a oxidação do monômero. Para o estudo realizado a pH 12,0, são observadas duas ondas de oxidação e duas de redução na região de -0,35 V a +0,25 V atribuídas a formação do polímero, e duas ondas de oxidação e duas de redução na região de +0,25 V a +0,87V atribuídas ao monômero (fenóxido/fenol).

A figura 37 mostra a resposta dos eletrodos de grafite em solução de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (figura 37 A) ou solução aquosa de HClO_4 (figura 37 B), após sucessivas varreduras de potencial em soluções de diferentes pH, contendo 2-HFA.

Resultados e discussão

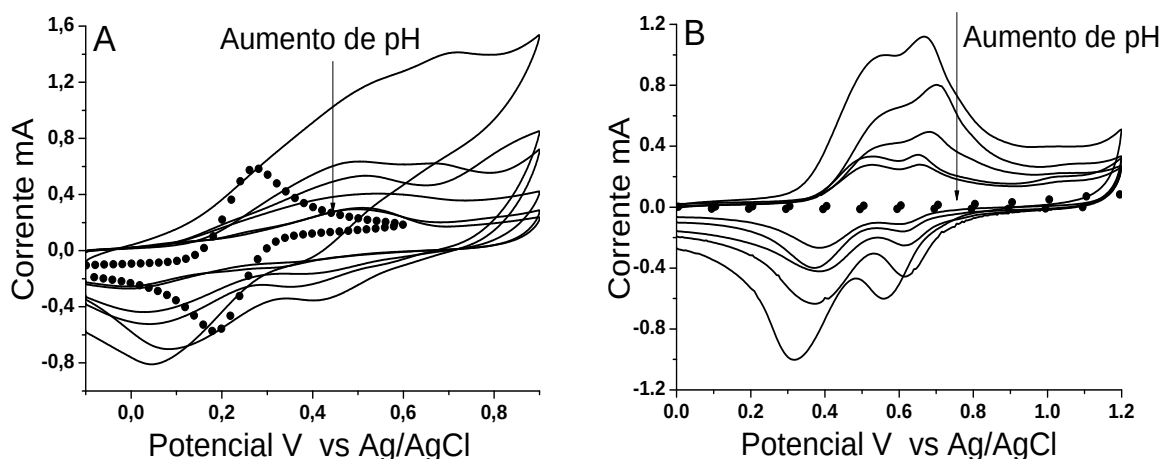


Figura 37: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados (—) a partir de solução monomérica em diferentes valores de pH (1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0 e 12,0) e eletrodo sem modificação (●) em solução de: (A) $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 5mmol.L^{-1} contendo KCl 1mmol.L^{-1} , 100mV.s^{-1} e (B) solução de HClO_4 $0,5\text{ mol.L}^{-1}$, 50mV.s^{-1} .

A Fig. 37 A mostra que a resposta eletroquímica diminui, com o aumento do pH da solução de preparação. Na Fig. 37 B observa-se a presença de duas ondas de oxidação e duas de redução, para todos os pH estudados, que apresentam diminuição de ΔE com o aumento do pH. A diminuição dos picos redox em meio básico é atribuída à formação de filmes poliméricos com características passivantes.

4.2 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA

4.2.1 ANÁLISE DE UV-VIS

O espectro de absorção para o 2-HFA feito em acetonitrila é caracterizado por uma banda de maior intensidade em 192 nm, e duas outras de menor intensidade em 215 e 275 nm. As bandas são características de transições π, π^* proveniente de anel aromático, que é fortemente influenciada pelos dois grupos auxocrômicos ligados no anel, substituintes que são considerados fortes doadores de carga eletrônica. Para o poli-(2-HFA) houve mudanças significativas com relação às bandas de absorção em comparação ao monômero. Há uma banda de intensidade máxima por volta de 210 nm e outras mais difusas que se estendem de 251 até 400 nm. Ocorre um deslocamento batocrômico em relação ao monômero comparado com o

Resultados e discussão

polímero. Este forte efeito batocrômico no máximo de absorção implica em uma importante deslocalização eletrônica π demonstrando a presença de um número grande de segmentos conjugados do poli-(2-HFA) (figura 38).

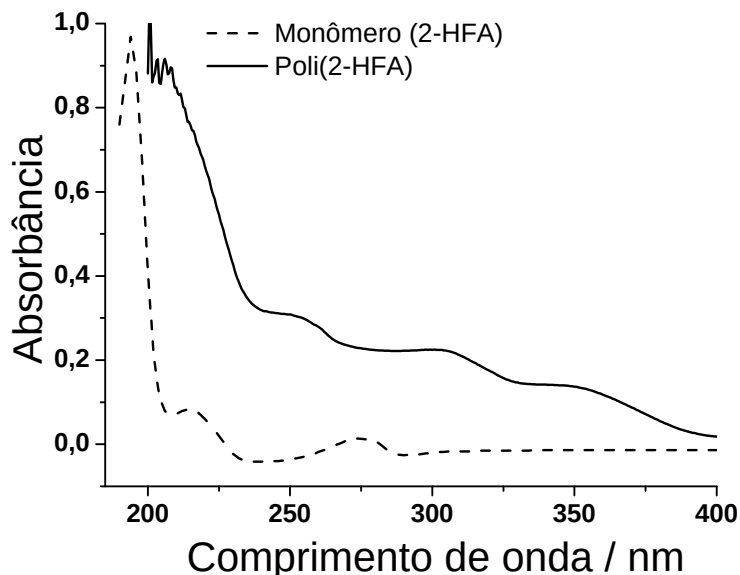


Figura 38: Espectro eletrônico de absorção molecular do 2-HFA e do Poli(2-HFA).

4.2.2 ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA

Tanto o monômero quanto o polímero apresentam alta intensidade de emissão de fluorescência (figura 39). O espectro de emissão de fluorescência para o monômero exibe um pico máximo em 294 nm e para o polímero em 390 nm. Ocorre um deslocamento batocrômico no máximo de emissão de fluorescência ($\Delta\lambda_{em} = 96$ nm). Os elétrons π tornam-se ainda mais deslocalizados por conjugação. Os efeitos dessa deslocalização são o abaixamento do nível de energia do orbital π^* . Como consequência, os máximos de absorção são deslocados para comprimentos de onda maiores.

Resultados e discussão

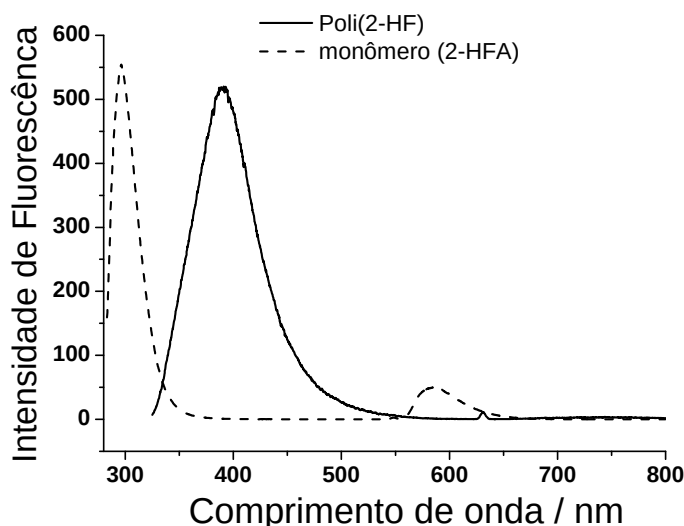


Figura 39: Espectro de emissão de fluorescência do (---) 2-HFA e do (—) Poli(2-HFA).

4.2.3 ANÁLISE DE FTIR

As análises FTIR foram realizadas com o polímero extraído dos eletrodos. O espectro pode ser visto na Figura 40. Os dois espectros (monômero e polímero) apresentam similaridades devido à presença de grupos contendo oxigênio em suas estruturas. A partir do espectro do monômero, é possível ver um alongamento da banda da hidroxila do fenol e do ácido carboxílico quase na mesma região, como pode ser visto nas bandas em 3197 e 3.375 cm^{-1} , relacionadas com ligações de hidrogênio intermoleculares, estiramento O-H de fenol e ácido carboxílico, respectivamente. As bandas em 3070, 3044 e 3021 cm^{-1} são relacionadas ao estiramento C-H do anel aromático. O estiramento C=O da carbonila pode ser visto em 1717 e 1693 cm^{-1} . A ocorrência de duas bandas de carbonila está relacionada com diferentes respostas de carbonilas com vizinhanças diferentes. O mesmo perfil é obtido para o ácido 2-hidroxibenzóico (Milena Jadrijevic-Mladar Takac, 2004), devido à posição *orto* entre os grupos que fazem uma possível ressonância e a presença de carbonilas com diferentes vizinhanças, então duas respostas são observadas em torno de 1.700 cm^{-1} . A mesma situação é observada para as β -dicetonas que existem como misturas tautoméricas das formas ceto e enol. A forma ceto e uma pequena quantidade da forma enólica são as responsáveis

Resultados e discussão

por duas bandas de carbonila. Interação entre os dois grupos carbonila na forma ceto foi sugerida como causa para este dubleto (Silverstein, 1991). As bandas em 1178, 1110 e 674 cm^{-1} são típicas de anel aromático mononuclear 1,2-dissubstituído. Várias bandas -OH, C-H e C-C são encontradas na faixa de impressão digital (1400 à 500 cm^{-1}).

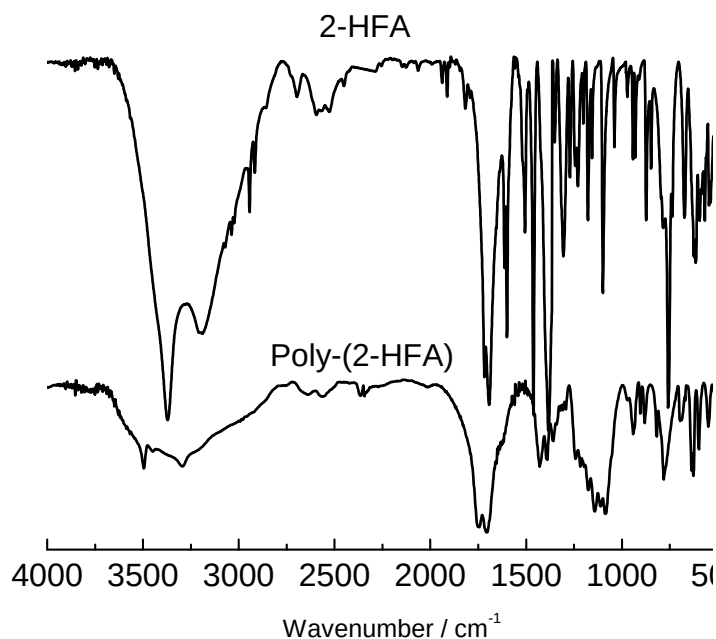


Figura 40: Espectro de FTIR obtidos em pastilha de KBr para o monômero (2-HFA) e para o polímero poli(2-HFA).

Observando o espectro do polímero, há uma diminuição na intensidade das bandas de estiramento O-H, devido, provavelmente, à mudança na estrutura dos grupos, mais evidente na hidroxila do fenol devido à troca de um pico médio de um ombro em 3197 cm^{-1} , enquanto que a banda relacionada com a hidroxila do ácido carboxílico ainda pode ser vista, mesmo com baixa intensidade em 3300 cm^{-1} . As bandas inalteradas do grupo ácido podem ser vistas em 1748 e 1706 cm^{-1} . A transformação de ácido carboxílico para éster é improvável como na ordem para a absorção de alta frequência, uma insaturação adjacente ao grupo C-O deve estar presente, o que não é possível pois há um grupo $-\text{CH}_2$ entre a carbonila e o anel aromático. No entanto, é possível ver três bandas típicas em 1141, 1111 e 1087 cm^{-1} com alta

Resultados e discussão

intensidade, relacionadas ao estiramento simétrico C-O-C do grupo éter e alongamento de vibrações C-C de aromáticos mononucleares 1,2,3-trissubstituídos, vibração de deformação C-H dos hidrogênios do anel e vibração de deformação do anel em 1429, 782, 693 cm^{-1} respectivamente. Todas as análises são consistentes com a literatura (Silverstein, 1991; Pavia D. L., 1996). Os dados de espectros FTIR, sugerem que a polimerização produz um polímero com um átomo de oxigênio do grupo hidroxila de fenol. Isso é esperado, pois é mais fácil remover um elétron deste oxigênio, ligado diretamente ao anel aromático, o qual aumenta a densidade eletrônica através da ressonância com o anel.

4.3 CARACTERIZAÇÃO PIEZELÉTRICA

O perfil linear entre a frequência e a carga nos mostra se é possível utilizar a equação de Sauerbrey para medidas de massa:

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\rho}} \quad (1)$$

Onde Δf é a variação de frequência de ressonância em Hz, A é a área geométrica piezoeletricamente ativa em cm^2 definida pela projeção dos filmes depositados sobre o cristal, f_0 é a frequência fundamental do cristal e Δm é a variação de massa.

Esse fato se deve à carga estar relacionada à quantidade de material depositado, uma medida indireta da espessura do filme e, durante o depósito, a variação linear com a diminuição de frequência indica que essa última pode ser relacionada com a massa aparente e a equação de Sauerbrey é válida para o cálculo de massa aparente através da alteração de frequência em cada experimento.

A relação entre frequência e carga pode ser vista na equação abaixo:

$$\Delta Q = -F \Delta f / MMC_f, \quad (2)$$

Onde F é a constante de Faraday, MM é a massa molar do monômero e C_f é a constante de sensibilidade derivada da equação de Sauerbrey.

O polímero obteve crescimento linear com o número de varreduras. Dessa forma, utilizamos a equação de Sauerbrey para transformar os valores

Resultados e discussão

de frequência em massa. De qualquer forma, estudos futuros sobre a influência dos íons, solvente e do próprio material depositado devem ser realizados para elucidação desse decréscimo acentuado de frequência a partir da sexta varredura. Os voltamogramas cíclicos podem ser observados na figura 41, abaixo:

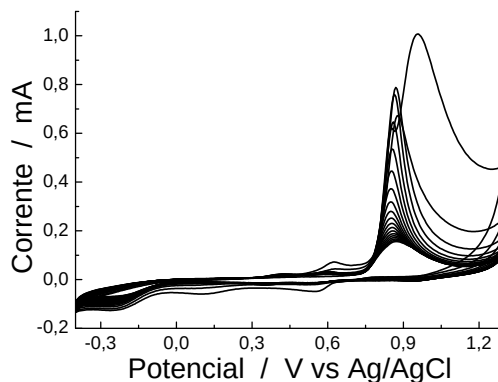


Figura 41: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro em solução contendo 2-HFA 2,5 mmol.L⁻¹ em meio de H₂SO₄ 0,2mol.L⁻¹, 20 varreduras, 50mV.s⁻¹

Pode-se observar, a partir da figura 41, que o processo de eletropolimerização se inicia por volta de +0.72V, com o surgimento de uma onda de oxidação, atingindo um potencial de pico a +0.957V. Essa onda é apontada como sendo a oxidação do monômero estudado. À medida que o experimento segue, há o crescimento de dois pares redox à ~+0.38V e ~+0.58V e o decréscimo, em valores de corrente, do pico de oxidação do monômero, indicando a formação de um material sobre a superfície do eletrodo. Os pares redox se referem ao processo redox do filme polimérico em crescimento na superfície do eletrodo. Isso é confirmado pelo aumento nos valores de corrente à medida que se aumenta o número de varreduras. Pode-se observar que os potenciais de pico de oxidação tendem a deslocar para potenciais menos positivos devido a uma maior facilidade de material sendo formado na superfície à medida que o número de ciclos aumenta. O filme formado pode estar permitindo uma facilidade na formação de novas camadas de material através de sua própria estrutura.

