



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ**



TESE DE DOUTORADO

**DESENVOLVIMENTO DE SÍLICAS ORGANOFUNCIONALIZADAS PARA
APLICAÇÃO COMO SENSORES ELETROQUÍMICOS**

ELISANGELA MUNCINELLI CALDAS

Porto Alegre, dezembro de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ

ELISANGELA MUNCINELLI CALDAS

DESENVOLVIMENTO DE SÍLICAS ORGANOFUNCIONALIZADAS PARA
APLICAÇÃO COMO SENSORES ELETROQUÍMICOS

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Química

Prof^o. Dr. Edilson Valmir Benvenutti

Orientador

Prof^a. Dra. Leliz Ticona Arenas

Coorientadora

Porto Alegre, dezembro de 2014.

Dedico essa tese aos meus pais Evaldo e Lindarci Caldas,
ao meu esposo Claiton e a minha filha Laura,
à vocês todo meu amor e gratidão.

Mas é preciso escolher. Porque o tempo foge. Não há tempo para tudo. Não poderei escutar todas as músicas que desejo, não poderei ler todos os livros que desejo, não poderei abraçar todas as pessoas que desejo. É necessário aprender a arte de “abrir mão” – a fim de nos dedicarmos àquilo que é essencial.

Rubem Alves

A presente tese foi realizada inteiramente pela autora, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (novembro/2010) e (outubro/2014), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor Edilson Valmir Benvenutti e Coorientação da Professora Doutora Leliz Ticonà Arenas. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:



Prof. Dra. Christiana Andrade Pessoa (UEPG/PR)



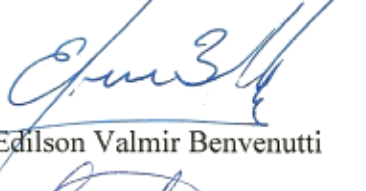
Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz (UFRGS/ICTA)



Prof. Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos (UFRGS/IQ)



Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão (UFRGS/PPGQ)



Prof. Dr. Edilson Valmir Benvenutti



Prof. Dra. Leliz Ticonà Arenas



Doutoranda Elisangela Muncinelli Caldas

Agradecimentos

A *Deus* pela minha vida, pelas oportunidades e pessoas, pelos desafios e conforto encontrados nesse Ser Superior.

Aos *meus avós* Honório (em memória) e Juruira Muncinelli por acreditarem na educação como condição única para mudança de vida, mesmo que nunca tenham frequentado a escola.

Aos *meus pais* Evaldo e Lindarci, pelo exemplo de determinação e honestidade. Pai você é meu coração. Mãe você é minha razão.

Ao *meu esposo* Claiton Balleja Barbosa pela compreensão, ajuda e estímulo ao longo desses 4 anos. Eu não teria conseguido sem você junto a mim. Você é o meu amor.

À *minha Laura* pelos melhores momentos, pelos abraços e afagos, pela compreensão e apoio incondicionais durante esse período. Você é a minha vida.

Ao professor **Dr. Edilson Valmir Benvenuti** por ter me acolhido no grupo de pesquisa, me proporcionado momentos de aprendizado e reflexão científica, ética e pessoal.

À Professora **Dra. Leliz Ticona Arenas** pela colaboração, sugestões, discussões e amizade.

À professora **Dra. Tânia M. H. Costa** por suas preciosas colaborações e colocações sempre muito bem fundamentadas.

À minha amiga- irmã **Lucéli Roloff** por me ouvir, me aconselhar e dividir momentos bons e outros angustiantes e sempre ficar ao meu lado independente das minhas decisões. Você tornou esse tempo mais leve.

À minha sogra **Aldaci** pela simplicidade e exemplo que vem me mostrando ao longo do tempo.

À **“Bá Cris e a Tia Sônia”** por terem sido um suporte para nossa família nos momentos em que estive ausente.

À *minha amiga* Andressa da Cruz Schneid pelos momentos de pesquisa e descontração no laboratório. Você me ajudou muito, tens um lugar especial na minha vida.

À *minha amiga* Monique Deon por ter me ajudado na etapa final do trabalho e pela meiguice e seriedade com que tratou nossa amizade nesse tempo.

À *galera do Laboratório de Sólidos e Superfícies*, aos alunos de Iniciação Científica, Lídia, Joana, Fernanda, Fran, Douglas, Natália e em especial a Luana e a Dhjulia que acompanharam o meu trabalho e sempre me ajudaram com muito empenho.

À *Eliana Weber de Menezes* pela ajuda na realização dos meus projetos no laboratório, pelo entusiasmo com a pesquisa e com as pessoas. Você é exemplar.

Ao *Geraldinho* pelo exemplo de superação e pelo cuidado que teve comigo nesse tempo.

Aos meus amigos **Matheus e Willian** pelos longos dias de estudo para as disciplinas. Foi muito bom conviver com vocês.

À **Carla e Manuela**, do Laboratório de Enzimologia (ICTA), pelas análises de quantificação de proteína.

Aos **colegas do IFRS** pelo apoio e pela disponibilidade, em especial à Cinara Triches e Daniela de Campos.

A **UFRGS** pela estrutura e oportunidades oferecidas e a **Capex** pela bolsa de estudos a mim concedida.

LISTA DE TRABALHOS GERADOS

Artigos Publicados

J Sol-Gel Sci Technol
DOI 10.1007/s10971-014-3367-8

ORIGINAL PAPER

Ionic silsesquioxane film immobilized on silica applied in the development of carbon paste electrode for determination of methyl parathion

Elisangela Muncinelli Caldas · Eliana Weber de Menezes ·
Tânia Mara Pizzolato · Silvio Luis Pereira Dias ·
Tania Maria Haas Costa · Leliz Ticona Arenas ·
Edilson Valmir Benvenutti

Received: 14 November 2013 / Accepted: 16 April 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Trabalhos Publicados em Eventos Científicos Internacionais

Deon, M.; Rosa, D. S.; Charqueiro, D. S.; Caldas, E. M.; Menezes, E. W.; Dias, S. L. P.; Costa, T. M. H.; Arenas, L. T.; Benvenutti, E. V. Organofunctionalized mesoporous sílica xerogel applied as electrode for dopaminedetermination. In: XIII Encontro da SBPMat, MRS Metting, 2014, João Pessoa.

Caldas, E. M.; Pizzolato, T. M.; Costa, T. M. H.; Dias, S. L. P.; Arenas, L. T.; Benvenutti, E. V.; Menezes, E. W. Ionic silsesquioxane film to improve the performance of carbon paste electrode for detection of methyl-parathion. In: XII Encontro da SBPMat, MRS Metting, 2013, Campos do Jordão.

Deon, M.; Caldas, E. M.; Costa, T. M. H.; Menezes, E. W.; Dias, S. L. P.; Arenas, L. T.; Benvenutti, E. V. Immobilization of tyrosinase on carbon ceramic used as sensor for dopamine. In: XII Encontro da SBPMat, MRS Metting, 2013, Campos do Jordão.

Caldas, E. M.; Silva, Luana.; Dias, S. L. P.; Arenas, L. T.; Benvenutti, E. V.; Menezes, E. W. Gol dor palladium nanoparticles dispersed in bulk oro n the surface of sílica based hybrid material and its use as carbon paste electrode. In: Third International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, 2013, Sorrento.

Trabalhos Publicados em Eventos Científicos Nacionais

Mendonça, J.; Carvalho, N. B.; Caldas, E. M.; Benvenutti, E. V.; Lima, A. S.; Soares, C. M. F. Imobilização por ligação covalente do suporte microporoso aerosil sobre a lipase de *Burkholderia cepacia*. In: 15ª Semana de Pesquisa, 2013, Aracaju, Sergipe.

Caldas, E. M.; Dias, S. L. P.; Arenas, L. T.; Costa, T. M. H.; Benvenutti, E. V.; Menezes, E. W. Eletrodos de materiais híbridos a base de sílica contendo nanopartículas metálicas de ouro e paládio dispersas no “bulk” e na superfície. In: I Workshop em Materiais Híbridos Multifuncionais, 2013, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Cunha, F. W.; Pretto, T. R.; Menezes, E. W.; Caldas, E. M.; Benvenutti, E. V.; Costa, T. M. H.; Dias, S. L. P.; Arenas, L. T. Síntese de Carbono Cerâmico Contendo nanopartículas de prata e sua aplicação na redução do peróxido de hidrogênio. In: I Workshop em Materiais Híbridos Multifuncionais, 2013, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Novatzky, D.; Caldas, E. M.; Dias, S. L. P.; Menezes, E. W.; Costa, T. M. H.; Arenas, L. T.; Benvenutti, E. V. Desenvolvimento de biossensor eletroquímico carbono cerâmico de terceira geração para detecção de glicose. In: I Workshop em Materiais Híbridos Multifuncionais, 2013, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Bueno, C. V.; Ramos, J. H.; Caldas, E. M.; Benvenutti, E. V.; Costa, T. M. H.; Arenas, L. T. Síntese e caracterização de um híbrido bioinorgânico mesoporoso a base de sílica e quitosana. In: 35 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia, São Paulo.

SUMÁRIO

RESUMO	xx
ABSTRACT	xxii
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVO GERAL	6
2.2. Objetivos Específicos	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1. Sensores Químicos – Panorama Geral	8
3.2. Sensores Eletroquímicos	9
3.3. Materiais Modificadores de Eletrodo.....	12
3.3.1. Materiais híbridos/compósitos à base de sílica	12
3.4. Método Sol-Gel	13
3.5. Materiais Híbridos à Base De Sílica	17
3.5.1. Sensores Eletroquímicos de Materiais Híbridos à Base de Sílica.....	20
3.6. Silsesquioxanos	23
3.7. Pesticidas	26
3.8. Materiais Carbono Cerâmicos	29
3.9. Biossensores Eletroquímicos.....	32
3.10. Imobilização Enzimática	33
3.11. Classificação dos Biossensores Eletroquímicos	36
3.12. Glicose Oxidase (GOx)	37
3.13. Biossensores para Glicose	39
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	43
4.1. Reagentes	43
4.2. Síntese do Silsesquioxano Iônico	43
4.2.1. Síntese da Sílica	44

4.2.2.	Imobilização do Silsesquioxano Iônico na Superfície da Sílica	44
4.2.3.	Preparação dos Eletrodos de Pasta de Carbono	45
4.3.	Matrizes Carbono Cerâmico	45
4.3.1.	Modificação das Matrizes SG1, SG2 e SG3 com 3-aminopropiltrimetoxisilano	45
4.3.2.	Modificação com Glutaraldeído	46
4.3.3.	Imobilização da enzima Glicose Oxidase.....	46
4.3.4.	Preparo dos eletrodos utilizando os materiais SG/AP/GA/GOx	47
4.4.	Técnicas de Caracterização	47
4.4.1.	Espectroscopia de absorção no infravermelho.....	47
4.4.2.	Análise elementar de cloreto.....	47
4.4.3.	Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂	48
4.4.4.	Análise Termogravimétrica (TGA).....	48
4.4.5.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	48
4.4.6.	Quantificação de proteína imobilizada.....	48
4.4.7.	Medidas Eletroquímicas	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
5.1.	Filme de Silsesquioxano Iônico imobilizado na Superfície da Sílica utilizado como modificador de Eletrodo de Pasta de Carbono para determinação de Metil Paration	52
5.1.1.	Caracterização do material Db/Sílica.....	52
5.1.1.1.	Espectroscopia no infravermelho.....	52
5.1.1.2.	Análise elementar de cloreto.....	53
5.1.1.3.	Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂	53
5.1.2.	Caracterização eletroquímica.....	55
5.1.2.1.	Comportamento eletroquímico do eletrodo Db/Sílica frente ao metil paration	57
5.1.2.2.	Efeito do pH.....	60

5.1.2.3.	Voltametria de Pulso Diferencial do Eletrodo Db/Sílica	62
5.2.	Desenvolvimento de matrizes carbono cerâmico (SG) utilizadas como suporte na imobilização da enzima glicose oxidase (GOx) e sua aplicação como biossensor eletroquímico de terceira geração para detecção de glicose	65
5.2.1.	Modificação das Matrizes Carbono Cerâmico.....	65
5.2.2.	Caracterização dos materiais	67
5.2.2.1.	Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂	67
5.2.2.2.	Análise Termogravimétrica	75
5.2.2.3.	Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ das matrizes SG1, SG2 e SG3 pressionadas.....	79
5.2.3.	Caracterização eletroquímica dos materiais SG1/AP/GA/GOx, SG2/AP/GA/GOx e SG3/AP/GA/GOx por voltametria cíclica	85
5.2.4.	Estudo da atividade eletrocatalítica do material SG3/AP/GA/GOx para a glicose	95
6.	CONCLUSÕES	104
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de reações de hidrólise e condensação pelo método sol- gel catalisadas por ácido.	15
Figura 2. Esquema de reações de hidrólise e condensação pelo método sol- gel catalisadas por base.	16
Figura 3. Interações típicas de materiais híbridos e a intensidade das mesmas_.....	18
Figura 4. Diferentes tipos de materiais híbridos.	19
Figura 5. Representação híbridos de Classe II	20
Figura 6. Monômeros encontrados nos diferentes tipos de siloxanos.....	23
Figura 7. Precursores organossilanos sintetizados ou desenvolvidos no LSS (a) forma pendente, (b) em ponte.....	24
Figura 8. Metabolismo do pesticida metil paration em humanos.	27
Figura 9. Esquema de preparação do Material Carbono Cerâmico.	29
Figura 10. Esquema dos elementos que compõem um biossensor eletroquímico.	32
Figura 11. Representação dos diferentes métodos de imobilização enzimática. E: Enzima, P: Proteína inerte.....	34
Figura 12. Representação esquemática da Evolução dos Biossensores: (A) primeira geração, (B) segunda geração e (C) terceira geração.....	36
Figura 13. Oxidação de glicose pela ação da enzima glicose oxidase.	38
Figura 14. Estrutura de fitas representando a enzima glicose oxidase.	38
Figura 15. Ferroceno agindo como receptor artificial de elétron em lugar do O ₂ para a GOx. ...	40
Figura 16. Representação esquemática da síntese do silsesquioxano: (a) precursor cloreto de bis(3-n-propiltrimetoxisilil)-1,4dizoniabíciclo[2,2,2]octano; (b) silsesquioxano cloreto de bis(3-n-propiltri-hidroxisilil)-1,4diazoniabíciclo[2,2,2]octano (SiDbCl ₂)	44
Figura 17. Espectro de absorção na região do infravermelho da Sílica e do Db/Sílica, obtido em temperatura ambiente, após tratamento térmico a 130 °C, sob vácuo por 1h.	52
Figura 18. Análise textural (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) Distribuição de tamanho de poros.....	54
Figura 19. Distribuição de tamanho de poros para os materiais Sílica e Db/Sílica na região de microporos.....	55

Figura 20. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de pasta de carbono modificados com (a) Sílica e (b) Db/Sílica em uma solução $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl. Velocidade de varredura 20 mV s^{-1}	56
Figura 21. Voltamogramas do eletrodo Db/Sílica (a) na ausência e (b) na presença de $2,91 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$ de metil paration em solução tampão BR (pH 5,0) e atmosfera de argônio. Velocidade de varredura 20 mV s^{-1}	57
Figura 22. Representação das reações de oxidação e redução do metil paration.....	58
Figura 23. (a) Voltamogramas Cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura ($0,01 - 0,40 \text{ V s}^{-1}$) para eletrodo de pasta de carbono Db/Sílica em $2,91 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$ de metil paration em solução tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0); (b) Relação entre (i_{pa} ou i_{pc}) e (v).; (c) Relação entre $\log(i_{pa}$ ou $i_{pc})$ e $\log v$	59
Figura 24. Relação entre E_{pa} e E_{pc} em função do pH na presença de $2,56 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$ de metil paration. Figura inserida: efeito do pH na corrente de pico.....	61
Figura 25. Voltamogramas de Pulso Diferencial do eletrodo de pasta de carbono Db/Sílica em solução tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) com sucessivas adições de metil paration. Figura inserida: Relação linear entre i_{pc} e a concentração de metil paration na faixa entre $1,25 \times 10^{-4}$ e $2,56 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$	62
Figura 26. Representação da imobilização covalente da enzima GOx: (I) Reação de funcionalização da matriz com o grupo 3-aminopropil; (II) ativação com glutaladeído; (III) imobilização da enzima GOx.	66
Figura 27. Imagem referente a solução enzimática residual da imobilização aos suportes, (A) SG1/AP/GA, (B) SG2/AP/GA e (C) SG3/AP/GA.....	67
Figura 28. Isotermas de adsorção e dessorção de N_2 das matrizes SG1, SG2 e SG3.....	68
Figura 29. Curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SG1, SG2 e SG3.....	69
Figura 30. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N_2 da matriz SG1, SG1/AP, SG1/AP/GA e SG1/AP/GA/GOx. (b) Curvas de distribuição de tamanho de poros para a matriz SG1 antes e após todas as modificações.....	70
Figura 31. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N_2 da matriz SG2, SG2/AP, SG2/AP/GA e SG2/AP/GA/GOx. (b) Curvas de distribuição de tamanho de poros para a matriz SG2 antes e após todas as modificações.....	72
Figura 32. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N_2 da matriz SG3, SG3/AP, SG3/AP/GA e SG3/AP/GA/GOx. (b) Curvas de distribuição de tamanho de poros para a matriz SG3 antes e após todas as modificações.....	73
Figura 33. TGA para as diferentes matrizes e suas respectivas modificações_(a) SG1, (b) SG2 e (c) SG3.....	76
Figura 34. Esquema da modificação com a enzima GOx e seu efeito nos poros das matrizes SG1, SG2 e SG3.	79