Os primeiros dois voltamogramas cíclicos juntamente com o gráfico de massa *versus* potencial são mostrados na figura 42A. Os valores de massa ao fim de cada ciclo podem ser vistos na figura 42 B.

Resultados e discussão

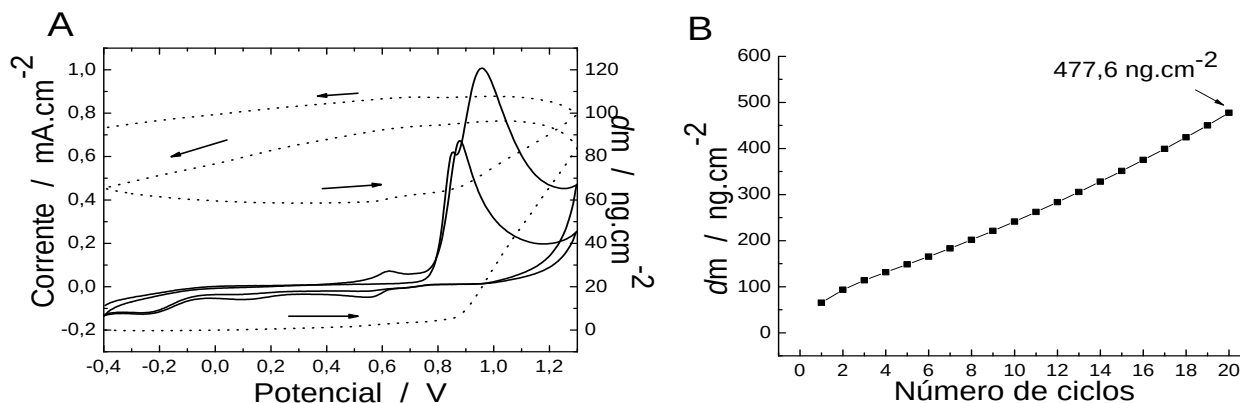


Figura 42: (A) Perfil j_{xE} (—) e dm_{xE} (- - -) de 2-HFA 2,5m mol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,2 mol.L⁻¹, em pH 0. Duas varreduras. 50mV.s⁻¹. (B) Perfil dm versus número de ciclos, 20 varreduras.

Observa-se, pelo gráfico 42 A, que, no primeiro ciclo, os valores de massa se mantêm constantes até aproximadamente +0.85V, onde se inicia o aumento nesses valores, exatamente no potencial de oxidação do monômero, se estendendo até o fim do ciclo, +1.3V (acréscimo de 78.75 ng.cm⁻²). Durante o potencial reverso, até +1.04V, há um aumento adicional de massa devido à oxidação de parte do monômero nessa faixa. A partir de +1.04V, os valores de massa começam a decrescer lentamente até +0.65V, provavelmente pela expulsão de ânions do material no eletrodo. A partir de +0.65V até o fim do ciclo, à -0.4V, um decréscimo um pouco mais acentuado ocorre por ser a região de redução do polímero em formação (perda de 31,06 ng.cm⁻²). Porém, o decréscimo não chega a ser tão acentuado quanto ao aumento do ciclo inicial e um aumento de 65,38 ng.cm⁻² ocorre ao final do primeiro voltamograma. A partir daí, um aumento linear ocorre até o final do experimento, como pode ser visto na figura 43 B, e um valor de 477,6 ng.cm⁻² é encontrado no final do experimento. Essa massa representa o valor de massa total, incluindo participação do polímero, solvente e íons.

4.4 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA

A análise térmica inclui uma série de técnicas nas quais uma propriedade do material (área superficial, porosidade, calor específico, tamanho da partícula, etc.) é medida em função do tempo ou da temperatura num sistema com um regime de temperatura controlado. (Pimentel, 1997). Dentre as

Resultados e discussão

inúmeras aplicações da termogravimetria destacam-se: estudo da desidratação e da higroscopicidade e identificação de polímeros novos, conhecidos e intermediários. O termo Análise Termogravimétrica (TGA) é comumente empregado, particularmente em polímeros, no lugar de TG.

A figura 43 mostra o termograma obtido para o polímero derivado de ácido 2-hidroxifenilacético.

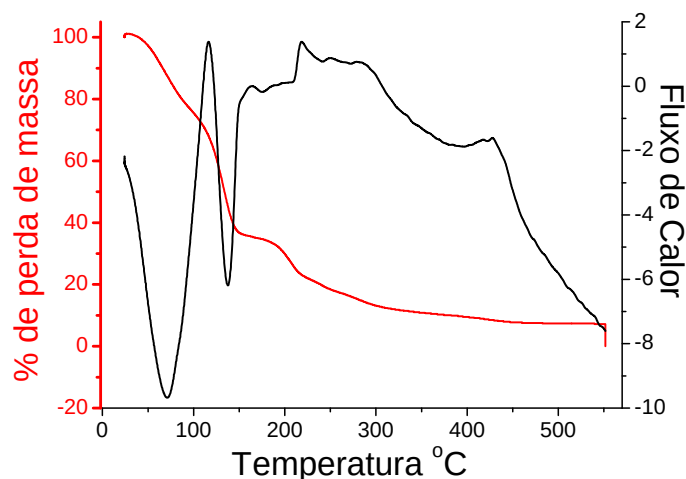


Figura 43: Termograma de TGA obtido para o Poli(2-HFA).

É possível observar que num intervalo de 55 a 100 °C houve uma perda considerável de massa (em torno de 22%). Esta perda pode ser relacionada com a evaporação de solvente residual e água pois o filme polimérico é extraído em acetonitrila e logo em seguida é submetido a um processo de evaporação do solvente. Observando o primeiro estágio do termograma pode-se dizer que o processo de evaporação do solvente não se deu por completo e que uma quantidade de solvente ainda permanecia junto ao polímero, por isso a perda de massa começa em temperaturas baixas e se estende até a temperatura de ebulição da água, ponto em que todo o solvente (acetonitrila e água) foi evaporado. Num intervalo de temperatura de 126 a 143°C pode-se observar outro processo de perda de 37%. Esta perda pode ser atribuída à decomposição térmica do polímero, e processo pode estar associado à fusão do poli(2-HFA). No restante da faixa avaliada a perda de massa é lenta e gradativa fato que pode estar associado a um processo de polimerização adicional do oligômeros formados em estágios anteriores.

4.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Foi feito um estudo morfológico da superfície dos eletrodos de grafite modificados com poli(2-HFA) a partir de diferentes valores de pH da solução monomérica (figura 44).

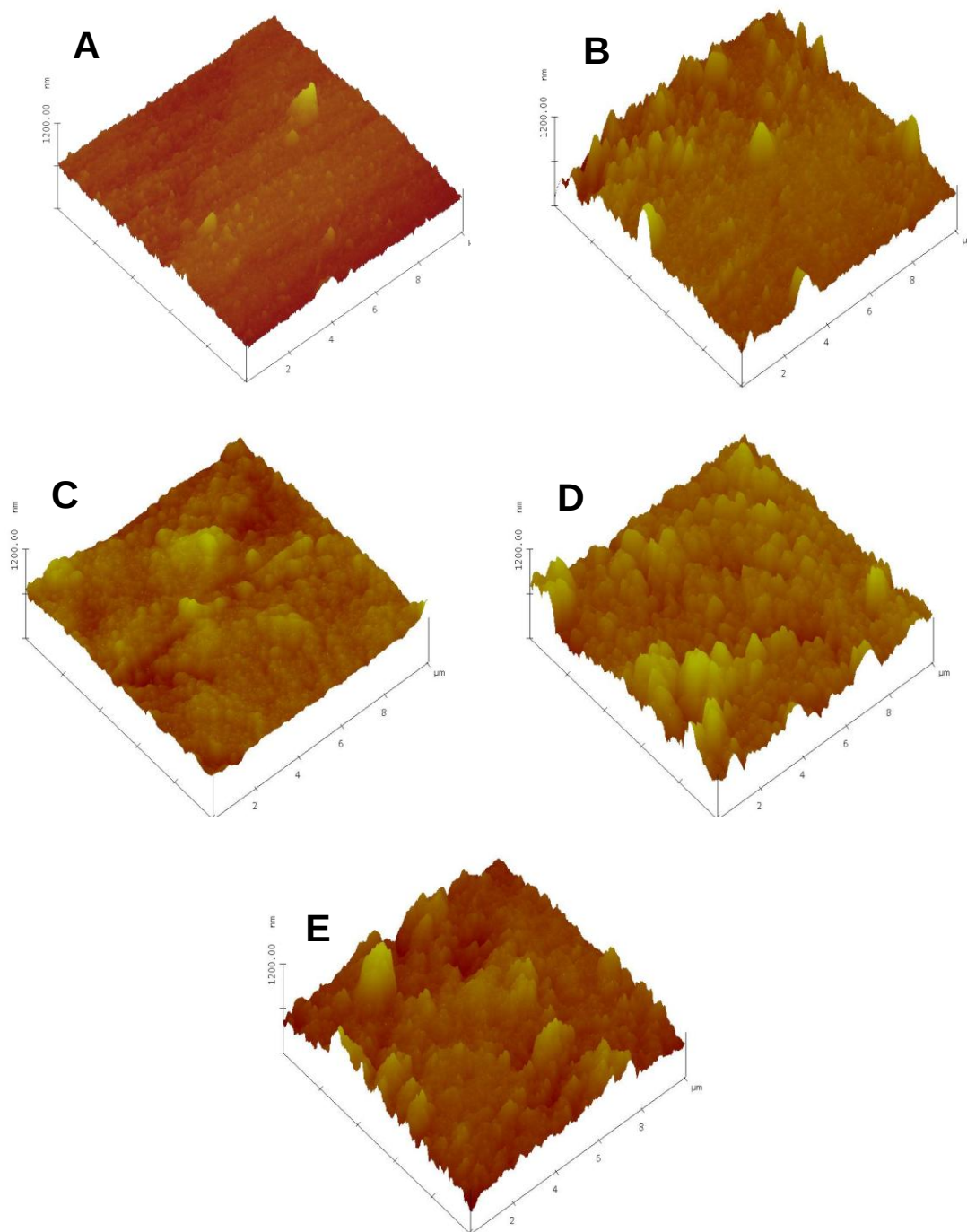


Figura 44: Micrografias de força atômica de eletrodo de grafite (A) e modificado com: poli(2HFA) eletrogerado em pH 0,5 (B); poli(2HFA) eletrogerado em pH 5 (C); poli(2HFA) eletrogerado em pH 12 (D); eletrodo modificado com poli(2HFA) eletrogerado em pH 0,5 + HRP (E).

Resultados e discussão

A figura 44 mostra a análise morfológica de eletrodo de grafite sem modificação (figura 44 A), eletrodos modificados com poli(2HFA) eletrodepositados a partir de solução pH 0,5; pH 5,0; pH12,0 (figuras 44 B, C e D respectivamente) e eletrodo modificado com poli(2HFA) a partir de solução pH 0,5 com HRP incorporada. Observando a morfologia da superfície dos eletrodos nota-se que nas condições testadas para eletrodeposição houve modificação dos eletrodos com filme polimérico, pois a morfologia do grafite sem modificação é nitidamente diferente das demais. É possível observar também que filmes de estrutura diferentes são formados a partir de soluções com valores de pH distintos, corroborando os resultados obtidos na figura 36. Além da análise visual os diferentes valores de rugosidade reforçam a afirmativa de formação de diferentes estruturas para os filmes poliméricos. O valores de rugosidade são de 590, 1008, 446 e 916 nm para o eletrodo de grafite sem modificação e para os filmes formados a partir de solução monomérica pH 0,5; 5,0 e 12,0 respectivamente (Figura 44 A, 44 B, 44 C e 44 D respectivamente). Estes valores apóiam a formação de filmes poliméricos com estruturas diferenciadas devido à influência do estado de protonação do monômero (figura 34).

Os eletrodos foram modificados com o intuito de gerar um novo material com possível aplicação na imobilização de enzimas. Comparando a figura 44 B, eletrodo modificado com poli(2-HFA) pH 0,5, com a figura 44 E, eletrodo modificado com poli(2-HFA) pH0,5 e HRP imobilizada, bem como os valores de rugosidade de 1008 nm e 887nm respectivamente, pode-se observar uma diferença evidente nas análises morfológicas o que permite dizer que houve imobilização de enzima sobre o poli(2HFA), atingindo assim um dos objetivos deste trabalho.

4.6 PRODUÇÃO DE BIOSSENSORES

4.6.1 CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A biomolécula em estudo foi a horseradish peroxidase (HRP), enzima que catalisa a oxidação de derivados fenólicos. Para ativação desta enzima é necessário que haja peróxido de hidrogênio no meio. A figura 45 mostra o

Resultados e discussão

esquema da reação de oxidação do guaiacol (derivado fenólico escolhido para os testes) na presença de peróxido de hidrogênio catalisada pela HRP, o tetraguaiacol, produto formado, é vermelho.

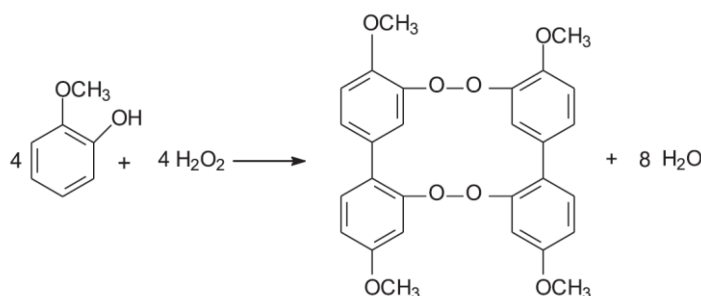


Figura 45: Reação de oxidação do guaiacol na presença de peróxido de hidrogênio catalisada pela HRP (Weinheimer e White, 2003).

A atividade enzimática pode ser expressa em unidade de atividade cujo símbolo é U, a qual é definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de guaiacol em 1 minuto. O método utilizado para determinar a atividade enzimática da HRP foi a oxidação de guaiacol em tetraguaiacol (produto vermelho) na presença de peróxido de hidrogênio (figura 45). Esta reação foi monitorada a 470 nm comprimento de onda de absorção do produto gerado. Para calcular a absorbância em um minuto foi feito um ensaio enzimático espectrofotométrico com o objetivo de calcular a atividade enzimática, usando guaiacol como substrato enzimático.

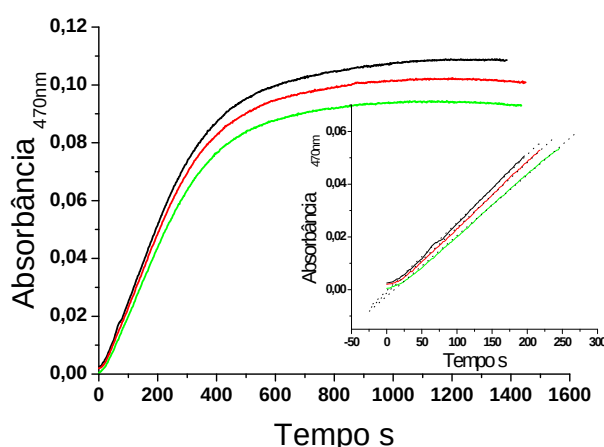


Figura 46: Absorbância do tetraguaiacol a 470 nm em função do tempo de reação enzimática. Inserto: região linear da curvas. Condições: pH 6,5; tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹; peróxido de hidrogênio 165,8 mmol L⁻¹; guaiacol 0,15 mmol L⁻¹; HRP (1U).