Figura 35. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) Curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SG1 antes e após submetida à pressão.	80
Figura 36. a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) Curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SG2 antes e após submetida à pressão.	81
Figura 37. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) Curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SG3 antes e após submetida à pressão.	82
Figura 38. Micrografia obtida por MEV da amostra SG3 (A) e mapeamento de C (B), O (C) e Si (D) por EDS (b) a 1500 vezes.	84
Figura 39. Imagens obtidas por MEV para as amostras (A) SG3, (B) SG3/AP, (C) SG3/AP/GA E (D) SG3/AP/GA/GOx.....	84
Figura 40. Voltamogramas dos eletrodos em atmosfera de gás argônio, tampão fosfato (pH 7,0) e $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$	85
Figura 41. (a) Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo SG3/AP/GA/GOx em STF com diferentes valores de pH em atmosfera de gás Argônio. (b) Relação entre corrente de pico anódico e catódico e o pH.	87
Figura 42. Voltamogramas dos eletrodos (A) SG3/AP/GA, (B) SG3/AP/GA/GOX (sem polir) (C) SG3/AP/GA/GOX (polida), em atmosfera de gás argônio, tampão fosfato (pH 7,0) e $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$	88
Figura 43. (a) Voltamogramas do eletrodo SG3/AP/GA/GOx em gás argônio, STF $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 em $20 - 1900 \text{ mV.s}^{-1}$, respectivamente. (b) relação entre i_{pa} e i_{pc} com a velocidade de varredura.	90
Figura 44. (a) Curvas E_{pa} e E_{pc} versus $\log v$ e (b) Curvas E_{pa} e E_{pc} versus $\log v$ com $v > 0,60 \text{ V.s}^{-1}$ para o eletrodo carbono cerâmico SG3/AP/GA/GOx.	92
Figura 45. Voltamogramas de SG3/AP/GA/GOx em (a) atmosfera de gás argônio, (b) atmosfera aberta e (c) atmosfera de gás oxigênio em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH7,0, $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$	94
Figura 46. Estudo de Voltametria Cíclica para avaliar a estabilidade do eletrodo SG3/AP/GA/GOx.	95
Figura 47. Voltamogramas Cíclicos SG3/AP/GA/GOx em atmosfera de argônio, solução tampão Fosfato pH 7,0 contendo 0,00; 1,92; 3,70 e 6,90 mmol L^{-1} de glicose (de (a) a (d)) com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	96
Figura 48. Resposta amperométrica (i versus t) em atmosfera inerte de gás argônio. (a) SG3/AP/GA/GOx com adições sucessivas de 0,01 mmol de glicose, potencial aplicado $-0,366 \text{ V}$ e (b) curva de calibração para o eletrodo SG3/AP/GA/GOx.....	97
Figura 49. (a) Resposta cronoamperométrica do eletrodo SG3/AP/GA/GOx em atmosfera saturada de O ₂ , STF pH 7,0. $E = - 0,366 \text{ V}$. (b) Curva de calibração do eletrodo SG3/AP/GA/GOX sucessivas adições de 0,005 mmol de glicose.	98

Figura 50. Cronoamperograma do eletrodo SG3/AP/GA/GOx para adição de 0,5 mM de glicose; 0,5 mM AA; 0,5 mM DOP; 0,5 mM AU e 0,5 mM de glicose, em atmosfera saturada de O₂ STF (pH=7,0). Potencial aplicado= -0,366V..... 100

Figura 51. Cronoamperograma do eletrodo SG3/AP/GA/GOx com adições consecutivas de 0,5 mmol L⁻¹ de glicose; 0,5 mmol L⁻¹ ácido ascórbico; 0,5 mmol L⁻¹ dopamina; 0,5 mmol L⁻¹ ácido úrico e 0,5 mmol L⁻¹ de glicose em atmosfera inerte STF (pH=7,0) Potencial aplicado= - 0,366V. 101

Figura 52. Intensidade relativa das correntes de pico anódico e catódico do eletrodo SG3/AP/GA/GOx em atmosfera inerte STF (pH=7,0). Potencial aplicado= -0,366V..... 102

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. Métodos de Modificação da Superfície de Eletrodos.	11
Tabela II. Exemplos de materiais utilizados como modificadores de eletrodos que contêm silsesquioxanos iônicos.	25
Tabela III. Trabalhos utilizando Eletrodos Carbono Cerâmicos para detecção de analitos de interesse.	31
Tabela IV. Trabalhos utilizando a GOx no desenvolvimento de biossensores de terceira geração.	41
Tabela V. Características texturais dos materiais.	54
Tabela VI. Valores de intensidade de corrente e de potencial dos picos anódicos e catódicos e variação dos potenciais de pico ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$) obtidos dos voltamogramas cíclicos.	56
Tabela VII. Comparação de diferentes eletrodos usados na determinação de metil paration.	63
Tabela VIII. Dados da quantidade de proteína imobilizada nos suportes SG/AP/GA.	66
Tabela IX. Área superficial específica e volume de poros matrizes carbono cerâmico e suas modificações.	75
Tabela X. TGA das matrizes SG e suas respectivas modificações.	77
Tabela XI. Determinação do teor orgânico referente às modificações das matrizes SG.	78
Tabela XII. Valores comparativos da área específica para as matrizes carbono cerâmico antes e após serem pressionadas.	83
Tabela XIII. Parâmetros obtidos por voltametria cíclica para os eletrodos SG/AP/GA/GOx.	86
Tabela XIV. Dados dos eletrodos SG3/AP/GA/GOx (antes do polimento), SG3/AP/GA/GOx (polido).	89
Tabela XV. Valores de K_M e $i_{m\acute{a}x}$ para biossensores eletroquímicos de glicose e do eletrodoSG3/AP/GA/GOx.	99

ABREVIATURAS

ΔE_p	Variação dos potenciais de pico
μA	Microampère
α	Coeficiente de transferência de carga
APTMS	3-aminopropiltrimetoxisilano
BET	Brunauer, Emmett e Teller
BG-250	corante Coomassie brilliant blue
BJH	Barret, Joyner e Halenda
BR	Tampão Britton-Robinson
C_{graf}	Carbono grafite
CPTMS	3-cloropropiltrimetoxisilano
DABCO	1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano
ECS	eletrodo de calomelano saturado
EDS	do inglês: <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>
EPA	do inglês: <i>Environmental Protection Agency</i>
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
EQM	Eletrodos Quimicamente Modificados
FAD	Cofator Flavina Adenina Dinucleotídeo
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
GA	Glutaraldeído
GOx	Enzima Glicose Oxidase
Hz	Hertz
i_{pa}	Intensidades de corrente de pico anódico
i_{pc}	Intensidades de corrente de pico catódico
IUPAC	do inglês: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K_M	Constante aparente de Michaelis-Menten
k_s	Constante de transferência heterogênea
LD	Limite de Detecção
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

MP	Metil Paration
mV	Milivolt
nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
S	Sensibilidade do eletrodo
SG	Sílica/Grafite
SiDbCl ₂	Cloreto de bis(3-n-propiltri-hidroxissilil)- 1,4diazoniabicyclo[2,2,2]octano
STF	Solução Tampão Fosfato
TED	transferência eletrônica direta
TEOS	Ortossilicato de tetraetila
TGA	Análise Termogravimétrica
TMOS	Ortossilicato de tetrametila
Ton	Tonelada
VC	Voltametria Cíclica
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
YSI	do inglês: <i>Yellow Springs Instrument</i>

RESUMO

Neste trabalho foram sintetizados dois diferentes materiais híbridos à base de sílica para serem aplicados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. O primeiro trata de sílica mesoporosa modificada por uma reação de enxerto com silsesquioxano iônico contendo o grupo cloreto de 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano. Esse material, denominado (Db/Sílica), contém o silsesquioxano altamente disperso na superfície da sílica e foi utilizado como modificador de eletrodo de pasta de carbono para determinação de metil paration. Espectroscopia no infravermelho, análise elementar e isotermas de adsorção e dessorção de N₂ foram utilizadas para a caracterização do material. O comportamento eletroquímico do metil paration foi avaliado por voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial. A faixa de resposta linear do metil paration foi entre $1,25 \times 10^{-7}$ e $2,56 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, em solução tampão Britton- Robinson (BR) em pH 6,0. O limite de detecção e a sensibilidade do eletrodo contendo Db/Sílica foram estimados em 0,013 μmol L⁻¹ e 6,3 μA μmol L⁻¹. A segunda proposta trata da síntese, via método sol-gel, de três matrizes carbono cerâmicos. O resultado foi a obtenção de três matrizes mesoporosas denominadas SG1, SG2 e SG3 com máximos de distribuição de tamanho de poros em 7, 14 e 21 nm, respectivamente. As matrizes foram modificadas covalentemente com 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS), glutaraldeído (GA) e com a enzima Glicose Oxidase (GOx). As matrizes e os materiais resultantes das modificações foram caracterizados por isotermas de adsorção e dessorção de N₂, análise termogravimétrica e quantificação espectrofométrica de proteína pelo método de Bradford. Os materiais modificados foram utilizados na forma de discos para confecção de eletrodos carbono cerâmicos e seu comportamento eletroquímico avaliado inicialmente por voltametria cíclica. O material modificado em que foi utilizada a matriz com maior tamanho de poros, SG3/AP/GA/GOx, apresentou melhor resposta de corrente para a imobilização da enzima quando comparado aos outros dois suportes. Desta forma, esse material foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por espectroscopia de dispersão de elétrons (EDS) e avaliado como biossensor para glicose por cronoamperometria. A faixa de resposta linear do biossensor foi entre 0,39 e 5,36 mmol L⁻¹ de glicose, em atmosfera de gás argônio. A sensibilidade e o limite de detecção do eletrodo carbono cerâmico nesta atmosfera foram estimados em 0,33 μA mM⁻¹ cm⁻² e 0,93 mmol L⁻¹, respectivamente. A

a constante de Michaelis-Menten (K_M) estimada em $1,27 \text{ mmol L}^{-1}$ e a corrente máxima de saturação (i_{ss}) em $0,59 \text{ } \mu\text{A}$. O eletrodo carbono cerâmico SG3/AP/GA/GOx, avaliado em atmosfera saturada de O_2 , apresentou resposta linear na faixa de concentração de glicose entre $0,2$ e $2,47 \text{ mmol L}^{-1}$. A sensibilidade e o limite de detecção foram estimados em $4,44 \text{ } \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ e $0,26 \text{ mmol L}^{-1}$ respectivamente, K_M $0,52 \text{ mmol L}^{-1}$ e i_{ss} $3,12 \text{ } \mu\text{A}$. Esses resultados mostram que os materiais Db/Sílica e SG3/AP/GA/GOx apresentam potencialidade para serem aplicados como sensor eletroquímico para metil paration e biossensor para glicose, respectivamente.

ABSTRACT

In this work, two different silica based hybrid materials were synthesized and applied in the development of electrochemical sensors. The first one was a mesoporous silica material modified by grafting reaction with an ionic silsesquioxane containing the 1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane chloride group. This material, called (Db/Silica), presents the silsesquioxane highly dispersed on silica surface, and it was used as the modifier of carbon paste electrode for methyl paration determination. Infrared spectroscopy, elemental analysis and nitrogen adsorption-desorption isotherms were used for material characterization. The electrochemical behavior of methyl paration was evaluated by cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry. The linear response for methyl paration was obtained in the range of 1.25×10^{-7} and 2.56×10^{-6} mol L⁻¹, in Britton-Robinson buffer solution, pH 6.0. The detection limit and sensitivity of the electrode containing Db/Silica were estimated as 0.013 μmol L⁻¹ and 6.3 μA μmol L⁻¹ respectively. The second proposal is based on the synthesis of three carbon ceramic matrices by sol-gel method. The obtained mesoporous materials were denominated SG1, SG2 and SG3 and present a maximum porous size distribution at 7, 14 and 21 nm, respectively. These matrices were covalently modified with 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS), glutaraldehyde (GA) and with the Glucose Oxidase (GOx) enzyme. The matrices and modified materials were characterized by nitrogen adsorption-desorption isotherms, thermogravimetric analysis and protein determination by Bradford spectrophotometric method. The modified materials were used in disk form in the construction of carbon ceramic electrodes and their electrochemical behavior was initially evaluated by cyclic voltammetry. The modified material which presented higher pore size was SG3/AP/GA/GOx. This material showed a better current response for enzyme immobilization when compared with the other two supports. In this way, this material was characterized by scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive spectroscopy (EDS) and evaluated as biosensor for glucose by chronoamperometry. The linear response in this biosensor was between 0.39 and 5.36 mmol L⁻¹ of glucose, under argon atmosphere. Sensitivity and detection limit of the carbon ceramic electrode under this atmosphere were estimated as 0.33 μA mM⁻¹ cm⁻² and 0.93 mmol L⁻¹, respectively, the Michaelis-Menten constant (K_M) was 1.27 mmol L⁻¹ and the maximum saturation current (i_{ss}) was 0.59 μA. The carbon ceramic electrode

SG3/AP/GA/GO_x, when evaluated under O₂ saturated atmosphere, presents linear response in the glucose concentration range of 0.2 and 2.47 mmol L⁻¹. Sensitivity and the detection limit were estimated as 4.44 μA mM⁻¹ cm⁻² and 0.26 mmol L⁻¹, respectively, K_M 0.52 mmol L⁻¹ and i_{ss} 3.12 μA. These results showed the Db/Silica and SG3/AP/GA/GO_x materials have potentiality to be applied, as electrochemical sensor for methyl paration and biosensor for glucose, respectively.

Introdução



1. INTRODUÇÃO

Os sensores eletroquímicos se baseiam em reações de oxidação e redução, transformando o efeito de interações eletroquímicas entre analito e eletrodo em sinais elétricos¹. Esses dispositivos têm sido amplamente explorados por apresentarem características interessantes como: (i) resposta rápida, (ii) possibilidade de portabilidade; (iii) operação contínua, (iv) sensibilidade, (v) especificidade, (vi) reprodutibilidade e (vii) estabilidade elevadas². Adicionalmente, ao tratar do parâmetro especificidade, determinada principalmente pela interação receptor/ligante, tornam-se prescindíveis etapas de preparação da amostra e separações cromatográficas, reduzindo o custo da análise³.

Apesar da grande versatilidade e perspectivas apresentadas pelos sensores eletroquímicos, a utilidade de um eletrodo é muitas vezes limitada devido à passivação gradual de sua superfície, que é consequência principalmente da adsorção dos produtos da reação de óxido-redução utilizada na detecção⁴. Além disso, a sensibilidade de muitos analitos pode ser prejudicada em função da cinética lenta de transferência de elétrons entre estes compostos e o eletrodo⁵ ou, ainda, pela dificuldade de discriminar compostos alvos de outros que possuam características redox similares⁵.

Com o propósito de pré estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, como forma de alterar a reatividade e seletividade do eletrodo base, surgiram os Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM)⁶⁻⁸. Desta forma, avanços tecnológicos na área dos EQM's encontram aplicações em diversas áreas de atuação como em análises de interesse industrial, clínico e ambiental⁹.

A proposta desse trabalho é a modificação da superfície eletródica com materiais híbridos à base de sílica. Materiais à base de sílica são sólidos inorgânicos robustos que além da elevada área superficial específica exibem uma estrutura tridimensional interligada entre os tetraedros (SiO_4), resultando em estruturas altamente porosas originadas dos interstícios entre esses monômeros¹⁰. Do ponto de vista eletroquímico, a sílica apresenta propriedades muito atraentes, uma vez que apresenta capacidade de adsorção, química ácido-base e estabilidade térmica, características que podem ser exploradas para a detecção de analitos eletroativos. Além disso, a sílica pode ser enxertada com uma variedade de grupos funcionais, o que conduz a um

enriquecimento considerável das suas propriedades de superfície, podendo ainda servir como suporte para espécies biológicas^{7,10-13}.

O processo sol-gel, que envolve a hidrólise de precursores alcóxido de silício (por exemplo, o ortossilicato de tetrametila (TMOS) ou ortossilicato de tetraetila (TEOS) com posterior policondensação catalítica produz uma rede macromolecular de ligações siloxano e vem sendo usado no desenvolvimento desses materiais, especialmente pelas baixas temperaturas de processamento, geralmente temperatura ambiente, condição que o diferencia das rotas clássicas de síntese. No entanto, a estrutura de silicatos é consequência de uma sucessão de fatores como: polimerização, gelificação, envelhecimento, secagem, aquecimento e controle dos parâmetros experimentais de síntese^{10,13,14}.

Adicionalmente, grupos orgânicos podem ser utilizados na modificação dos materiais à base de sílica combinando em um único sólido a rigidez da rede inorgânica e a reatividade dos grupos orgânicos imobilizados na estrutura porosa da sílica. Esses materiais são os chamados híbridos orgânico-inorgânicos. Os métodos usuais de preparação dos híbridos orgânico- inorgânico compreendem a: (i) incorporação de grupos orgânicos na superfície da sílica usando os grupos silanóis através de reações de *grafting* (enxerto); ou (ii) por co-condensação (*bulk*) de alcóxidos de silício e organossilanos^{10,13,15}.

Entretanto, de um modo geral, os materiais híbridos à base de sílica apresentam baixa condutividade eletrônica, inviabilizando sua utilização direta como eletrodos. Uma forma de contornar este problema está na adição de pasta de grafite ao material, obtendo assim uma mistura condutora e com as características necessárias para uso como eletrodo¹⁶. Outra forma de tornar o material condutor é a adição do grafite durante o processo de síntese e tem sido usado para aumentar a condutividade de óxidos inorgânicos^{17,18}. Esses materiais são chamados de carbono cerâmicos.

Nessa perspectiva, o Laboratório de Sólidos e Superfícies (LSS), há uma década vem desenvolvendo novos materiais híbridos, bem como novos precursores moleculares para esses sistemas. Com base nos conhecimentos previamente discutidos no grupo de pesquisa do LSS, nesse trabalho serão abordadas duas diferentes propostas de materiais híbridos para serem testados como sensores eletroquímicos. A primeira, é um material híbrido à base de sílica modificado com o silsesquioxano iônico contendo o grupo cloreto de 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano como modificador de eletrodo de pasta de

carbono e testado como sensor para o analito metil paration. A segunda proposta é a imobilização da enzima Glicose Oxidase (GOx) em um eletrodo carbono cerâmico funcionalizado com 3-aminopropiltrimetoxisilano e glutaraldeído. O material foi testado como biossensor eletroquímico na detecção de glicose.

No caso da primeira abordagem, o material foi desenvolvido visando explorar as características dos silsesquioxanos iônicos, os quais são híbridos com alto teor de grupo orgânico^{13,19} e podem atuar como espécies trocadoras de íons²⁰, além de apresentarem-se como materiais de alta estabilidade e especificidade em recentes estudos no desenvolvimento de sensores eletroquímicos²¹⁻²⁴. Aliado a essas características, a detecção do metil paration, pareceu bastante conveniente já que o mesmo constitui um pesticida organofosforado altamente tóxico e prejudicial ao ambiente e a saúde humana e de outros mamíferos²⁵⁻²⁷.

A segunda proposta teve como principal motivação o desenvolvimento de um material carbono cerâmico que dispensasse o uso de eletrodos comerciais, tornando-a diferenciada frente a maior parte dos biossensores de glicose explorados na literatura. A escolha pela enzima GOx está relacionada ao fato de que os biossensores de glicose representam cerca de 85% do mercado de biossensores^{28,29}, sendo portanto um sistema bastante difundido no meio acadêmico. A GOx é uma flavoproteína dimérica com aproximadamente 160 kDa que catalisa a reação de oxidação da glicose. O sítio ativo dessa enzima é composto pelo cofator Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) o qual é reduzido a FADH₂ durante o processo catalítico³⁰. A imobilização dessa enzima, que contém aminoácidos, pode ser alcançada utilizando-se uma matriz híbrida biocompatível que contenha grupos amino³⁰ e utilizando o glutaraldeído como agente de reticulação.

Objetivos



2. OBJETIVO GERAL

Desenvolver novos materiais à base de sílica para serem aplicados como sensores eletroquímicos.