Resultados e discussão

O ensaio foi realizado em triplicata e a atividade enzimática para HRP presente na cubeta foi de $1,66 \pm 0,01$ determinada de acordo com a equação (Zeraiki, Souza *et al.*, 2008):

$$U = \frac{A}{\varepsilon} \times \frac{1}{V_e} \times FD \times \frac{1}{t}$$

O valor obtido ($1,66 \text{ U.}\mu\text{L}$, ou seja, 205 U.mg^{-1}) foi maior que o especificado pelo fabricante (124 U.mg^{-1}), que pode ser explicado pelo fato de que o fabricante sugere que para o ensaio enzimático seja usado o pirogalol como substrato enzimático, como não tínhamos este reagente, este experimento foi adaptado utilizando o guaiacol como substrato.

4.6.2 TESTES INICIAIS COM A ENZIMA HORSE RADISH PEROXIDASE

Após os estudos de modificação dos eletrodos de grafite e caracterização do material formado, foram feitos estudos de aplicação deste material como suporte de imobilização de biomoléculas para a produção de biossensores eletroquímicos.

Para os estudos iniciais foram usados eletrodos modificados com poli(2-HFA). Os eletrodos modificados com filme polimérico foram então submetidos a um potencial de redução, para serem usados como branco, e gotejou-se $10 \mu\text{L}$ de solução enzimática 124 U.mL^{-1} na superfície do eletrodo, este eletrodo foi deixado em repouso (por cerca de 30 minutos) até que a solução secasse completamente. O eletrodo modificado com poli(2-HFA)/HRP foi colocado em uma solução contendo o substrato de interesse.

Comparando o eletrodo contendo somente poli(2-HFA) e poli(2-HFA)/HRP (figura 47) percebe-se que há um deslocamento para potenciais mais catódicos e um aumento de corrente de pico de redução indicando que a reação entre a enzima imobilizada e o substrato pode ser detectada eletroquimicamente. O substrato usado nos experimentos foi o guaiacol. De acordo com a literatura (Vieira e Fatibello-Filho, 1998; Zeraiki, Souza *et al.*, 2008) a HRP oxida o guaiacol a tetraguaiacol, cor avermelhada, e o produto oxidado pode ser detectado em torno de 0,00 volts (Freire, Durán *et al.*, 2002).

Resultados e discussão

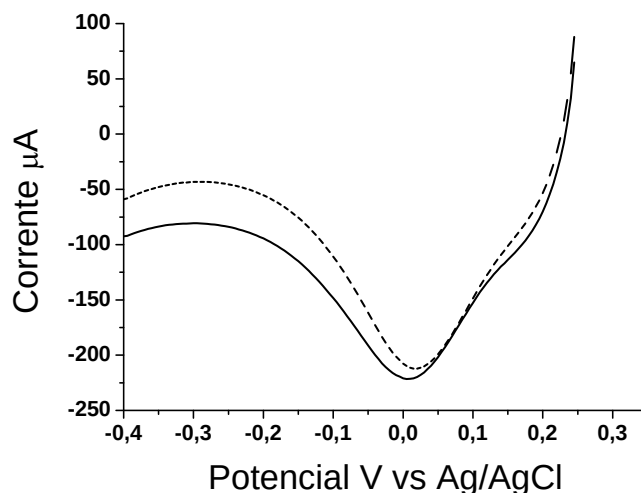


Figura 47: Voltamogramas lineares obtidos em solução tampão fosfato de potássio $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,5. (---) somente eletrodo modificado com poli(2-HFA) em tampão e (—) eletrodo modificado com poli(2-HFA)/HRP em solução tampão contendo $32,60 \text{ mmol.L}^{-1}$ de H_2O_2 e $9,10 \text{ mmol.L}^{-1}$ de guaiacol.

Foi feito um teste de variação da concentração de guaiacol (figura 48) para verificar se o sistema pode ser usado em análises quantitativas.

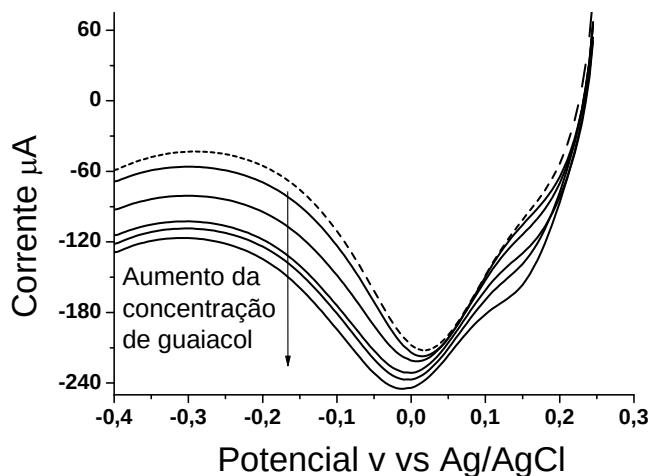


Figura 48: Voltamogramas lineares obtidos em solução tampão fosfato de potássio $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,5. (---) somente eletrodo modificado com poli(2-HFA) em tampão e (—) poli(2-HFA)/HRP em solução tampão contendo H_2O_2 $32,60 \text{ mmol.L}^{-1}$ e guaiacol $0,00$; $9,10$; $18,20$; $27,30$; $36,40 \text{ mmol.L}^{-1}$ respectivamente.

Resultados e discussão

Analizando a figura 48 podemos observar que, com o aumento da concentração de guaiacol há um aumento do valor da corrente de pico de redução confirmando que eletrodo modificado com poli(2-HFA)/HRP é sensível à variação de concentração de substrato.

4.6.3 TESTES EM FLUXO COM A ENZIMA HORSE RADISH PEROXIDASE

4.6.3.1 TESTES COM ELETRODOS DE GRAFITE MODIFICADOS COM POLI(2-HFA)

O sistema foi testado em fluxo e os resultados estão apresentados a seguir.

Para realização dos testes em fluxo, foi adicionado BSA 0,5% na solução enzimática antes da imobilização na superfície do eletrodo modificado com poli(2-HFA). Este procedimento foi adotado para melhorar as respostas de detecção do analito de interesse.

A figura 49 mostra testes iniciais em fluxo. Pode-se observar que o sistema foi estável durante 12 injeções (desvio padrão 0,75 μA) e que não houve processo de lixiviação.

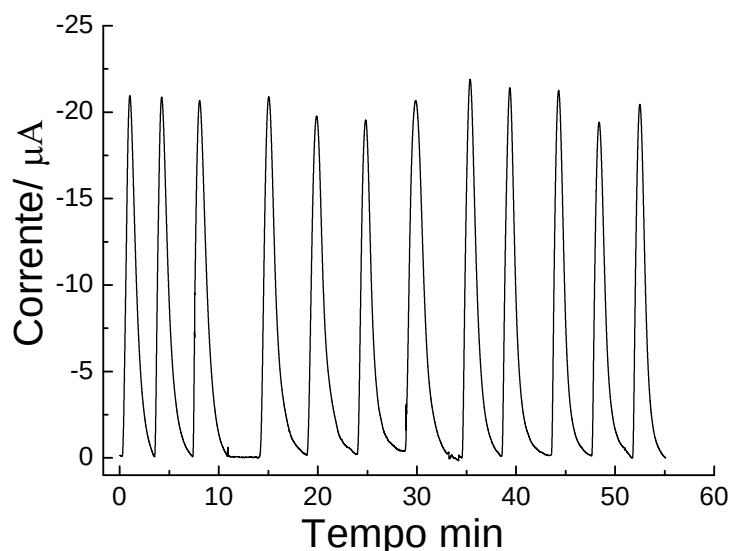


Figura 49: Diagrama de 12 injeções de guaiacol $45,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ e H_2O_2 $165,2 \text{ mol.L}^{-1}$. Solução transportadora: tampão fosfato de potássio $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,5. Vazão: $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$. Volume da alça de amostragem: $200 \mu\text{L}$. Potencial aplicado: $0,00\text{V}$. 10U de HRP usados na imobilização.

Resultados e discussão

Foram feitos testes de injeção de guaiacol na ausência de peróxido, mas nestas condições não foi possível observar nenhum pico, pois a enzima só catalisa a reação de oxidação na presença de peróxido de hidrogênio.

O potencial aplicado, a vazão e o pH da solução transportadora foram otimizados.

Foram feitos testes de vazões de 2,50, 2,00, 1,50 e 1,00 mL.min⁻¹. Os melhores resultados foram obtidos em vazões mais altas. Em vazões mais baixas pode acontecer a contaminação da superfície, além das, análises serem mais demoradas.

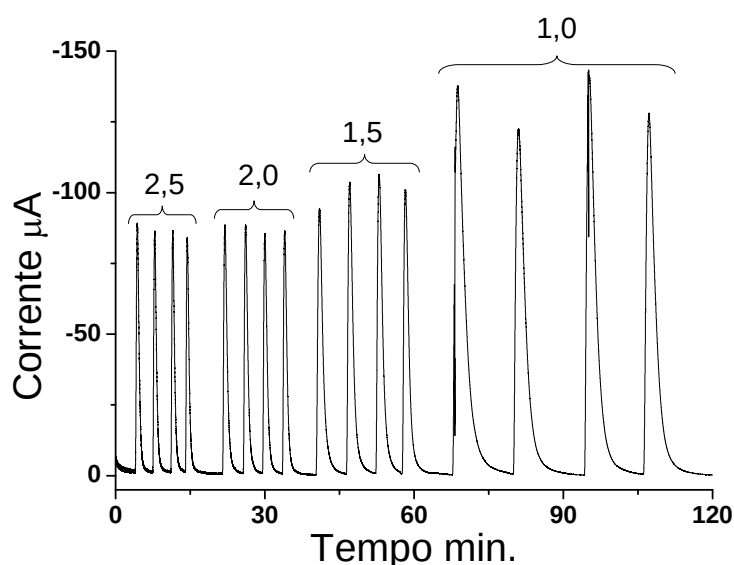


Figura 50: Diagrama de 16 injeções de guaiacol 45,8 mmol.L⁻¹ e H₂O₂ 165,2 mmol.L⁻¹. Solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L⁻¹, pH 6,5. Vazões variadas: 2,5, 2,0, 1,5 e 1,0 mL.min⁻¹. Volume da alça de amostragem: 200 µL. Potencial aplicado: 0,00V. 10U de HRP usados na imobilização.

Analisando os resultados da figura 50, observa-se que para vazões menores a repetitividade dos resultados não é tão boa quanto vazões maiores. Os valores de desvio padrão encontrados foram de 1,74; 1,21; 5,25 e 9,63 para as vazões de 2,5; 2,0; 1,5 e 1,0 mL.min⁻¹ respectivamente. Outro fator que deve ser considerado é a frequência analítica que diminui consideravelmente para vazões menores, o cálculo feito do tempo em minutos considerando 4 injeções obteve os valores de: 14; 16; 24 e 51 minutos para as vazões de 2,5; 2,0; 1,5 e 1,0 mL.min⁻¹ respectivamente. Portanto as vazões de 2,5 e 2,0

Resultados e discussão

mL.min⁻¹ são mais apropriadas para as análises e destas a escolhida foi de 2,0 mL.min⁻¹ pois além de os resultados de repetitividade e frequência analítica serem bons, estudos realizados a uma vazão de 2,5 mL.min⁻¹ poderiam apresentar um efeito de lixiviação indesejado, efeito este que é minimizado em vazão menor.

Na figura 51 estão representados os voltamogramas cíclicos realizados em fluxo com a finalidade de avaliar a região na qual havia variação de corrente quando o volume injetado atingia o biossensor.

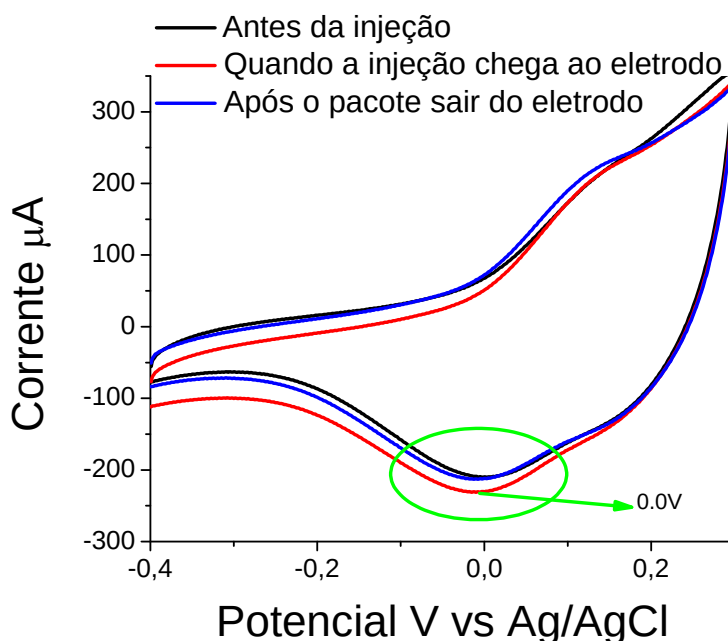


Figura 51: Voltamogramas cíclicos feitos em fluxo. Injeção de guaiacol 45,8 mmol.L⁻¹ e H₂O₂ 165,2 mmol.L⁻¹. Solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L⁻¹, pH 6,5. Vazão: 2,0 mL.min⁻¹. Volume da alça de amostragem: 200 µL. 10U de HRP usados na imobilização.

Na figura 51, observa-se que o pico de redução ocorre na região de +0,20 a -0,20V, portanto foram feitos experimentos aplicando potencial de +0,20, +0,10, 0,00, -0,10, -0,20, -0,30 volts.

Os melhores respostas de corrente foram obtidos em potencial 0,00V (figura 52), tanto em termos de linha de base quanto em valor da corrente de pico. As análises feitas em potenciais mais anódicos (+0,10 e +0,20V) mostraram que a detecção do produto da reação nestes potenciais não é tão eficiente quanto em potenciais mais catódicos. Para os testes feitos em

Resultados e discussão

potenciais -0,30, -0,20 e -0,10 observou-se um decréscimo de valor de corrente de pico quando comparado com o potencial de 0,00V condizente com a referência (Freire, Durán *et al.*, 2002).

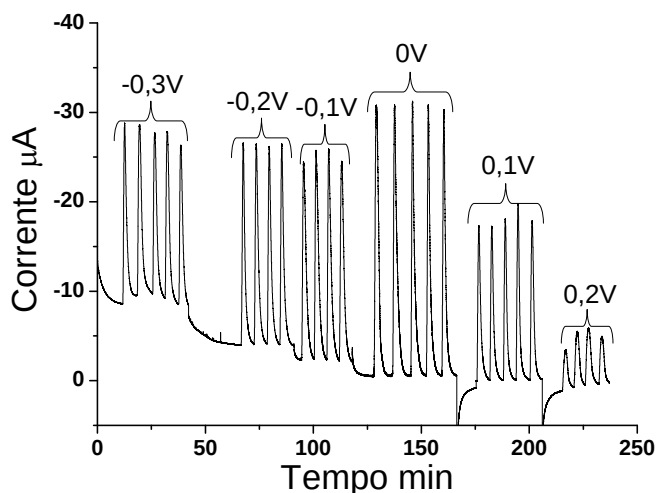


Figura 52: Diagrama de 27 injeções de guaiacol $45,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ e H_2O_2 $165,2 \text{ mmol.L}^{-1}$. Solução transportadora: tampão fosfato de potássio $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,5. Vazão: $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$. Volume da alça de amostragem: $200 \mu\text{L}$. Potenciais aplicados: -0,3; -0,2; -0,1; 0,0; 0,1; 0,2V. 10U de HRP usados na imobilização.

A partir dos dados acima foi construído um gráfico de potencial aplicado ao sistema *versus* altura da corrente de pico (figura 53), figura que confirma que o melhor potencial para a realização dos experimentos é de 0,00V.

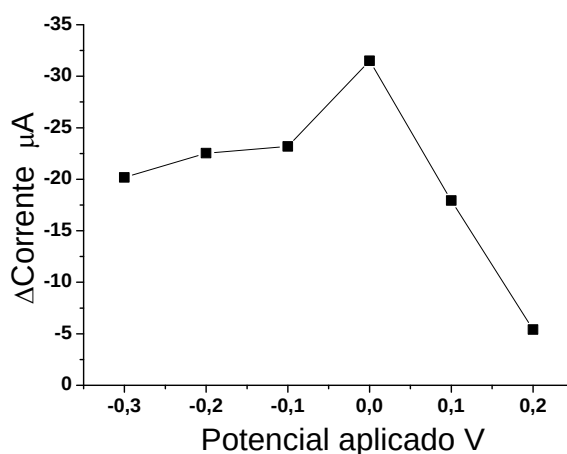


Figura 53: Gráfico de potencial aplicado *versus* altura da corrente de pico.

Tendo em vista que o método de detecção escolhido foi a amperometria a escolha do potencial aplicado influencia diretamente os resultados. Esse

Resultados e discussão

experimento foi realizado para verificar qual potencial seria usado nas análises posteriores. Observando as figuras 52 e 53 observa-se que o potencial avaliado que teve melhor reprodutibilidade das injeções, bem como maior altura de pico foi 0 volts.

As enzimas sofrem efeitos estruturais pela variação de pH devido ao seu caráter anfótero. O pH interfere na atividade enzimática uma vez que altera a distribuição de cargas elétricas da enzima, influenciando a conformação do centro ativo e, conseqüentemente, a sua interação com o substrato. Mudanças extremas de pH podem alterar a estrutura da enzima devido a uma repulsão de cargas e mudanças mais brandas de pH podem levar a uma dissociação de enzimas oligoméricas e há casos em que a dissociação de enzimas oligoméricas leva à sua completa inativação. Por outro lado, as mudanças de pH que não afetam totalmente a estrutura de uma enzima podem diminuir sua atividade apenas por estar afetando resíduos do sítio catalítico. As enzimas possuem um pH ótimo e, em valores cima ou abaixo deste, elas agem de maneira menos eficiente.

Após otimizado o potencial aplicado e vazão, foi feito um experimento de otimização de pH da solução transportadora (figura 54).

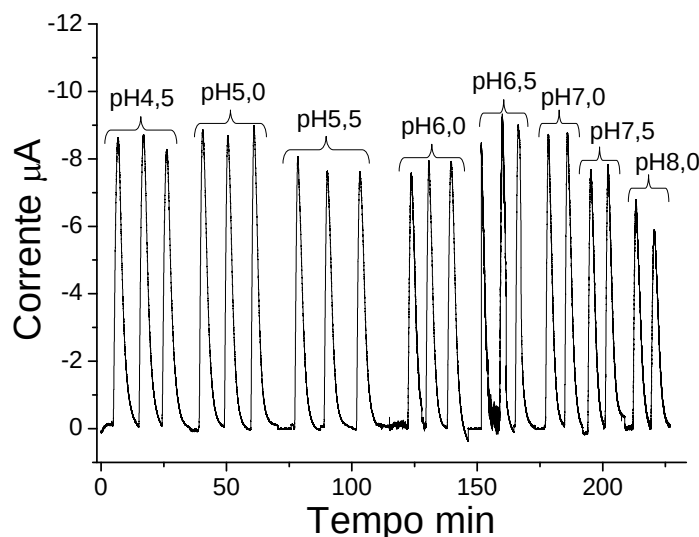


Figura 54: Diagrama de 24 injeções de guaiacol $45,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ e H_2O_2 $165,20 \text{ mmol.L}^{-1}$. Solução transportadora: tampão fosfato de potássio $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$, pH variado. Vazão: $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$. Volume da alça de amostragem: $200 \text{ }\mu\text{L}$. Potencial aplicado: $0,00\text{V}$. 10U de HRP usados na imobilização.

Resultados e discussão

A partir dos resultados da figura 54 foi construído o gráfico da figura 55.

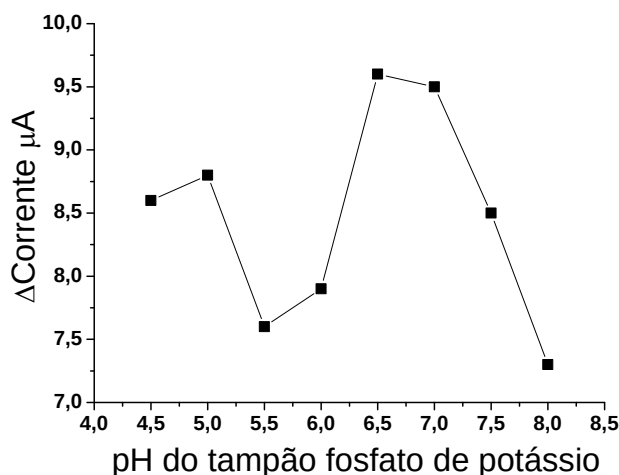


Figura 55: Gráfico de pH da solução transportadora *versus* altura da corrente de pico.

Analisando a figura 55 observa-se que o pH da solução transportadora influencia muito no valor da corrente de pico. Dentre os valores de pH estudados, o que forneceu a melhor resposta de corrente foi o pH 6,5. Este resultado é esperado pois, de acordo com a Sigma Aldrich (fabricante da enzima) este é o pH ótimo para a *horseradish peroxidase*.

Antes da incorporação da enzima a estrutura polimérica é carregada negativamente através da aplicação de potencial catódico (0,3 a -0,4 V) pois desta forma a possibilidade de interação entre filme carregado negativamente e a enzima carregada positivamente aumenta. As cargas positivas da enzima se devem ao fato dela estar em um valor de pH abaixo de seu ponto isoelétrico (o PI da HRP é em pH 7). Para confirmar estes dados foram feitos experimentos sem aplicar nenhum tipo de potencial e aplicando potencial de oxidação (deixando o filme carregado positivamente) antes de imobilizar a enzima.

A figura 56 representa um fiograma obtido a partir de um eletrodo que não foi submetido a nenhum tipo de aplicação de potencial antes de incorporar as 10 unidades enzimáticas.

Resultados e discussão

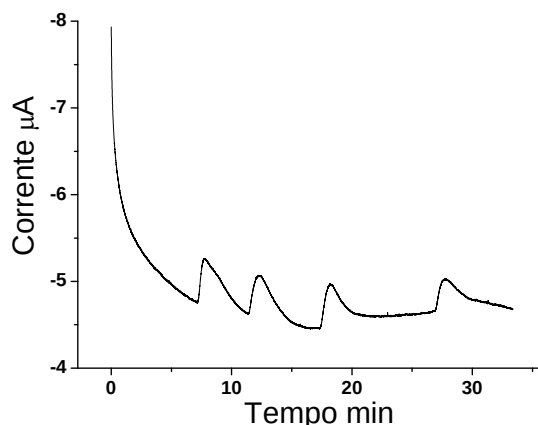


Figura 56: Diagrama de 4 injeções de guaiacol $45,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ e H_2O_2 $165,20 \text{ mmol.L}^{-1}$. Solução transportadora: tampão fosfato de potássio $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,5. Vazão: $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$. Volume da alça de amostragem: $200 \text{ }\mu\text{L}$. Potencial de análise: $0,00\text{V}$. 10U de HRP usados na imobilização. Eletrodo modificado com poli(2HFA) sem aplicação de potencial antes da incorporação da HRP.

Observa-se que a incorporação da enzima nestas condições não é tão satisfatório, pois os valores de corrente de pico são baixos e não há estabilidade da linha de base.

Resultados semelhantes são observados (figura 57) quando o eletrodo modificado com poli(2-HFA) é submetido a um processo de oxidação antes de imobilizar as 10 unidades enzimáticas.

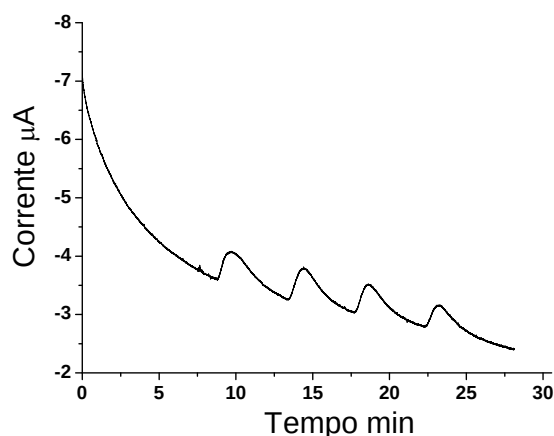


Figura 57: Diagrama de 4 injeções de guaiacol $45,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ e H_2O_2 $165,20 \text{ mmol.L}^{-1}$. Solução transportadora: tampão fosfato de potássio $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,5. Vazão: $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$. Volume da alça de amostragem: $200 \text{ }\mu\text{L}$. Potencial de análise: $0,00\text{V}$. 10U de HRP usados na imobilização. Eletrodo modificado com poli(2HFA) submetido a potencial anódico antes da incorporação da HRP.

Resultados e discussão

Observando os dados das figuras 56 e 57 nota-se que o pré-condicionamento do eletrodo modificado com poli(2-HFA) através de varreduras lineares em potencial catódico antes da incorporação da enzima é importante para a obtenção de bons resultados, pois quando o pré-condicionamento não é adequado as respostas não são repetitivas, apresentam baixo pico de corrente e a linha base não estabiliza.

4.6.3.2 TESTES COM ELETRODOS DE GRAFITE SEM MODIFICAÇÃO

Foram realizados estudos de incorporação de enzima sobre eletrodos de grafite sem modificação com poli(2-HFA).

A figura 58 representa um eletrodo de grafite que foi submetido a um potencial de redução antes de incorporar as 10 unidades de HRP.

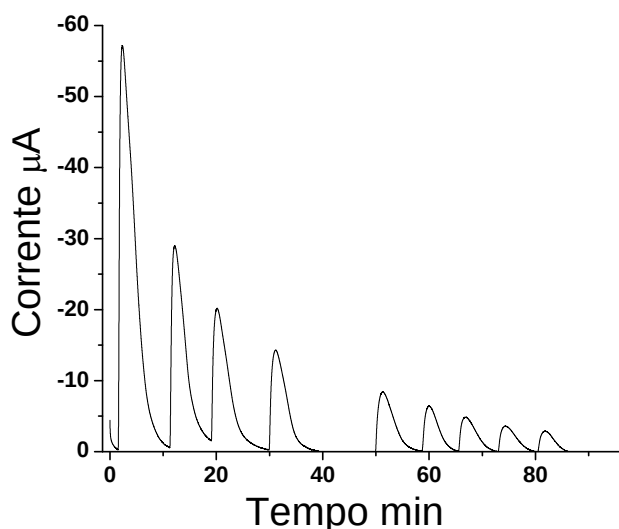


Figura 58: Diagrama de 9 injeções de guaiacol $45,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ e H_2O_2 $165,20 \text{ mmol.L}^{-1}$. Solução transportadora: tampão fosfato de potássio $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,5. Vazão: $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$. Volume da alça de amostragem: $200 \text{ }\mu\text{L}$. Potencial de análise: $0,00\text{V}$. 10U de HRP usados na imobilização.

Na figura 58, observa-se nitidamente que houve um processo de lixiviação da enzima, isto pode ser explicado pela ausência de filme polimérico na superfície do eletrodo.

A figura 59 representa um eletrodo que não foi submetido a nenhum tipo de potencial antes da imobilização de 10 u de HRP.

Resultados e discussão

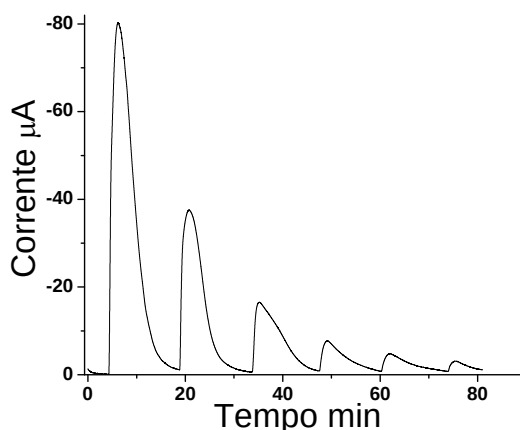


Figura 59: Diagrama de 6 injeções de guaiacol $45,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ e H_2O_2 $165,20 \text{ mmol.L}^{-1}$. Solução transportadora: tampão fosfato de potássio $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,5. Vazão: $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$. Volume da alça de amostragem: $200 \text{ }\mu\text{L}$. Potencial de análise: $0,00\text{V}$. 10U de HRP usados na imobilização.

Na figura 59 pode-se observar que no eletrodo de grafite sem aplicação de nenhum tipo de potencial e na ausência de filme polimérico, o processo de lixiviação da enzima é muito mais rápido, resultado confirmado pela figura 60.

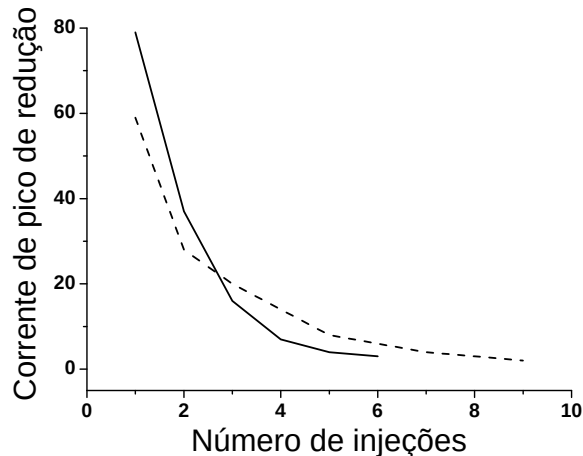


Figura 60: Gráfico de corrente de pico de redução *versus* números de injeções. Eletrodos de grafite (---) submetido a um potencial de redução e (—) sem aplicação de potencial antes da incorporação de enzima.

Após as análises dos dados das figuras 58-60, pode-se afirmar que a modificação do eletrodo de grafite com poli(2-HFA) possibilita a construção de biossensores a base de HRP para serem submetidos a análise em fluxo evitando efeito de lixiviação que é observado nos eletrodos sem modificação.

Resultados e discussão

4.6.3.3 TESTES DE VARIAÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA IMOBILIZADA

Foram realizados ensaios onde foi variada a atividade enzimática imobilizada na superfície do eletrodo modificado com poli(2-HFA). Em todos os experimentos foi acrescentado à solução enzimática BSA de forma que a concentração final fosse de 0,5%. Este teste foi feito com a finalidade de avaliar a melhor quantidade de enzima a ser usada na imobilização na superfície do eletrodo analisando parâmetros de resposta de corrente de pico bem como custo de construção dos sensores.