2.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar sílicas com diferentes tamanhos de poros para serem usadas como matrizes para organofuncionalização química e imobilização de enzima.
- Modificar a superfície das matrizes de sílica com grupos organofuncionais neutros e iônicos visando o seu uso no desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos.
- Caracterizar os materiais à base de sílica, antes e após a modificação química.
- Desenvolver um novo sensor eletroquímico para detecção de metil paration.
- Desenvolver um novo biossensor eletroquímico para detecção de glicose.

Revisão Bibliográfica



3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Sensores Químicos – Panorama Geral

Os sensores químicos apresentam-se como dispositivos pequenos, robustos, portáteis, de fácil manipulação que permitem a coleta de dados e obtenção de informações com manipulação mínima do sistema estudado. Estes dispositivos possuem características peculiares e por isso, têm sido um elemento chave na instrumentação analítica dispensando, em muitos casos, a utilização de aparelhos complexos e a necessidade de uma enorme infraestrutura de suporte³.

Em 1991, a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) estabeleceu uma definição para sensores químicos: “dispositivos que convertem a informação química, desde a concentração de analitos até a composição de amostras, em sinais analiticamente úteis”. A informação química pode originar-se de fenômenos químicos, bioquímicos ou físicos que envolvam a espécie de interesse¹. Conforme a IUPAC, um sensor químico é formado por duas unidades funcionais básicas conectadas em série: o receptor que responde a parâmetros específicos e, em geral, interage com o analito (ligante) transformando a informação química em uma forma de energia determinada capaz de ser transduzida, e o transdutor, responsável pelo processo de transdução, o qual acarreta em sinais elétricos analiticamente úteis. Os receptores podem atuar sob três modos básicos: reconhecimento molecular, térmico ou estérico².

Ainda, de acordo com a IUPAC, os sensores químicos podem ser classificados conforme o princípio de transdução, os principais são: eletroquímicos, elétricos, ópticos, magnéticos, termométricos e sensíveis à massa². Os biossensores são considerados um grupo independente de sensores químicos. Segundo a IUPAC, em convenção preconizada no ano de 1999, esses dispositivos se caracterizam por mecanismos bioquímicos de reconhecimento da biomolécula alvo via receptor (biorreceptor ou função de reconhecimento)³¹. Os biossensores podem ser empregados para monitorar matrizes biológicas e não biológicas. Por outro lado, sensores que não incorporam mecanismo bioquímico de reconhecimento não podem ser designados como biossensores, mesmo que aplicados a sistemas biológicos.

Nesse trabalho será dada ênfase aos sensores eletroquímicos e aos biossensores que, respeitando as especificidades, são àqueles que transformam o efeito de interações eletroquímicas entre analito e eletrodo em sinais elétricos.

3.2. Sensores Eletroquímicos

As técnicas eletroquímicas constituem-se de uma poderosa ferramenta para os químicos analíticos especialmente por causa de algumas características vantajosas como a elevada sensibilidade das determinações, custo moderado e portabilidade^{32,33}. Outros procedimentos analíticos como a espectroscopia e a cromatografia também são altamente sensíveis, no entanto, necessitam de uma instrumentação complexa e de alto custo³⁴. Nesse contexto, devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental têm conduzido a uma crescente busca por sensores eletroquímicos devido à necessidade de testes analíticos simples, rápidos e baratos para a determinação de importantes compostos químicos e biológicos em concentrações muito baixas. Os principais sensores eletroquímicos podem ser classificados como: potenciométricos, amperométricos, voltamétricos e condutométricos, sendo os sensores amperométricos, os de maior destaque^{3,31}.

Os sensores amperométricos constituem-se em dispositivos mantidos em potencial fixo e que propiciam sinais de corrente faradaica proporcionais à concentração do analito, em função de processos eletródicos que ocorrem na interface eletrodo/solução. Todavia, a corrente medida em experimentos eletroquímicos também possui um componente capacitivo, associado a mudanças da capacitância da dupla camada elétrica durante variações de potencial. A corrente faradaica é aquela relativa à reação de oxirredução da espécie em estudo no eletrodo e a corrente capacitiva, é a corrente necessária para carregar a dupla camada elétrica existente na interface eletrodo-solução. Visto que no caso de sensores amperométricos o potencial é mantido constante durante a medição da corrente, deve-se destacar também a importância da avaliação da seletividade das determinações uma vez que, via de regra, em amostras complexas podem existir espécies químicas que também são eletroativas no potencial selecionado.

Uma estratégia para superar os problemas de seletividade acima considerados envolve a modificação da superfície eletródica. Algumas décadas atrás três atributos principais eram requeridos em um eletrodo de trabalho utilizado em experimentos

eletroquímicos: boa condutividade, estabilidade química perante processos redox em solução e larga faixa de potencial de trabalho. Desde então, essas premissas passaram a ter um significado menos importante uma vez que, para determinados sistemas químicos, percebeu-se a necessidade do trabalho com superfícies seletivamente reativas, as quais proporcionavam resultados favoráveis em razão da melhoria da atividade química³⁵. O uso de reagentes moleculares para manipular deliberadamente a superfície de eletrodos tem vasta aplicação em Eletroanalítica, pois conduz a melhoria na capacidade de reconhecimento e/ou na amplificação de sinais de corrente, ao mesmo tempo em que pode tornar as determinações mais seletivas pelo efeito eletrocatalítico (diminuição da sobretensão dos processos eletródicos) ou pela restrição da passagem de espécies interferentes empregando-se membranas apropriadas. Os procedimentos acima descritos têm estreita associação com o termo “eletrodos quimicamente modificados”³⁶, visto que o objetivo do uso de sensores amperométricos está centrado na medição de sinais de corrente em matrizes de natureza complexa (fluidos biológicos, águas naturais, alimentos, etc), a modificação da superfície eletródica é, na maioria dos casos, necessária para que se atinjam os propósitos desejados. Assim, a modificação possibilita controlar a natureza físico-química da interface eletrodo solução como forma de alterar a reatividade e seletividade do eletrodo base, favorecendo o desenvolvimento de eletrodos para diferentes aplicações analíticas⁸.

A importância da funcionalização da superfície eletródica propiciou a criação de uma área com fronteiras bastante abrangentes que tem levado à proposição de inúmeras estratégias para a imobilização deliberada de espécies químicas na superfície de eletrodos convencionais, como: platina, ouro, carbono vítreo, fibras de carbono e pasta de carbono.

Os métodos mais utilizados para a modificação da superfície dos eletrodos base consistem em adsorção irreversível direta, ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo, recobrimento com filmes poliméricos ou ainda a preparação de eletrodos à base de pasta de carbono^{6,8}. Os fundamentos dos principais tipos de modificação da superfície eletródica estão expostos, de maneira resumida, na Tabela I.

Tabela I. Métodos de Modificação da Superfície de Eletrodos.

Método	Modificação	Vantagens	Desvantagens
Adsorção	Dissolução do agente modificador em solvente e na exposição do eletrodo a esta solução	Simplicidade e rapidez.	Formação de monocamada. Dessorção do modificador ocasionando perda de reprodutibilidade.
Ligação covalente	Modificador é ligado covalentemente ao substrato do eletrodo.	Estabilidade à imobilização.	Formação de monocamada. Requer maior tempo para sua preparação.
Polimerização	Recobrimento com filmes poliméricos condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e a espécie de interesse.	Formação de várias monocamadas. Aumento na seletividade.	Degradação da membrana polimérica e baixa estabilidade.
Pasta de Carbono	Mistura de grafite em pó e um líquido orgânico que é imiscível em contato com soluções aquosas.	Versatilidade, baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo, modificação interna do material eletródico e facilidade de renovação da superfície.	Baixa resistência mecânica e pouco reprodutível.
Carbono Cerâmico	Dopagem da matriz de sílica com carbono pelo método sol-gel.	Alia a porosidade da sílica com a condução do grafite em uma dispersão homogênea. Superfície renovável e possibilidade de obtenção de materiais com diferentes configurações.	Baixa reprodutibilidade.

(Adaptada das referências 6–8).

3.3. Materiais Modificadores de Eletrodo

Com a evolução técnica e científica, novos tipos de materiais têm sido desenvolvidos, como os compósitos³⁷ e os materiais híbridos³⁸ e esses, vêm sendo aplicados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos além de aplicações ópticas, em biomateriais, em catálise e em cromatografia^{20,39-45}.

Materiais híbridos orgânico-inorgânicos são preparados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos em nível nanométrico ou molecular que, normalmente, apresentam propriedades complementares, dando origem a um único material com propriedades diferenciadas daquelas que lhe deram origem. Por outro lado, os materiais compósitos são formados pela combinação de duas ou mais fases de diferente natureza. Cada fase mantém suas características individuais, mas a mistura pode apresentar novas características físicas, químicas ou biológicas^{14,37,38}.

Adicionalmente, é importante esclarecer que materiais híbridos orgânico-inorgânicos e compósitos não são sinônimos. Compósitos são materiais constituídos por uma mistura de dois ou mais componentes ou fases distintas, usualmente combinados em escala micro e macroscópica que devem apresentar propriedades distintas dos componentes individuais. Deste modo, compósito e híbrido diferem entre si nas dimensões e na dispersão de seus componentes; além disso, um compósito não é, necessariamente, constituído por componentes orgânicos e inorgânicos¹⁴.

Ainda nessa perspectiva, outras matrizes inorgânicas como óxidos e fosfatos metálicos, zeólitas e γ -alumina têm sido utilizadas como agentes modificadores de eletrodos convencionais⁸, no entanto, ênfase será dada aos materiais à base de sílica (híbridos e compósitos) que apresentam grande potencial para a aplicação dessas espécies em eletroquímica.