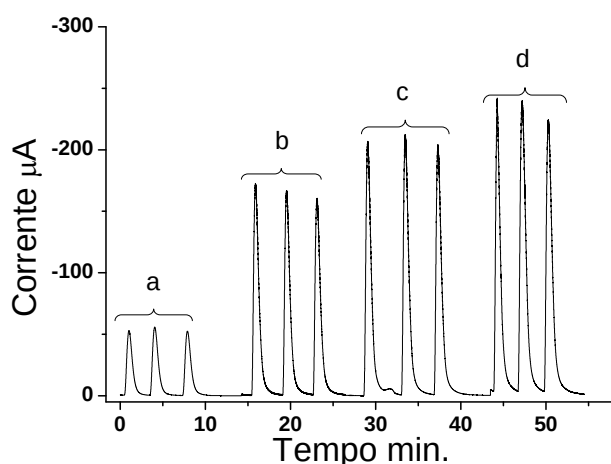


Figura 61: Respostas de corrente de eletrodos de grafite/poli(2-HFA)/HRP com diferentes atividades enzimáticas imobilizadas: a) 5 u; b) 10 u; c) 15 u; d) 20 u. guaiacol $45,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ e H_2O_2 $165,20 \text{ mmol.L}^{-1}$. Solução transportadora: tampão fosfato de potássio $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,5. Vazão: $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$. Volume da alça de amostragem: $200 \mu\text{L}$. Potencial de análise: 0,00V.

Os resultados apresentados na figura 61 foram utilizados para gerar a figura 62. No qual pode-se observar que há uma característica exponencial para a curva, sendo que quando varia a quantidade enzimática de 15 para 20 unidades não há um aumento tão significativo na resposta de corrente de pico de redução quanto ao aumento observado quando se dobra a quantidade de 5 para 10 unidades.

Resultados e discussão

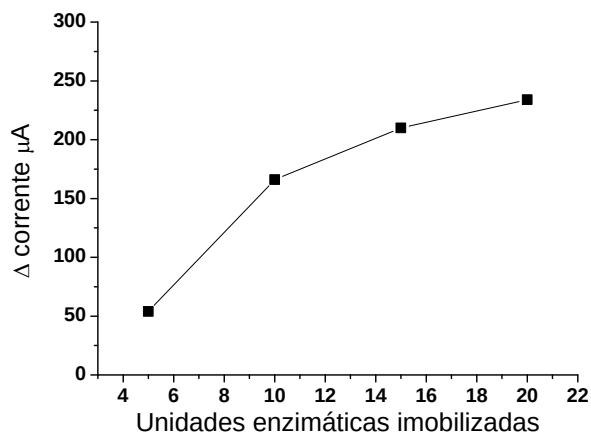


Figura 62: Variação da corrente de pico de redução em função da quantidade de unidades enzimáticas imobilizadas.

É possível observar na figura 62 que há um aumento da resposta de corrente com o aumento da atividade enzimática imobilizada, isso acontece pois há um aumento do número de sítios ativos e uma maior quantidade de guaiacol é catalisada aumentando a resposta de corrente.

Os experimentos contidos neste trabalho foram realizados usando eletrodos modificados com 10 unidades enzimáticas. Esta quantidade foi escolhida com base nos resultados apresentados no experimento acima e pensando também em minimizar os custos da análise usando menos enzima por eletrodo.

4.6.3.4 RESPOSTA DO BIOCSENSOR EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GUAIIACOL

Os biossensores apresentaram um comportamento de resposta em relação à concentração do substrato, característico de uma reação enzimática, portanto foram realizados testes de variação da concentração de guaiacol.

Resultados e discussão

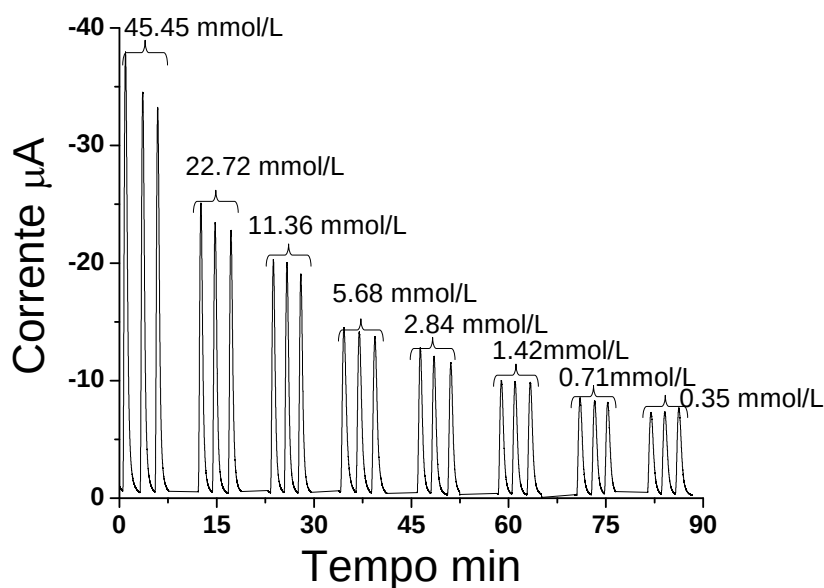


Figura 63: Resposta de corrente para diferentes concentrações de guaiacol (46,56; 22,72; 11,36; 5,68; 2,84; 1,42; 0,71 e 0,36 mmol.L⁻¹ respectivamente), H₂O₂ 165,20 mmol.L⁻¹. Solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L⁻¹, pH 6,5. Vazão: 2,0 mL.min⁻¹. Volume da alça de amostragem: 200 µL. Potencial de análise: 0,00V. 10U de HRP usados na imobilização.

Os dados da figura 63 serviram como base para construir a figura 64. Nesta figura é possível observar que a curva apresenta um aspecto hiperbólico apresentando linearidade para as concentrações mais baixas.

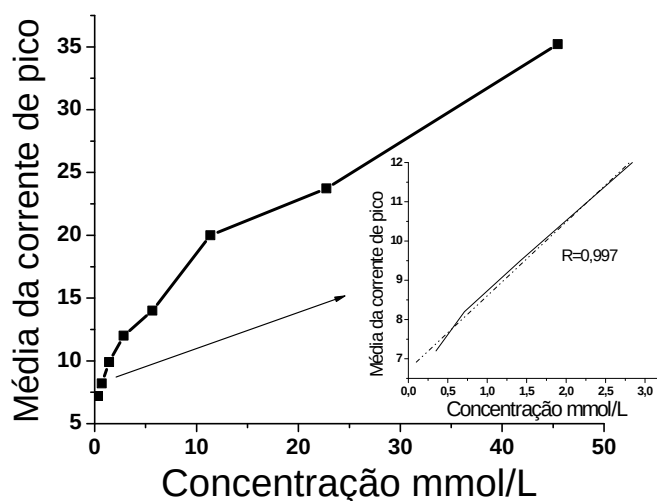


Figura 64: Gráfico de média da corrente de pico de redução versus concentração de guaiacol. Inserto: região linear do gráfico.

Resultados e discussão

Na figura 64 observa-se que para concentrações mais baixas há uma tendência linear e para concentrações mais altas há um aumento significativo nas resposta de corrente de pico de redução. A partir destes dados um experimento abrangendo uma faixa maior de concentração foi feito para que se pudesse analisar melhor o efeito de altas concentrações de guaiacol sobre o biossensor os resultados estão apresentados nas figuras 65 e 66.

4.6.3.5 TESTE DE CURVA DE CALIBRAÇÃO E ANÁLISE DE INTERFERENTE

O biossensor foi submetido à análises utilizando substrato em diferentes concentrações em uma ampla faixa a fim de se obter uma curva de calibração. As concentrações de guaiacol variaram de 0 a 183,2 mmol.L⁻¹ e a concentração de peróxido de hidrogênio foi mantida constante (165 mmol.L⁻¹) com a finalidade de observar somente o efeito da variação de guaiacol como substrato sobre a enzima HRP.

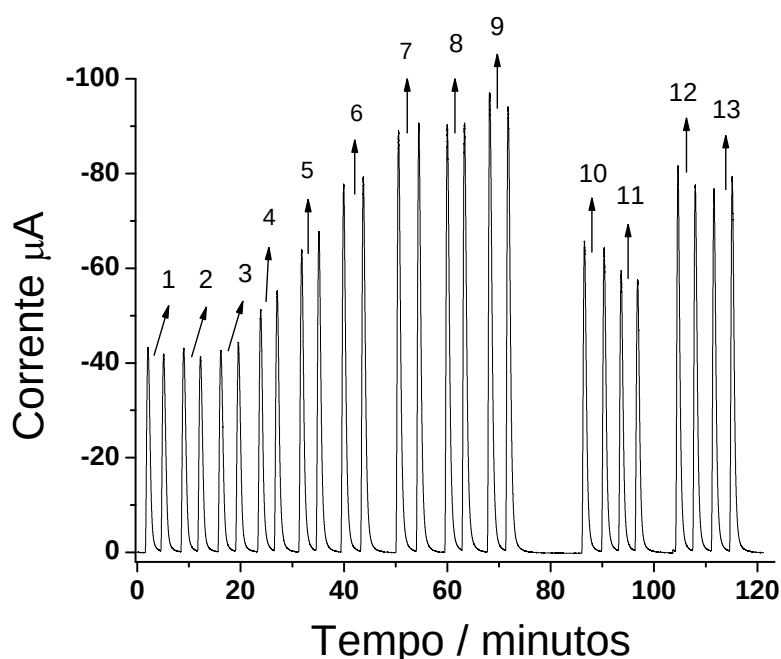


Figura 65: Diagrama de 26 injeções de H₂O₂ 165,2 mmol.L⁻¹ e guaiacol em diferentes concentrações (ver descrição na tabela). Solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L⁻¹, pH 6,5. Vazão: 2,0 mL.min⁻¹. Volume da alça de amostragem: 200 µL. Potencial de análise: 0,00V. 10U de HRP usados na imobilização.

Resultados e discussão

A figura 65 mostra a resposta de corrente de 26 injeções em diferentes concentrações de guaiacol as injeções foram feitas em duplicata conforme descrito na tabela 5.

Tabela 5: Descrição das 26 injeções da figura 65, a concentração de peróxido de hidrogênio foi constante em todas as injeções no valor de $165,2 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Injeções	[Guaiacol] mmol.L^{-1}	[Fenol] mmol.L^{-1}
1	0	-
2	0,46	-
3	2,29	-
4	11,45	-
5	22,9	-
6	45,8	-
7	91,6	-
8	114,5	-
9	183,2	-
10	0	45,8
11	0	-
12	45,8	45,8
13	45,8	-

Uma curva de calibração (figura 66) foi montada com base nos dados obtidos na figura 65.

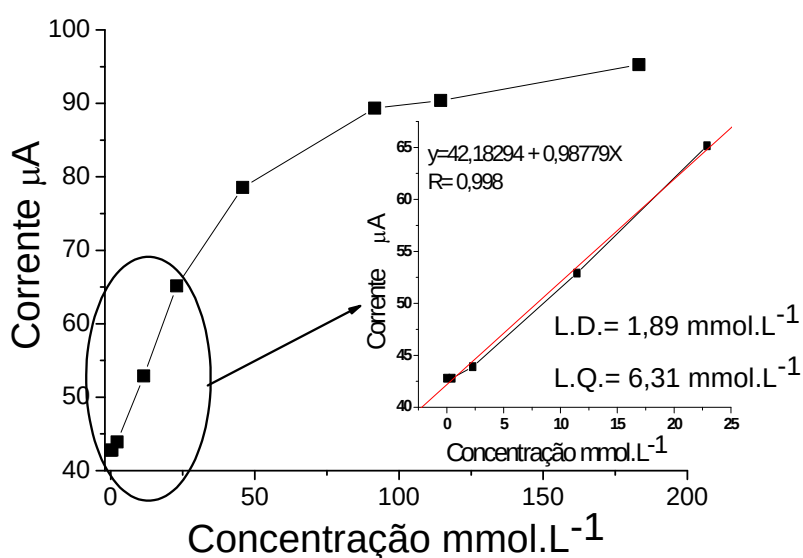


Figura 66: Gráfico de média da corrente de pico de redução *versus* concentração de guaiacol. Curva de calibração. Inserto: região linear da curva de calibração.

Resultados e discussão

É possível observar que há linearidade de resposta numa faixa de concentração de guaiacol que varia de 0 a 45,8 mmol.L⁻¹ e, para concentrações maiores, há uma tendência de estabilização da resposta de corrente, ou seja, para concentrações maiores que 91,6 mmol.L⁻¹ provavelmente há uma saturação dos sítios ativos da enzima impedindo um aumento de resposta de corrente. A saturação acontece porque, à medida que é aumentada a concentração de substrato, aumenta também a quantidade de enzima presente sob a forma de complexo enzima-substrato (ES). Todos os centros ativos estão ocupados (saturados) com substrato, ou seja, não existem sítios ativos livres para o substrato e a concentração de complexo ES é igual à concentração de enzima.

Utilizando este mesmo biossensor foi feito um teste também com o fenol, para avaliar um possível efeito interferente sobre a reação enzimática. Os itens 10 a 13 da figura 65 são os resultados de injeções de fenol + peróxido de hidrogênio, somente peróxido de hidrogênio, fenol + peróxido de hidrogênio + guaiacol, guaiacol + peróxido de hidrogênio respectivamente. Essas combinações foram feitas para avaliar a resposta do biossensor mediante a presença de outro derivado fenólico que não o guaiacol e verificar se haveria interferência de respostas. A tabela 6 mostra os valores de corrente de pico das diversas injeções.

Tabela 6: Valores de corrente de pico em μA de injeções de fenol, peróxido de hidrogênio e guaiacol, a concentração de peróxido de hidrogênio foi constante em todas as injeções no valor de 165,2 mmol.L⁻¹.

Injeções	[Guaiacol] mmol.L ⁻¹	[Fenol] mmol.L ⁻¹	Resposta de corrente μA
10	0	45,8	64,5
11	0	-	58,7
12	45,8	45,8	79,4
13	45,8	-	78,5

Para esse estudo a concentração de fenol escolhida foi de 45,8 mmol.L⁻¹, a mesma concentração usada nas injeções de número 6 (ver figura 65 e tabela 5), esta foi a concentração de guaiacol usada na maior parte dos experimentos, portanto a escolhida para comparação.

É possível observar que quando é injetado somente peróxido de hidrogênio e fenol, o valor da corrente de pico é de 64,5 μA , um valor

Resultados e discussão

aproximado ao obtido na injeção contendo somente peróxido de hidrogênio (58,7 μA), resultado que sugere que as condições experimentais não são tão propícias para a detecção de fenol quanto são para detecção de guaiacol. Uma outra alternativa seria testar os dois substratos (fenol e guaiacol) em uma mesma injeção e em concentrações iguais (nº12 na figura 65 e na tabela 6). O valor de corrente de pico observado foi de 79,4 μA , valor muito próximo ao obtido para injeção de guaiacol sem fenol presente (nº13 na figura 65 e na tabela 6) que foi de 78,5 μA .