3.3.1. Materiais híbridos/compósitos à base de sílica

A sílica pode ser encontrada nas formas cristalina ou amorfa, onde cada uma destas formas apresenta propriedades físico-químicas intrínsecas à estrutura e superfície. A sílica apresenta um grande potencial de aplicação em eletroquímica devido às propriedades inerentes a esse material, como capacidade de adsorção, estabilidade

térmica, possibilidade de ser enxertada com uma variedade de grupos funcionais além da sua química de superfície^{46,47}.

O principal método de obtenção de materiais híbridos orgânico-inorgânicos à base de sílica é o método sol-gel¹³. Nesse método são utilizados precursores alcóxidos de silício que apresentam cinética lenta nas reações de gelificação, sendo possível um maior controle dos processos químicos envolvidos. Com isso, é possível manipular as condições de síntese do sistema a fim de se obter materiais com diferentes tamanhos e forma de partículas, volume e distribuição de tamanho de poros, área superficial específica, por exemplo.

As informações relatadas anteriormente podem ser também estendidas aos materiais compósitos à base de sílica, como por exemplo, os materiais carbono cerâmicos, onde o grafite é incorporado à rede da sílica pelo método sol-gel. Esse procedimento faz com que as partículas de grafite se distribuam na matriz cerâmica de forma homogênea, permitindo a obtenção de materiais com potencial aplicação para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos⁴⁸.

3.4. Método Sol-Gel

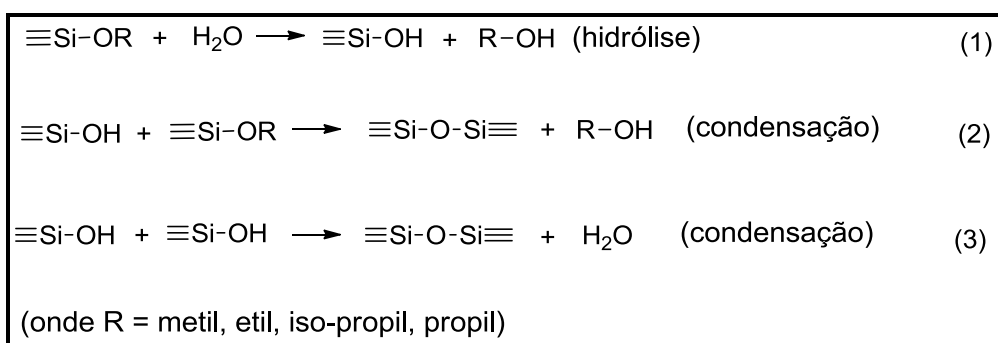
As primeiras investigações a respeito do método sol-gel para o desenvolvimento de materiais cerâmicos e vítreos foram feitas por Ebelman e Graham nos seus estudos sobre sílica gel⁴⁹. Em 1845 Ebelman reportou a formação de um material vítreo transparente obtido após a exposição do silano a partir da reação entre SiCl_4 e etanol⁵⁰. Em 1864, Graham descreveu o processo partindo de um sistema líquido, passando por um sistema gel obtendo-se por fim um sólido como método “sol-gel” (solução-gelificação)⁵¹. O sol é constituído de uma dispersão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 1000 nm) em um líquido e o gel é formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou por cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobilizam a fase líquida nos seus interstícios⁵².

Em 1930 Geffcen e Berger utilizaram o método sol-gel para propor a aplicação de camadas de óxidos em vidros por *dip-coating* usando combinações de precursores metálicos^{49,53}. No entanto, o método se consolidou nas décadas de 1960 e 1970 quando Roy e colaboradores reconheceram a potencialidade do método sol-gel para atingir níveis muito elevados de homogeneidade em géis coloidais, condição esta que não seria

alcançada pelos métodos tradicionais. Desde então, novos materiais vêm sendo desenvolvidos pelo método sol-gel^{49,53,54}.

O processo sol-gel mostra-se interessante para o desenvolvimento de materiais, como os híbridos e os compósitos, pela possibilidade de se obter novos materiais que apresentam sinergismo frente a seus componentes individuais além de possibilitar a combinação dos reagentes no nível molecular ou nanométrico¹³. Outras vantagens inerentes ao método são: (i) as sínteses podem ser realizadas a baixas temperaturas permitindo a incorporação de biomoléculas, (ii) a versatilidade do método torna possível a manipulação de características texturais, estruturais, de composição e até mesmo as características químicas das matrizes obtidas.

A metodologia de preparação de materiais via método sol-gel, parte de precursores moleculares, onde uma rede de óxido pode ser obtida via reações de hidrólise (1) e condensação (2 e 3) que ocorrem em solução, levando a formação de redes poliméricas. As reações químicas podem ser representadas pelas equações abaixo:



A reação (1) gera grupamentos silanóis a partir de grupos alcóxidos e, ambas as reações de condensação conduzem à formação da rede polimérica com produção de álcool (2) ou água (3). No decorrer do processo, as reações de gelificação levam à formação de um estado sol, que se caracteriza por apresentar oligômeros que formarão cadeias de dimensões coloidais e partículas primárias dispersas. A evolução desse processo forma o estado gel que apresenta conectividade entre as unidades de dimensões coloidais, formando uma rede tridimensional, entrelaçada macroscopicamente observável⁵².

As reações de hidrólise e condensação dos alcóxidos requerem o uso de catalisadores e, a escolha do catalisador influencia a estrutura do sol e por consequência,

a estrutura do gel formado. Esses diferentes arranjos dos silicatos se refletem na distribuição dos domínios de sílica nos híbridos. Encontra-se bem estabelecido que os catalisadores ácidos produzem estruturas mais lineares, enquanto estruturas mais ramificadas e condensadas são geradas com o uso de catalisadores alcalinos^{14,55}. Na gelificação em meio ácido de Bronsted, como reações principais, ocorre o ataque do ácido ao oxigênio ligado ao silício, Si – OH ou Si – OR, propiciando sua saída e, conseqüentemente, facilitando o ataque nucleofílico ao silício, de grupos H₂O no caso de hidrólise ou Si – OH para condensação¹³. Os mecanismos ocorrem de acordo com o esquema apresentado na Figura 1:

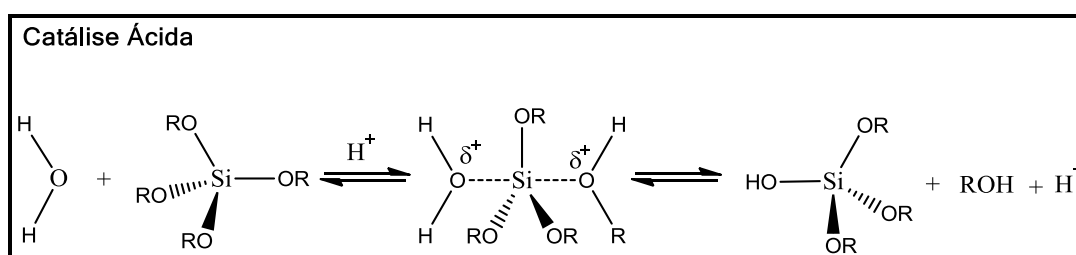


Figura 1. Esquema de reações de hidrólise e condensação pelo método sol-gel catalisadas por ácido. (Adaptada da referência ⁵⁵)

Assim, em meio ácido o ataque se dará preferencialmente ao oxigênio do alcóxido, que é mais abundante nas extremidades dos oligômeros. Nesse caso, a gelificação resultará em cadeias que se unem para formar géis poliméricos que após a secagem darão origem a uma matriz mais compacta com baixo volume de poro e cujo tamanho é, geralmente, menor que 2 nm de diâmetro, chamados microporos^{13,56}.

Por outro lado, se a catálise for realizada em meio básico as reações de hidrólise e condensação ocorrem segundo um mecanismo SN₂ (Figura 2) que se caracteriza inicialmente pelo ataque nucleofílico ao silício, por OH⁻ para hidrólise ou Si–O⁻ no caso de condensação, o ataque dar-se-á no silício mais ácido que é o mais reticulado.

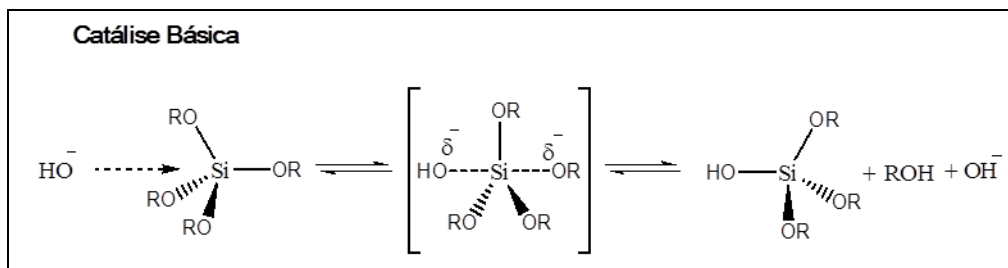


Figura 2. Esquema de reações de hidrólise e condensação pelo método sol-gel catalisadas por base. (Adaptada da referência 55)

Com isso, o gel tende a crescer mais esfericamente, formando partículas primárias esféricas. O gel resultante da interconexão das partículas primárias é chamado de gel coloidal que, após a secagem, resultará em matriz com maior porosidade que o gel polimérico, com largas frações de poros entre 2 e 50 nm de diâmetro, chamados mesoporos^{13,56}.

Outro catalisador bastante empregado é o ânion fluoreto, comumente usado na forma de HF, que pode ser utilizado tanto em meio ácido ou básico e tem se mostrado como o catalisador mais eficiente para o processo de gelificação. Apesar do mecanismo de sua ação não ser completamente compreendido, há um consenso que o fluoreto, por ser um ânion muito pequeno e difundir facilmente no sistema, inicia o processo, através de um ataque nucleofílico ao silício, coordenando-se a ele e promovendo as reações subsequentes¹³.