Esses resultados sugerem que nas condições experimentais usadas (H_2O_2 165,2 mmol.L^{-1} , solução transportadora: tampão fosfato de potássio 0,10 mol.L^{-1} , pH 6,5. Vazão: 2,0 mL.min^{-1} , volume da alça de amostragem: 200 μL , potencial de análise: 0,00V e 10U de HRP usados na imobilização) não foram eficientes para detectar o fenol tanto quanto para guaiacol. A enzima HRP oxida fenol e derivados, portanto ela é sensível para a reação de oxidação do fenol, mas o potencial de redução escolhido (0 V) não foi o ideal para detectar o produto formado, de acordo com a literatura o potencial usado para detecção do produto de oxidação do fenol é de $\pm 0,3 \text{ V}$ (Rosatto, Freire *et al.*, 2001). Portanto nessas condições testadas o fenol não interferiu nas respostas de detecção do guaiacol.

4.6.3.6 TEMPO DE VIDA DO BIOSENSOR

O tempo de vida do biossensor grafite/poli(2-HFA)/HRP foi avaliado para uma atividade enzimática de 10U, durante um período de quarenta e sessenta dias, injetando em triplicata solução de guaiacol 45,8 mmol L^{-1} e peróxido de hidrogênio 165 mmol L^{-1} , e a resposta de corrente do biossensor foi observada. Entre uma avaliação e outra, o eletrodo foi armazenado em solução tampão fosfato pH 6,5, no freezer (-12°C) até a próxima avaliação.

Resultados e discussão

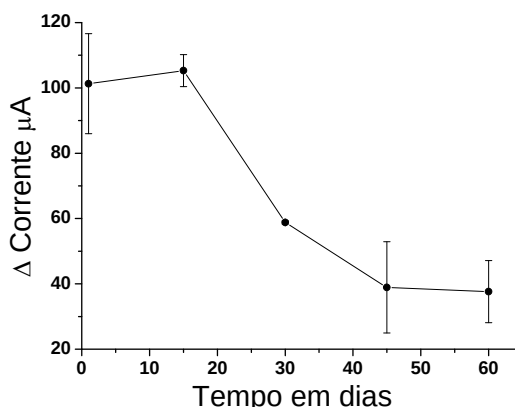


Figura 67: Gráfico variação da corrente de pico de redução em função do tempo em dias de armazenamento.

Tabela 7: Valores de corrente de pico em μA de injeções de peróxido de hidrogênio e guaiacol em função do tempo de armazenamento. Média e desvio padrão para as três amostras analisadas

Eletrodo	Corrente μA					Perda de resposta %
	1º dia	15º dia	30º dia	45º dia	60º dia	
1	114	103	58,4	49,3	44,2	61,2
2	87	111	58,7	23	26,7	69,3
3	103	102	59,3	44,5	42,0	59,2
Média	101,3	105,3	58,8	38,9	37,6	62,8
Desvio padrão	13,5	4,9	0,47	14,0	9,5	—

A figura 66 mostra os resultados de resposta relativa do biossensor em função do tempo de armazenamento em dias (os experimentos foram feitos em triplicata). Decorridos os primeiros quinze dias o biossensor se manteve estável. Uma queda pronunciada de resposta de corrente acontece após trinta dias de armazenamento 42%. Do trigésimo dia em diante a queda de resposta de corrente é mais sutil. Ao final de sessenta dias a queda observada foi de 62,8. Esta diminuição na resposta do biossensor pode ser atribuída à baixa atividade enzimática imobilizada em relação à concentração de cloreto de guaiacol $45,8 \text{ mmol L}^{-1}$. Esta concentração de substrato foi usada para garantir que todos os sítios ativos estejam saturados. Além deste fato, pode estar ocorrendo a desativação da enzima imobilizada devido a utilização repetitiva

Resultados e discussão

para análises causando exaustão do biossensor, o que pode provocar uma diminuição da resposta amperométrica.

O biossensor foi estável por um período de duas semanas resultado semelhante ao encontrado na literatura (Rosatto, Freire *et al.*, 2001).

4.6.3.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO BIOSSENSOR FRENTE A UM NOVO SUBSTRATO (PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO)

Além de usar o guaiacol, derivado fenólico, como substrato escolhido, foi feito um teste paralelo (figura 68) no qual foram feitas injeções contendo somente peróxido de hidrogênio, que serviu como molécula aceitadora de elétrons (como em todos os experimentos anteriores) e também como substrato.

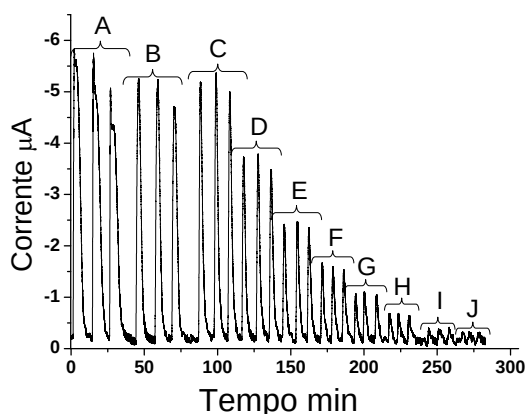


Figura 68: Diagrama de 30 injeções de diferentes concentrações de H_2O_2 (A - 665,06; B - 327,68; C - 161,30; D - 80,45; E - 39,67; F - 19,50; G - 9,49; H - 4,62; I - 2,28 e J - 1,31 mmol.L^{-1} respectivamente). Solução transportadora: tampão fosfato de potássio $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,5. Vazão: $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$. Volume da alça de amostragem: $200 \text{ }\mu\text{L}$. Potencial de análise: $0,00\text{V}$.

Os resultados obtidos foram muito importantes, pois além de ser usado para detecção de variação da concentração de guaiacol, o mesmo biossensor pode ser usado também para detecção variação de concentração de peróxido de hidrogênio.

Resultados e discussão

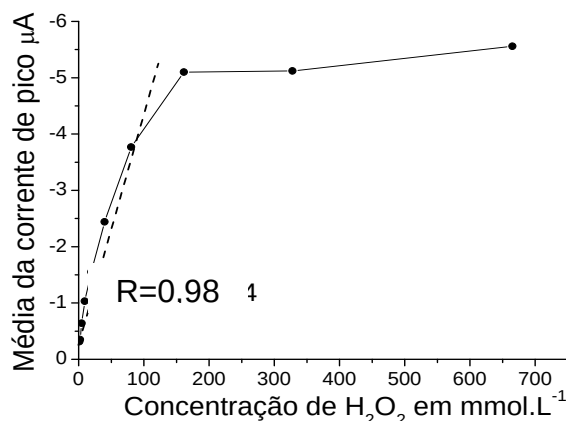


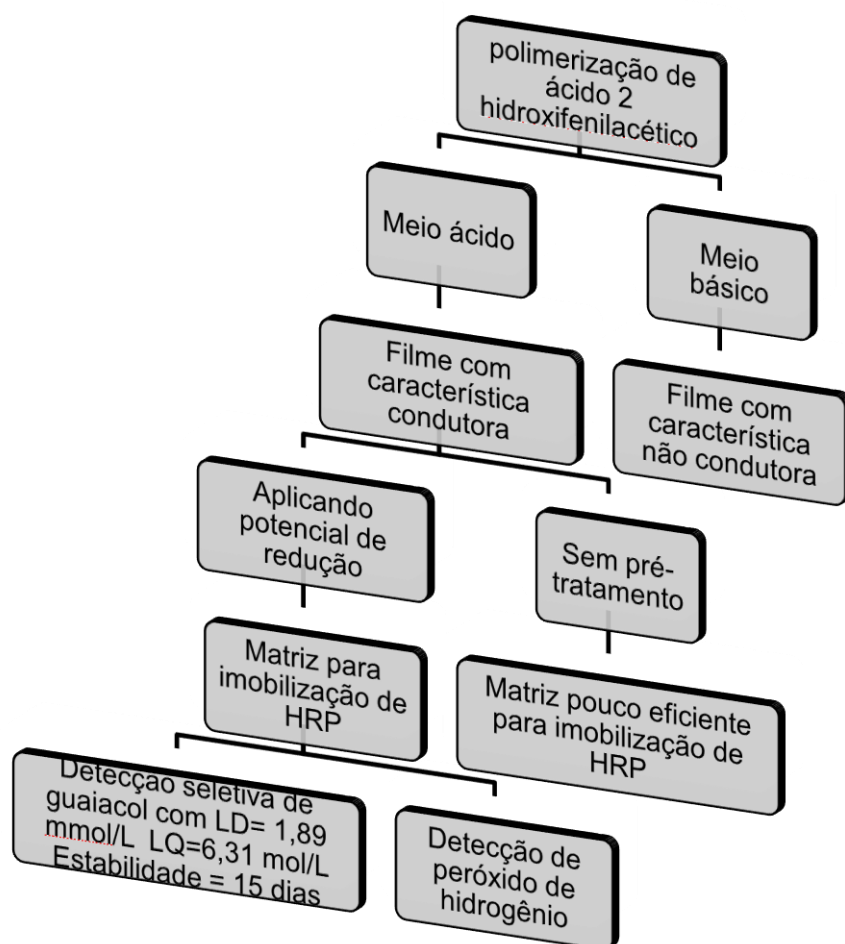
Figura 69: Gráfico de média da corrente de pico de redução em função da concentração de peróxido de hidrogênio.

Para concentrações mais baixas (1,31 a 80,45 mmol.L⁻¹) o sensor responde de forma linear ($R=0,986$) e partir de 161,3 mmol.L⁻¹ há uma tendência de saturação dos sítios ativos da enzima impedindo um aumento de resposta de corrente.

Estes resultados são muito importante pois a partir deles é possível afirmar que o biossensor proposto pode ser usado tanto na análise de derivados fenólicos quanto em análises de peróxido de hidrogênio.

A determinação de peróxido de hidrogênio é de grande importância não apenas porque é o produto de reações catalisadas por uma série de enzimas oxirredutases, mas também é um composto essencial na indústria farmacêutica, alimentícia e em análise ambiental. Biossensores amperométricos baseados em enzimas têm interesse considerável, porque combinam a especificidade da enzima como sensibilidade e praticidade das técnicas eletroanalíticas em um formato compacto para facilitar a análise (Safavi e Farjami, ; Qi, Zhang *et al.*, 2006; Jia, Lian *et al.*, 2009; Wang, Li *et al.*, 2009). Em adição ao controle da poluição, muitas vezes com ênfase ao monitoramento ambiental, o peróxido de hidrogênio é empregado nos processos de branqueamento nas indústrias têxtil, de papel e celulose (Mattos, Shiraishi *et al.*, 2003).

4.7 ESQUEMA RESUMIDO DOS RESULTADOS OBTIDOS



5. CONCLUSÕES

Conclusões

Estudos de modificação da superfície de eletrodos de com poli(2-HFA), mostraram que em todas as condições experimentais testadas houve a formação de material polimérico na superfície do eletrodo.

Observou-se aumento na resposta de corrente, bem como aumento de área relativa aos picos de oxi-redução, sugerindo formação de um filme polimérico com maior área superficial para o eletrodo modificado com 2-HFA formado a 20 mV.s^{-1} , se comparado aos outros filmes formados em diferentes velocidades de varredura.

Análises indicam que a preparação do polímero em meio ácido favorece a formação de um material com características condutoras. Os filmes poliméricos formados a partir de diferentes valores de pH apresentam dois picos de oxidação e dois de redução, resultado comum a todos os estudos realizados

As análises piezelétricas indicam que durante a preparação do polímero em meio ácido ocorre um aumento linear de massa chegando num valor de 477,60 ng ao final de 20 varreduras de potencial.

O poli(2-HFA) bem como o 2-HFA apresentam alta intensidade de fluorescência, e ocorre um deslocamento batocrômico quando compara-se o monômero ao polímero, resultado de indica a formação de uma cadeia polimérica com grande extensão de conjugação.

O poli(2-HFA) mostrou-se uma ótima matriz para imobilização HRP, pois os eletrodos que não continham filme polimérico não retiveram a enzima durante as análises em fluxo, já os eletrodos modificados foram estáveis por mais de vinte injeções.

Para a imobilização de HRP é necessário submeter o eletrodo a um potencial de redução para melhorar a resposta de incorporação e evitar a lixiviação.

O eletrodo modificado com poli(2-HFA)/HRP respondeu bem a variação da concentração de guaiacol e os resultados mostraram que este biossensor pode ser usado também em análises de peróxido de hidrogênio além de análises de derivados fenólicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

- 1) Adeloju, S. B., S. J. Shaw, *et al.* Polypyrrole-based amperometric flow injection biosensor for urea. Analytica Chimica Acta, v.323, n.1-3, p.107-113. 1996.
- 2) Adhikari, B.; Majumdar, S. Polymers in sensor applications. Progress in Polymer Science, v.29, n.7, p.699-766. 2004.
- 3) Agostinho, S. M. L., R. F. V. Villamil, *et al.* O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. Química Nova, v.27, p.813-817. 2004.
- 4) Ahuja, T., I. A. Mir, *et al.* Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. Biomaterials, v.28, n.5, p.791-805. 2007.
- 5) Albareda-Sirvent, M., A. Merkoçi, *et al.* Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. Sensors and Actuators B: Chemical, v.69, n.1-2, p.153-163. 2000.
- 6) Andreescu, S., J. Njagi, *et al.* Nanostructured materials for enzyme immobilization and biosensors. In: (Ed.). The New Frontiers of Organic and Composite Nanotechnology. Amsterdam: Elsevier, 2008. Nanostructured materials for enzyme immobilization and biosensors, p.355-394
- 7) Ates, M.; A. S. Sarac. Conducting polymer coated carbon surfaces and biosensor applications. Progress in Organic Coatings, v.66, n.4, p.337-358. 2009.
- 8) Bard, A. J. F. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications New York: Wiley. 2000
- 9) Barnett, N. W., C. E. Lenehan, *et al.* Sequential injection analysis: an alternative approach to process analytical chemistry. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v.18, n.5, p.346-353. 1999.
- 10) Barlett, P. N. e J. M. Cooper. A review of the immobilization of enzymes in electropolymerized films. Journal of Electroanalytical Chemistry, v.362, n.1-2, p.1-12. 1993.
- 11) Barsan, M. M. e C. M. A. Brett. A new modified conducting carbon composite electrode as sensor for ascorbate and biosensor for glucose. Bioelectrochemistry, v.76, n.1-2, p.135-140. 2009.

Referências bibliográficas

- 12) Bhadra, S., D. Khastgir, *et al.* Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. Progress in Polymer Science, v.34, n.8, p.783-810. 2009.
- 13) Biallozor, S. e A. Kupniewska. Conducting polymers electrodeposited on active metals. Synthetic Metals, v.155, n.3, p.443-449. 2005.
- 14) Bogdanovskaya, V. A., M. R. Tarasevich. Electrochemical biosensors for medicine and ecology. Biosensors and Bioelectronics, v.11, n.9, p.853-861. 1996.
- 15) Brett, A. M. O. Eletroquímica Princípios Métodos e Aplicações Coimbra. 1996
- 16) Brito-Madurro, A. G., L. F. Ferreira, *et al.* Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix. Journal of Materials Science, v.42, n.9, p.3238-3243. 2007.
- 17) Bronnikova, T. V., W. M. Schaffer, *et al.* Nonlinear Dynamics of the Peroxidase-Oxidase Reaction: I. Bistability and Bursting Oscillations at Low Enzyme Concentrations. The Journal of Physical Chemistry B, v.105, n.1, p.310-321. 2000.
- 18) Campanella, L., K. Pyrzynska, *et al.* Chemical speciation by flow-injection analysis. A review. Talanta, v.43, n.6, p.825-838. 1996.
- 19) Chen, J., A. K. Burrell, *et al.* Preparation, characterisation and biosensor application of conducting polymers based on ferrocene substituted thiophene and terthiophene. Electrochimica Acta, v.47, n.17, p.2715-2724. 2002.
- 20) Chen, C.-Y., I. Karube. Biosensors and flow injection analysis. Current Opinion in Biotechnology, v.3, n.1, p.31-39. 1992.
- 21) Christian, G. D. Flow analysis and its role and importance in the analytical sciences. Analytica Chimica Acta, v.499, n.1-2, p.5-8. 2003.
- 22) Conroy, P. J., S. Hearty, *et al.* Antibody production, design and use for biosensor-based applications. Seminars in Cell & Developmental Biology, v.20, n.1, p.10-26. 2009.
- 23) Curulli, A., S. Kelly, *et al.* A new interference-free lysine biosensor using a non-conducting polymer film. Biosensors and Bioelectronics, v.13, n.12, p.1245-1250. 1998.