Embora o método sol-gel se mostre bastante versátil na síntese de novos materiais, o mesmo pode ser considerado relativamente complexo, envolvendo diversas variáveis, como tempo e temperatura de reação, natureza do catalisador, concentração dos reagentes, etc. Estas variáveis determinam as características finais dos materiais, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação, homogeneidade do produto, que levam a reprodutibilidade que só é alcançada com controle minucioso das condições de síntese. Ainda pode-se citar como desvantagens relativas ao uso deste método o (i) alto custo de alguns precursores, (ii) número limitado de precursores disponíveis e, (iii) longos tempos de processamento.

Considerando a versatilidade do método sol-gel é possível desenvolver um conjunto ilimitado de novos materiais com grandes possibilidades para aplicações conhecidas e outras a serem desvendadas. Dentro desta perspectiva, serão abordados os

materiais híbridos e carbono cerâmicos à base de sílica e suas aplicações no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

3.5. Materiais Híbridos à Base De Sílica

Materiais à base de sílica modificados com grupos orgânicos combinam em um único sólido, a estabilidade mecânica e a rigidez da matriz inorgânica com a reatividade química dos grupos orgânicos covalentemente ligados nos poros da matriz^{11,57,58}.

A modificação pode ocorrer nos grupos siloxanos (Si – O – Si) ou silanóis (Si – OH) que existem na superfície da sílica, no entanto, a reação com os grupos silanóis é o principal caminho para a modificação⁵⁹. As modificações dos silicatos com grupos orgânicos podem ser classificadas em duas categorias: (1) através da reação entre organossilanos ou moléculas orgânicas e os grupos funcionais presentes na superfície da sílica (*enxerto*), (2) através da incorporação de grupos orgânicos pelo processo sol-gel, no “*bulk*”, da matriz^{11,57,59}. Nesse caso, o processo de gelificação, apesar de semelhante ao equacionado em 1, 2 e 3, envolve a adição de novos constituintes que aumentam a complexidade do sistema, ou seja, também são adicionados precursores moleculares do componente orgânico¹³. A magnitude das interações entre os componentes do híbrido variam de acordo com a intensidade relativa das mesmas conforme Figura 3.

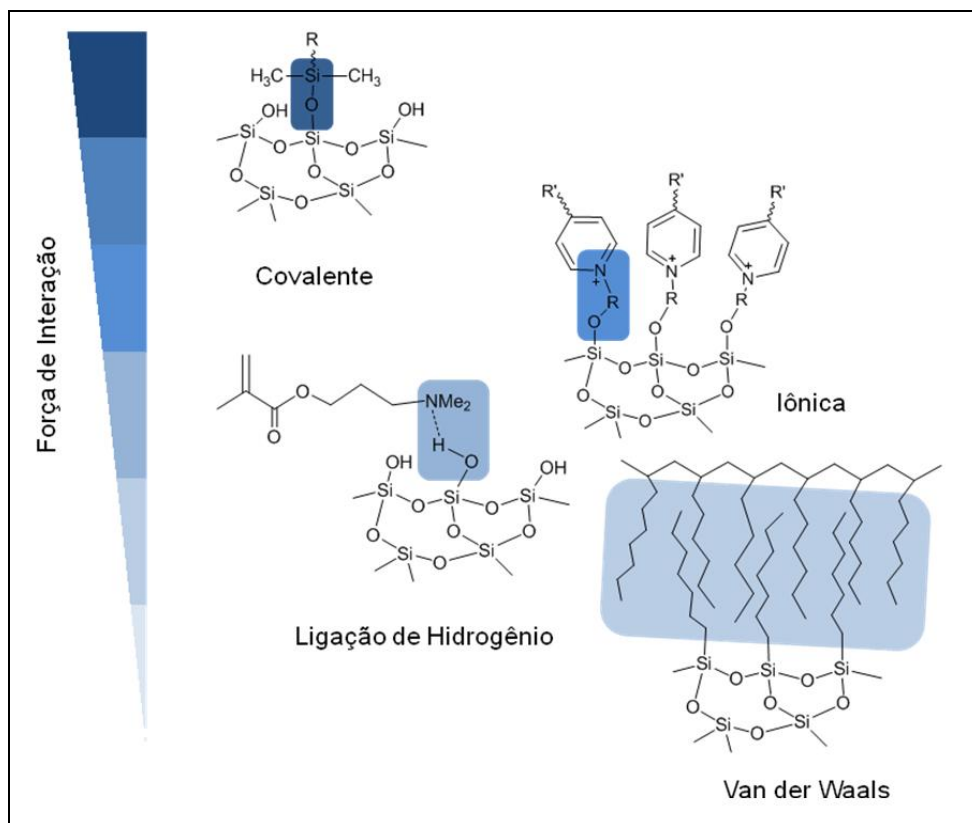


Figura 3. Interações típicas de materiais híbridos e a intensidade das mesmas (Adaptada da referência 60).

Os materiais híbridos podem ser classificados de acordo com a natureza da interação, entre os componentes inorgânico e orgânico, em duas classes⁶¹:

Classe I: São aqueles onde os componentes orgânico e inorgânico estão unidos por forças de menor intensidade, como: forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas. Durante o processo de policondensação do precursor inorgânico, as moléculas orgânicas ficam aleatoriamente dispersas, e no ponto de gel, ficam aprisionadas nos interstícios da rede inorgânica, permanecendo neles após a remoção do solvente (Figura 4a). Ou ainda, pela formação de duas redes independentes^{13,14,60}, a partir de precursores orgânicos e inorgânicos, adequadamente funcionalizados, sem ligação química entre as fases, conforme Figura 4b.

Classe II: Os híbridos pertencentes a essa classe mostram fortes interações químicas entre os componentes orgânico e inorgânico (Figura 4c).

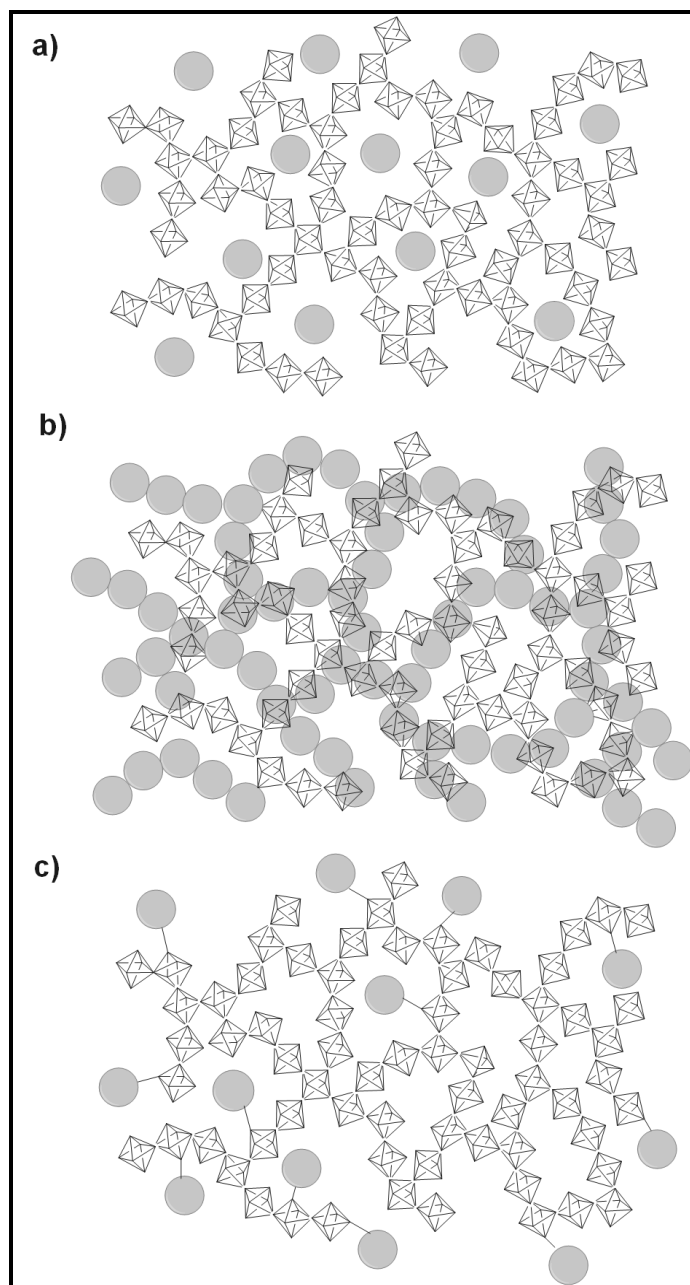


Figura 4. Diferentes tipos de materiais híbridos. (Adaptada das referências 13,60)

Os híbridos de classe II podem ser subdivididos em dois grupos distintos: i) aqueles formados a partir de precursores do componente orgânico que apresentem apenas um ponto de polimerização, que resultarão em um híbrido com o componente orgânico preso à matriz inorgânica na forma pendente, conforme representado na Figura 5a, onde R representa o grupo orgânico; ii) híbridos formados a partir de precursores do componente orgânico que contenham dois ou mais pontos de polimerização. Nesse caso, o componente orgânico encontra-se ligado à rede inorgânica formando pontes, conforme representado na Figura 5b.