Referências bibliográficas

- 24) D'orazio, P. Biosensors in clinical chemistry. Clinica Chimica Acta, v.334, n.1-2, p.41-69. 2003.
- 25) D'souza, S. F. Microbial biosensors. Biosensors and Bioelectronics, v.16, n.6, p.337-353. 2001.
- 26) Davis, J., D. Huw Vaughan, *et al.* Elements of biosensor construction. Enzyme and Microbial Technology, v.17, n.12, p.1030-1035. 1995.
- 27) De Castro, C. M., S. N. Vieira, *et al.* Electrochemical and morphologic studies of nickel incorporation on graphite electrodes modified with polytyramine. Journal of Materials Science, v.43, n.2, p.475-482. 2008.
- 28) De La Escosura-Muñiz, A., A. Ambrosi, *et al.* Electrochemical analysis with nanoparticle-based biosystems. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v.27, n.7, p.568-584. 2008.
- 29) Dennison, M. J. e A. P. F. Turner. Biosensors for environmental monitoring. Biotechnology Advances, v.13, n.1, p.1-12. 1995.
- 30) Diaz, A. F. e J. A. Logan. Electroactive polyaniline films. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, v.111, n.1, p.111-114. 1980.
- 31) Diaz, A. F. e K. K. Kanazawa. Electrochemical Polymerization of Pyrrole. J.C.S. CHEM. COMM, p.635, 636. 1979.
- 32) Diaz, A., J. M. V. Vallejo, *et al.* [Pt]polypyrrole: a new organic electrode material. IBM J. Res. Dev., v.25, n.1, p.42-50. 1981.
- 33) Douglas Skoog, D. W., James Holler, Stanley Crouch. Fundamentos da Química Analítica São Paulo. 2005. 1124 p.
- 34) Dzyadevych, S. V., V. N. Arkhypova, *et al.* Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. IRBM, v.29, n.2-3, p.171-180. 2008.
- 35) Eftekhari, A. Electropolymerization of aniline onto passivated substrate and its application for preparation of enzyme-modified electrode. Synthetic Metals, v.145, n.2-3, p.211-216. 2004.
- 36) Ferreira, L. F., J. F. C. Boodts, *et al.* Gold electrodes modified with poly (4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide. Polymer International, v.57, n.4, p.644-650. 2008.
- 37) Franco, D. L., A. S. Afonso, *et al.* Electrodes modified with polyaminophenols: Immobilization of purines and pyrimidines. Polymer Engineering and Science, v.48, n.10, p.2043-2050. 2008.

Referências bibliográficas

- 38) Franco, D. L., A. S. Afonso, *et al.*. Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties. Materials Chemistry and Physics, v.107, n.2-3, p.404-409. 2008.
- 39) Frank, B. K. Pi-donor intercalate polymers: synthesis, charge-transfer interactions, and applications. IBM J. Res. Dev., v.25, n.4, p.303-314. 1981.
- 40) Freger, V. e S. Bason. Characterization of ion transport in thin films using electrochemical impedance spectroscopy: I. Principles and theory. Journal of Membrane Science, v.302, n.1-2, p.1-9. 2007.
- 41) Freire, R. S., N. Durán, *et al.* Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.13, p.456-462. 2002.
- 42) Gallignani, M. e M. D. R. Brunetto. Infrared detection in flow analysis -- developments and trends (review). Talanta, v.64, n.5, p.1127-1146. 2004.
- 43) García-Aljaro, C., M. A. Bangar, *et al.* Conducting polymer nanowire-based chemiresistive biosensor for the detection of bacterial spores. Biosensors and Bioelectronics, v.25, n.10, p.2309-2312. 2010.
- 44) Garcia, D. E., T.-H. Chen, *et al.* A Parametric Design Study of an Electrochemical Sensor. Journal of the Association for Laboratory Automation, v.15, n.3, p.179-188. 2010.
- 45) Gaspar, S., K. Habermüller, *et al.* Hydrogen peroxide sensitive biosensor based on plant peroxidases entrapped in Os-modified polypyrrole films. Sensors and Actuators B: Chemical, v.72, n.1, p.63-68. 2001.
- 46) Gerard, M., A. Chaubey, *et al.* Application of conducting polymers to biosensors. Biosensors and Bioelectronics, v.17, n.5, p.345-359. 2002.
- 47) Girotto, E. M. e M.-A. De Paoli. Transporte de massa em polímeros intrinsecamente condutores: importância, técnicas e modelos teóricos. Química Nova, v.22, p.358-368. 1999.
- 48) Guan, J.-G., Y.-Q. Miao, *et al.* Impedimetric biosensors. Journal of Bioscience and Bioengineering, v.97, n.4, p.219-226. 2004.
- 49) Guimard, N. K., N. Gomez, *et al.* Conducting polymers in biomedical engineering. Progress in Polymer Science, v.32, n.8-9, p.876-921. 2007.
- 50) Haccoun, J., B. Piro, *et al.* The development of a reagentless lactate biosensor based on a novel conducting polymer. Bioelectrochemistry, v.68, n.2, p.218-226. 2006.

Referências bibliográficas

- 51)Hafaid, I., S. Chebil, *et al.* Effect of electrical conditions on an impedimetric immunosensor based on a modified conducting polypyrrole. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 144, n.1, p. 323-331. 2010.
- 52)Hajjizadeh, M., A. Jabbari, *et al.* Electrocatalytic oxidation and determination of deferasirox and deferiprone on a nickel oxyhydroxide-modified electrode. Analytical Biochemistry, v.373, n.2, p.337-348. 2008.
- 53)Han, D., X. Qiu, *et al.* Electropolymerization of polypyrrole on PFIL-PSS-modified electrodes without added support electrolytes. Journal of Electroanalytical Chemistry, v.596, n.1, p.33-37. 2006.
- 54)Hansen, E. H. Flow injection analysis: A complementary or alternative concept to biosensors. Talanta, v.41, n.6, p.939-948. 1994.
- 55)Harwood, G. W. J. e C. W. Pouton. Amperometric enzyme biosensors for the analysis of drugs and metabolites. Advanced Drug Delivery Reviews, v.18, n.2, p.163-191. 1996.
- 56)Hu, S., Q. Lu, *et al.* Biosensors based on direct electron transfer of protein. In: (Ed.). Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications. San Diego: Academic Press, 2008. Biosensors based on direct electron transfer of protein, p.531-581
- 57)Huang, K.-J., C.-X. Xu, *et al.* Electrochemical behavior and voltammetric determination of tryptophan based on 4-aminobenzoic acid polymer film modified glassy carbon electrode. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.74, n.1, p.167-171. 2009.
- 58)Iolanda Da Cruz Vieira, O. F.-F. Flow injection spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using a crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*) as a source of peroxidase. The Analyst, v.123, p.1809-1812. 1998.
- 59)[IUPAC]Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. 2009. <http://www.iupac.org/publications/pac/71/12/2333/> acessado em 03/01/2011.
- 60)Jia, N., Q. Lian, *et al.* A hydrogen peroxide biosensor based on direct electrochemistry of hemoglobin incorporated in PEO-PPO-PEO triblock copolymer film. Sensors and Actuators B: Chemical, v.137, n.1, p.230-234. 2009.

Referências bibliográficas

- 61)Joachim, B., M. Shamsheer, *et al.* Electrochemical synthesis of electrically conducting polymers from aromatic compounds. IBM J. Res. Dev., v.27, n.4, p.330-341. 1983.
- 62)Kappes, T., B. Galliker, *et al.* Portable capillary electrophoresis instrument with amperometric, potentiometric and conductometric detection. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v.20, n.3, p.133-139. 2001.
- 63)Kaya, I. e F. Baycan. Synthesis, characterization, conductivity, band gap and thermal analysis of poly-2-[(4-mercaptophenyl) imino methyl] phenol and some of its polymer-metal complexes. Synthetic Metals, v.157, n.16-17, p.659-669. 2007.
- 64)Kisza, A. The capacitance of the diffuse layer of electric double layer of electrodes in molten salts. Electrochimica Acta, v.51, n.11, p.2315-2321. 2006.
- 65)Ko, J. M., D. Y. Park, *et al.* Electrodeposited conducting polymer-magnetic metal composite films. Synthetic Metals, v.128, n.1, p.47-50. 2002.
- 66)Krohn, K. A. e J. M. Link. Interpreting enzyme and receptor kinetics: keeping it simple, but not too simple. Nuclear Medicine and Biology, v.30, n.8, p.819-826. 2003.
- 67)Kummer, U., K. R. Valeur, *et al.* Oscillations in the peroxidase-oxidase reaction: a comparison of different peroxidases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, v.1289, n.3, p.397-403. 1996.
- 68)Lakard, B., G. Herlem, *et al.* Electrochemical polymerization of 1,2-ethanedithiol as a new way to synthesize polyethylenedisulfide. Polymer, v.49, n.7, p.1743-1747. 2008.
- 69)Lei, Y., W. Chen, *et al.* Microbial biosensors. Analytica Chimica Acta, v.568, n.1-2, p.200-210. 2006.
- 70)Liu, A., I. Honma, *et al.* Amperometric biosensor based on tyrosinase-conjugated polysaccharide hybrid film: Selective determination of nanomolar neurotransmitters metabolite of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in biological fluid. Biosensors and Bioelectronics, v.21, n.5, p.809-816. 2005.
- 71)Liu, G.-K., B. Ren, *et al.* Electrochemical polymerization of acetylene on Rh electrodes probed by surface-enhanced Raman spectroscopy. Journal of Electroanalytical Chemistry, v.594, n.2, p.73-79. 2006.

Referências bibliográficas

- 72) Loretta Jones, P. A. PRINCÍPIOS DE QUÍMICA - QUESTIONANDO A VIDA MODERNA E O MEIO AMBIENTE. São Paulo. 2006
- 73) Lüdi, H., M. B. Garn, *et al.* Flow injection analysis and in-line biosensors for bioprocess control: a comparison. Journal of Biotechnology, v.25, n.1-2, p.75-80. 1992.
- 74) Luo, X., A. J. Killard, *et al.* Enhancement of a conducting polymer-based biosensor using carbon nanotube-doped polyaniline. Analytica Chimica Acta, v.575, n.1, p.39-44. 2006.
- 75) Luong, J. H. T., K. B. Male, *et al.* Biosensor technology: Technology push versus market pull. Biotechnology Advances, v.26, n.5, p.492-500. 2008.
- 76) MacDiarmid, A. G. Synthetic metals: a novel role for organic polymers. Synthetic Metals, v.125, n.1, p.11-22. 2001.
- 77) MacDiarmid, A. G., H. Shirakawa, *et al.* Electrical Conductivity in Doped Polyacetylene. Physical Review Letters, v.39, n.17, p.1098. 1977.
- 78) Magalhães, L. M., M. Lúcio, *et al.* Automatic flow injection based methodologies for determination of scavenging capacity against biologically relevant reactive species of oxygen and nitrogen. Talanta, v.78, n.4-5, p.1219-1226. 2009.
- 79) Maioli, O. V. L. G., J. M. Santos, *et al.* Parâmetros bioquímicos foliares das espécies *Licania tomentosa* (Benth.) e *Bauhinia forficata* (Link.) para avaliação da qualidade do ar. Química Nova, v.31, p.1925-1932. 2008.
- 80) Malinauskas, A., R. Garjonyte, *et al.* Electrochemical response of ascorbic acid at conducting and electrogenerated polymer modified electrodes for electroanalytical applications: a review. Talanta, v.64, n.1, p.121-129. 2004.
- 81) Marques, P. R. B. D. O. e H. Yamanaka. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. Química Nova, v.31, p.1791-1799. 2008.
- 82) Mattos, I. L. D., K. A. Shiraishi, *et al.* Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. Química Nova, v.26, p.373-380. 2003.
- 83) Mello, L. D. e L. T. Kubota. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. Food Chemistry, v.77, n.2, p.237-256. 2002.
- 84) Mello, L. D. e L. T. Kubota. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. Talanta, v.72, n.2, p.335-348. 2007.

Referências bibliográficas

- 85) Mervartová, K., M. Polásek, *et al.* Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.45, n.3, p.367-381. 2007.
- 86) Mesquita, R. B. R. e A. O. S. S. Rangel. A review on sequential injection methods for water analysis. Analytica Chimica Acta, v.648, n.1, p.7-22. 2009.
- 87) Michaelis, L. e M. L. Menten. Die kinetik der invertinwirkung. Biochem. Z., v.49, p.333. 1913.
- 88) Milena Jadrijevic-Mladar Takac, D. V. T. FT-IR and NMR spectroscopic studies of salicylic acid derivatives. II. Comparison of 2-hydroxy- and 2,4- and 2,5-dihydroxy derivatives. Acta Pharmaceutica, v.54, p.177-191. 2004.
- 89) Mohan, S. e R. Prakash. Functionalization of conducting polymer with novel Co(II) complex: Electroanalysis of ascorbic acid. Materials Science and Engineering: C, v.30, n.5, p.781-787. 2010.
- 90) Moreno-Cid, A., M. C. Yebra, *et al.* Flow injection determinations of citric acid: a review. Talanta, v.63, n.3, p.509-514. 2004.
- 91) Mousty, C. Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes-- new trends. Applied Clay Science, v.27, n.3-4, p.159-177. 2004.
- 92) Muñoz, E., M. A. Heras, *et al.* Electropolymerization of aniline on polyaniline-modified electrodes under hydrodynamic conditions. Electrochimica Acta, v.52, n.14, p.4778-4783. 2007.
- 93) Murray, R. W., P. R. Moses, *et al.* Chemically modified tin oxide electrode. Analytical Chemistry, v.47, n.12, p.1882-1886. 1975.
- 94) Myland, J. C. e K. B. Oldham. How does the double layer at a disk electrode charge? Journal of Electroanalytical Chemistry, v.575, n.1, p.81-93. 2005.
- 95) Nagels, L. J. e E. Staes. Polymer (bio)materials design for amperometric detection in LC and FIA. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v.20, n.4, p.178-185. 2001.
- 96) Naves, A. F. Estudo da adsorção de horseradish peroxidase (HRP) sobre superfícies planas e de sua atividade catalítica. Instituto de Química, USP, São Paulo, 2008.

Referências bibliográficas

- 97) Ojani, R., J.-B. Raoof, *et al.* Electrocatalytic oxidation of some carbohydrates by poly(1-naphthylamine)/nickel modified carbon paste electrode. Journal of Electroanalytical Chemistry, v.571, n.1, p.1-8. 2004.
- 98) Oliveira, I. S. R. W. Z. D. e I. C. Vieira. Construção aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. Química Nova, v.29, p.932-939. 2006.
- 99) Oliveira, R. M. L., S. N. Vieira, *et al.* Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization. Journal of Materials Science, v.45, n.2, p.475-482. 2010.
- 100) Oni, J., N. Diab, *et al.* Metallophthalocyanine-modified glassy carbon electrodes: effects of film formation conditions on electrocatalytic activity towards the oxidation of nitric oxide. Sensors and Actuators B: Chemical, v.105, n.2, p.208-213. 2005.
- 101) Osborne, B. G. e J. F. Tyson. Review: Flow injection analysis—a new technique for food and beverage analysis. International Journal of Food Science & Technology, v.23, n.6, p.541-554. 1988.
- 102) Özalp-Yaman, S., M. Bastürkmen, *et al.* Simultaneous novel synthesis of conducting and non-conducting halogenated polymers by electroinitiation of (2,4,6-trichloro- or 2,6-dichlorophenolato)Ni(II) complexes. Polymer, v.46, n.18, p.6786-6796. 2005.
- 103) Oliveira, I. S. R. W. Z. D. e I. C. Vieira. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. Química Nova, v.29, p.932-939. 2006.
- 104) Paiva, A. L., V. M. Balcão, *et al.* Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases[small star, filled]. Enzyme and Microbial Technology, v.27, n.3-5, p.187-204. 2000.
- 105) Palmisano, F., D. Centonze, *et al.* An interference-free biosensor based on glucose oxidase electrochemically immobilized in a non-conducting poly(pyrrole) film for continuous subcutaneous monitoring of glucose through microdialysis sampling. Biosensors and Bioelectronics, v.8, n.9-10, p.393-399. 1993.

Referências bibliográficas

- 106) Pan, D., J. Chen, *et al.* Amperometric glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized o-aminophenol film at copper-modified gold electrode. Sensors and Actuators B: Chemical, v.104, n.1, p.68-74. 2005.
- 107) Paoli, M. A. D. e R. A. Zoppi. Aplicações tecnológicas de polímeros intrinsecamente condutores: Perspectivas atuais. Química Nova, v.16, n.6, p.560, 569. 1993.
- 108) Pavia D. L., L. G. M., Kriz G. S. In Introduction to Spectroscopy—A Guide for Students of Organic Chemistry. Philadelphia: Harcourt Brace College Publishers. 1996
- 109) Pedrotti, J. J., L. Angnes, *et al.* Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. Electroanalysis, v.8, p.673-675. 1996.
- 110) Peng, H., L. Zhang, *et al.* Conducting polymers for electrochemical DNA sensing. Biomaterials, v.30, n.11, p.2132-2148. 2009.
- 111) Pereira, A. C. S., A. D. S. Santos, *et al.* Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. Química Nova, v.25, p.1012-1021. 2002.
- 112) Pimentel, A.S. Cinética não-isotérmica na análise térmica de sólidos. Química Nova, v.21, n.3, 03/09/1997, p.4. 1997.
- 113) Pron, A. e P. Rannou. Processible conjugated polymers: from organic semiconductors to organic metals and superconductors. Progress in Polymer Science, v.27, n.1, p.135-190. 2002.
- 114) Qi, H., C. Zhang, *et al.* Amperometric third-generation hydrogen peroxide biosensor incorporating multiwall carbon nanotubes and hemoglobin. Sensors and Actuators B: Chemical, v.114, n.1, p.364-370. 2006.
- 115) Rahman, M. A., D.-S. Park, *et al.* The biosensor based on the pyruvate oxidase modified conducting polymer for phosphate ions determinations. Biosensors and Bioelectronics, v.21, n.7, p.1116-1124. 2006.
- 116) Rajesh, V. Bisht, *et al.* Development of a potentiometric urea biosensor based on copolymer poly(N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film. Reactive and Functional Polymers, v.62, n.1, p.51-59. 2005.
- 117) Rajesh e K. Kaneto. A new tyrosinase biosensor based on covalent immobilization of enzyme on N-(3-aminopropyl) pyrrole polymer film. Current Applied Physics, v.5, n.2, p.178-183. 2005.

Referências bibliográficas

- 118) Ramanavicius, A., A. Ramanaviciene, *et al.* Electrochemical sensors based on conducting polymer--polypyrrole. Electrochimica Acta, v.51, n.27, p.6025-6037. 2006.
- 119) Reis, B. F. D. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. Química Nova, v.19, n.1, p.51, 58. 1996.
- 120) Schmidt, H. L. Biosensors and Flow Injection Analysis in Bioprocess Control. Journal of Biotechnology, v.31, n.3, p.v-vi. 1993.
- 121) Ricci, F. e G. Palleschi. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. Biosensors and Bioelectronics, v.21, n.3, p.389-407. 2005.
- 122) Riess, I. Polymeric mixed ionic electronic conductors. Solid State Ionics, v.136-137, p.1119-1130. 2000.
- 123) Rosatto, S. S., R. S. Freire, *et al.* Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. Química Nova, v.24, p.77-86. 2001.
- 124) Ruzgas, T., E. Csöregi, *et al.* Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. Analytica Chimica Acta, v.330, n.2-3, p.123-138. 1996.
- 125) Ruiz-Medina, A. e E. J. Llorent-Martínez. Recent progress of flow-through optosensing in clinical and pharmaceutical analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.In Press, Corrected Proof.
- 126) Ruzicka, J. e E. H. Hansen. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. Analytica Chimica Acta, v.78, n.1, p.145-157. 1975.
- 127) Ruzicka, J. e E. H. Hansen. Retro-review of flow-injection analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v.27, n.5, p.390-393. 2008.
- 128) Sahin, Y., K. Pekmez, *et al.* Electrochemical polymerization of acetylene with copper catalyst on platinum and copper electrodes. Synthetic Metals, v.129, n.2, p.117-121. 2002.
- 129) Safavi, A. e F. Farjami. Hydrogen peroxide biosensor based on a myoglobin/hydrophilic room temperature ionic liquid film. Analytical Biochemistry, v.402, n.1, p.20-25.
- 130) Saurina, J. e S. Hernández-Cassou. Quantitative determinations in conventional flow injection analysis based on different chemometric

Referências bibliográficas

- calibration strategies: a review. Analytica Chimica Acta, v.438, n.1-2, p.335-352. 2001.
- 131) Scheller, F. W., U. Wollenberger, *et al.* Research and development in biosensors. Current Opinion in Biotechnology, v.12, n.1, p.35-40. 2001.
- 132) Schultze, J. W., T. Morgenstern, *et al.* Microstructuring of conducting polymers. Electrochimica Acta, v.44, n.12, p.1847-1864. 1999.
- 133) Scrosati, B. Applications of Electroactive Polymers. London: Chapman & Hall. 1993. 32 p.
- 134) Silva, F. B., S. N. Vieira, *et al.* Electrochemical investigation of oligonucleotide-DNA hybridization on poly(4-methoxyphenethylamine). International Journal of Molecular Sciences, v.9, n.7, p.1173-1187. 2008.
- 135) Silva, T. A. R., L. F. Ferreira, *et al.* Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): A new material for immobilization of biomolecules. Polymer Engineering and Science, v.48, n.10, p.1963-1970. 2008.
- 136) Silva, T. A. R., L. F. Ferreira, *et al.* New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid). Materials Science and Engineering: C, v.29, n.2, p.539-545. 2009.
- 137) Silverstein, R. M. B., G. C.; Morrill, T.C. . In Spectrometric Identification of Organic Compounds. New York: Wiley. 1991
- 138) Silvestre, C. I. C., J. L. M. Santos, *et al.* Liquid-liquid extraction in flow analysis: A critical review. Analytica Chimica Acta, v.652, n.1-2, p.54-65. 2009.
- 139) Singh, M., P. K. Kathuroju, *et al.* Polypyrrole based amperometric glucose biosensors. Sensors and Actuators B: Chemical, v.143, n.1, p.430-443. 2009.
- 140) Songa, E. A., O. A. Arotiba, *et al.* Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. Bioelectrochemistry, v.75, n.2, p.117-123. 2009.
- 141) Stanca, S. E. e I. C. Popescu. Phenols monitoring and Hill coefficient evaluation using tyrosinase-based amperometric biosensors. Bioelectrochemistry, v.64, n.1, p.47-52. 2004.

Referências bibliográficas

- 142) Stenger-Smith, J. D. Intrinsically electrically conducting polymers. Synthesis, characterization, and their applications. Progress in Polymer Science, v.23, n.1, p.57-79. 1998.
- 143) Sun, Y.-X., J.-T. Zhang, *et al.* Hydrogen peroxide biosensor based on the bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase incorporated in a new hydrogel film. Sensors and Actuators B: Chemical, v.124, n.2, p.494-500. 2007.
- 144) Svirskis, D., J. Travas-Sejdic, *et al.* Electrochemically controlled drug delivery based on intrinsically conducting polymers. Journal of Controlled Release, 2010.
- 145) Tahir, Z. M., E. C. Alocilja, *et al.* Polyaniline synthesis and its biosensor application. Biosensors and Bioelectronics, v.20, n.8, p.1690-1695. 2005.
- 146) Tang, H., A. Kitani, *et al.* Electropolymerization of aniline modified by para-phenylenediamine. Electrochimica Acta, v.40, n.7, p.849-857. 1995.
- 147) Tang, L. Concentration dependence of diffusion and migration of chloride ions: Part 1. Theoretical considerations. Cement and Concrete Research, v.29, n.9, p.1463-1468. 1999.
- 148) Teles, F. R. R. e L. P. Fonseca. Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors. Materials Science and Engineering: C, v.28, n.8, p.1530-1543. 2008.
- 149) Thévenot, D. R., K. Toth, *et al.* Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. Biosensors and Bioelectronics, v.16, n.1-2, p.121-131. 2001.
- 150) Topçu, S., M. K. Sezgintürk, *et al.* Evaluation of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. Biosensors and Bioelectronics, v.20, n.3, p.592-597. 2004.
- 151) Tothill, I. E. Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. Computers and Electronics in Agriculture, v.30, n.1-3, p.205-218. 2001.
- 152) Trojanowicz, M. Recent developments in electrochemical flow detections- -A review: Part I. Flow analysis and capillary electrophoresis. Analytica Chimica Acta, v.653, n.1, p.36-58. 2009.

Referências bibliográficas

- 153) Türkarslan, Ö., S. K. Kayahan, *et al.* A new amperometric cholesterol biosensor based on poly(3,4-ethylenedioxyppyrole). Sensors and Actuators B: Chemical, v.136, n.2, p.484-488. 2009.
- 154) Tzanavaras, P. D. e D. G. Themelis. Review of recent applications of flow injection spectrophotometry to pharmaceutical analysis. Analytica Chimica Acta, v.588, n.1, p.1-9. 2007.
- 155) Uliana, C. V., C. S. Riccardi, *et al.* Estudo do comportamento eletroquímico da enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e ácido 5-aminossalicílico. Eclética Química, v.33, p.57-62. 2008.
- 156) Van Staden, J. F. e R. I. Stefan-Van Staden. Application of porphyrins in flow-injection analysis: A review. Talanta, v.80, n.5, p.1598-1605. 2010.
- 157) Varfolomeev, S. D., I. N. Kurochkin, *et al.* Direct electron transfer effect biosensors. Biosensors and Bioelectronics, v.11, n.9, p.863-871. 1996.
- 158) Védrine, C., S. Fabiano, *et al.* Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support. Talanta, v.59, n.3, p.535-544. 2003.
- 159) Veitch, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. Phytochemistry, v.65, n.3, p.249-259. 2004.
- 160) Vieira, I. D. C. e O. Fatibello-Filho. Flow injection spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using a crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*) as a source of peroxidase. The Analyst, v.123, p.1809-1812. 1998.
- 161) Villarreal, I., E. Morales, *et al.* Electropolymerization kinetics of pyrrole in aqueous solution on graphite felt electrodes. Synthetic Metals, v.123, n.3, p.487-492. 2001.
- 162) Vogel, A. I. Química Analítica Qualitativa São Paulo. 1981
- 163) Vorotyntsev, M. A., J. P. Badiali, *et al.* Multi-component diffusion approach to transport across electroactive-polymer films with two mobile charge carriers. Electrochimica Acta, v.41, n.7-8, p.1375-1381. 1996.
- 164) Wang, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.19, n.1-2, p.47-53. 1999.

Referências bibliográficas

- 165) Wang, P., S. Li, *et al.* A hydrogen peroxide biosensor based on polyaniline/FTO. Sensors and Actuators B: Chemical, v.137, n.2, p.662-668. 2009.
- 166) Wang, P., M. Liu, *et al.* Amperometric phenol biosensor based on polyaniline. Sensors and Actuators B: Chemical, v.140, n.2, p.577-584. 2009.
- 167) Weinheimer, T. e D. White. Using Peroxidase To Demonstrate Enzyme Kinetics. The American Biology Teacher, v.65, n.2, 2011/01/28, p.116-121. 2003.
- 168) Wilson, G. S. e R. Gifford. Biosensors for real-time in vivo measurements. Biosensors and Bioelectronics, v.20, n.12, p.2388-2403. 2005.
- 169) Wu, J., X. Z. Yuan, *et al.* Diagnostic tools in PEM fuel cell research: Part I Electrochemical techniques. International Journal of Hydrogen Energy, v.33, n.6, p.1735-1746. 2008.
- 170) Xia, L., Z. Wei, *et al.* Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. Journal of Colloid and Interface Science, v.341, n.1, p.1-11. 2010.
- 171) Xian, Y., Y. Hu, *et al.* Glucose biosensor based on Au nanoparticles-conductive polyaniline nanocomposite. Biosensors and Bioelectronics, v.21, n.10, p.1996-2000. 2006.
- 172) Xu, Y., Y. Chen, *et al.* The determination of the kinetic parameters of electrochemical reaction in chemical power sources: A critical review. International Journal of Hydrogen Energy, v.35, n.12, p.6366-6380. 2010.
- 173) Xu, Y., W. Peng, *et al.* A new film for the fabrication of an unmediated H₂O₂ biosensor. Biosensors and Bioelectronics, v.20, n.3, p.533-537. 2004.
- 174) Yang, S., Z. Chen, *et al.* HRP biosensor based on sugar-lectin biospecific interactions for the determination of phenolic compounds. Electrochimica Acta, v.52, n.1, p.200-205. 2006.
- 175) Yang, S., Y. Li, *et al.* Horseradish peroxidase biosensor based on layer-by-layer technique for the determination of phenolic compounds. Sensors and Actuators B: Chemical, v.114, n.2, p.774-780. 2006.
- 176) Yang, Y., G. Yang, *et al.* A new hydrogen peroxide biosensor based on gold nanoelectrode ensembles/multiwalled carbon nanotubes/chitosan film-

Referências bibliográficas

- modified electrode. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v.340, n.1-3, p.50-55. 2009.
- 177) Yoon, S., J. H. Jang, *et al.* Complex capacitance analysis on rate capability of electric-double layer capacitor (EDLC) electrodes of different thickness. Electrochimica Acta, v.50, n.11, p.2255-2262. 2005.
- 178) Yuqing, M., C. Jianrong, *et al.* Using electropolymerized non-conducting polymers to develop enzyme amperometric biosensors. Trends in Biotechnology, v.22, n.5, p.227-231. 2004.
- 179) Zhang, S., G. Wright, *et al.* Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. Biosensors and Bioelectronics, v.15, n.5-6, p.273-282. 2000.
- 180) Zeraiki, A. E., F. S. A. Souza, *et al.* Development of a spot test for peroxidase activity monitoring during a purification procedure. Química Nova, v.31, n.4, p.731-734. 2008.