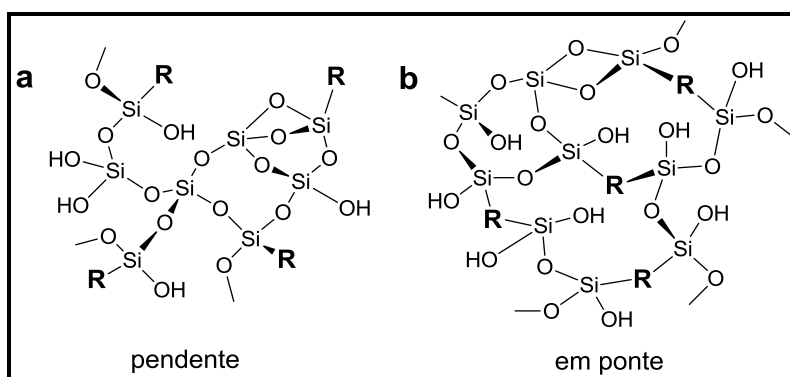


Figura 5. Representação híbridos de Classe II (Adaptada da referência 13).

Assim, é possível inserir grupos orgânicos na superfície da sílica por reações de enxerto ou em toda a rede (*bulk*). Os materiais produzidos por enxerto apresentam os grupos orgânicos distribuídos na superfície, sendo que a área específica é o fator limitante da quantidade de grupo orgânico que pode ser inserido. A organofuncionalização não altera as propriedades mecânicas da matriz, entretanto sua preparação requer maior número de etapas de síntese^{13,15}. No caso dos materiais híbridos, a preparação é feita em uma única etapa e não há um fator limitante na quantidade de orgânico adicionado, sendo possível arquitetar as propriedades finais do xerogel.

3.5.1. Sensores Eletroquímicos de Materiais Híbridos à Base de Sílica

Materiais híbridos orgânico-inorgânicos são considerados atraentes modificadores de eletrodos por várias razões^{10,12}. São geralmente sólidos muito porosos constituídos por um esqueleto inorgânico estável mecanicamente que exhibe elevadas áreas superficiais específicas ($200 - 1500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) e são suscetíveis à incorporação de um alto teor de grupos orgânicos (na faixa de mmol g^{-1}) acessíveis aos reagentes e analitos¹². Estruturas porosas abertas permitem um acesso rápido e efetivo às espécies imobilizadas na interface eletrodo/solução. Como a maior parte dos processos de transferência eletrônica é controlado por difusão, o acesso rápido às espécies imobilizadas conduz a uma elevada sensibilidade da resposta eletroquímica. Por outro lado, a escolha de grupos funcionais apropriados confere características diferenciadas ao

eletrodo modificado, como por exemplo reconhecimento/discriminação entre espécies alvo analito/interferentes, comportamento eletrocatalítico por meio de mediadores de transferência de carga ou ainda transporte de carga em meio confinado^{7,12,45,59,62}.

Deste modo, os híbridos orgânico-inorgânico à base de sílica oferecem inúmeras condições para modificação de eletrodos, no entanto, esses materiais são isolantes eletrônicos e precisam atuar acoplados a um condutor para que suas características possam ser exploradas nos processos eletródicos. De um modo geral, os eletrodos preparados com sílica organofuncionalizada são preparados de acordo com duas estratégias (1) dispersão do material sintetizado em uma matriz de compósito condutor, ou (2) a deposição dos materiais na superfície de eletrodos sólidos^{7,12}. Assim, a versatilidade do método sol-gel, mais uma vez pode ser explorada para preparar materiais planejados na sua composição, estrutura e propriedades, visando sua aplicação na construção de eletrodos. Adicionalmente, a possibilidade de imobilizar uma vasta gama de reagentes na superfície do eletrodo, incluindo grupos orgânicos, ligantes seletivos, catalisadores, compostos biológicos ou polímeros orgânicos, faz com que esses materiais contribuam para a diversificação de eletrodos quimicamente modificados^{7,11,12,58,59}.

Os dispositivos eletroquímicos à base de sílica organofuncionalizada podem ser resumidos em basicamente quatro tipos¹², são eles:

1. Filmes finos depositados sobre eletrodos sólidos;
2. Sílica organofuncionalizada modificando eletrodos de pasta de carbono;
3. Materiais carbono cerâmicos ou metais cerâmicos como eletrodos compósitos;
4. Membranas contendo sílica e polímeros sólidos.

Materiais híbridos orgânico-inorgânicos à base de sílica têm sido amplamente aplicados em eletroquímica. Dentre eles, estão os silsesquioxanos iônicos que podem ser utilizados como modificadores de eletrodos de pasta de carbono.

Parte 1



3.6. Silsesquioxanos

Assim como o termo silicato é utilizado para a repetição do monômero SiO_2 que constitui a sílica, o termo siloxano é utilizado quando se tem diferentes quantidades de grupos orgânicos modificando covalentemente a matriz inorgânica (sílica)¹⁴. Os siloxanos ou organossilanos⁶³ podem ser compostos por diferentes combinações de unidades de repetição (Figura 6): unidades M ($\text{R}_3\text{SiOR}'$), unidades D ($\text{R}_2\text{Si}(\text{OR}')_2$), unidade T ($\text{RSi}(\text{OR}')_3$). Os siloxanos M, D e T apresentam três, dois e um grupo orgânico substituinte, respectivamente.

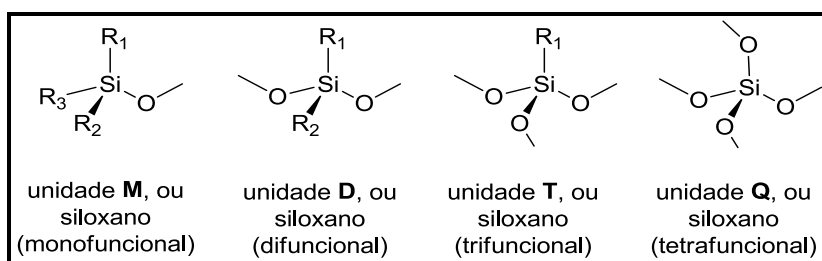


Figura 6. Monômeros encontrados nos diferentes tipos de siloxanos. (Adaptada da referência 14).

Os siloxanos compostos por unidades T, de fórmula empírica $\text{RSiO}_{3/2}$, são chamados silsesquioxanos^{60,63}. Os silsesquioxanos são materiais híbridos de classe II com alto teor de grupo orgânico, sendo que o grupo orgânico do organossilano pode estar ligado tanto na forma pendente ao silício como também formando ponte entre dois ou mais átomos de silício.

Além da forma como os grupos orgânicos estão dispostos na rede inorgânica, o grau de reticulação da rede influencia nas propriedades do híbrido. Se um grupo alcóxido (OR') é substituído por um grupo não hidrolisável (grupos R), o grau de reticulação diminuirá. Logo, a variação do conteúdo orgânico e do grau de reticulação pode levar a alterações na dureza, estabilidade térmica e solubilidade do material híbrido obtido^{63,64}.

Os silsesquioxanos têm sido aplicados em diferentes áreas. Devido a sua afinidade por matrizes inorgânicas podem ser aplicados como revestimentos em superfícies protetoras^{65,66} e também, em resinas dentárias⁶⁷, pois apresentam boa biocompatibilidade e dureza. Têm sido utilizados na estabilização estérea e eletrostática (caso o híbrido apresente cargas) de nanopartículas metálicas^{20,40}, como adsorventes⁶⁸, bem como no desenvolvimento de sensores eletroquímicos⁶⁹⁻⁷³.

O Laboratório de Sólidos e Superfícies (LSS), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, dedica-se na última década na síntese, caracterização e aplicação de novos silsesquioxanos iônicos. Os silsesquioxanos iônicos apresentam como componentes orgânicos grupos catiônicos na forma pendente e em ponte. Nessa perspectiva, destacam-se os precursores organossilanos cloreto de 1-azonia-4-azabicyclo[2,2,2]octano^{74,75} e cloreto de 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano²¹, representados na Figura 7.

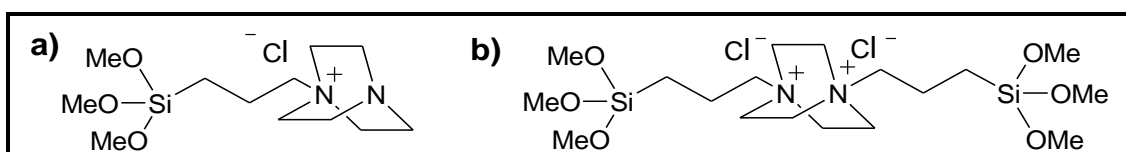


Figura 7. Precursores organossilanos sintetizados ou desenvolvidos no LSS (a) forma pendente, (b) em ponte.

Esses precursores formam silsesquioxanos iônicos que ao polimerizarem-se ou serem incorporados à rede de sílica, via método sol-gel, produzem híbridos com diferentes quantidades de grupos orgânicos pendentes ou em ponte na matriz de sílica, que influenciam na solubilidade dos mesmos em água^{21,74,75}. Quando a fase inorgânica está presente em maior quantidade no híbrido, verificou-se que a sua solubilidade em água diminui⁷⁵. Além da apreciável solubilidade em água apresentam a capacidade de aderir à superfície de substratos como óxido de alumínio, fibras de celulose, sílica ou superfícies vítreas formando filmes finos e estáveis e, dependendo do grupo orgânico presente na estrutura, o híbrido pode atuar como um forte trocador de íons⁷⁶⁻⁷⁸. Assim, esses híbridos à base de sílica apresentam não apenas a oportunidade de combinar importantes propriedades dos componentes orgânico e inorgânico, mas também o diferencial de criar novas composições com características únicas.

Alterando a solubilidade dos híbridos é possível aplicá-los como adsorventes de metais em soluções^{68,76,78,79}. Adicionalmente, os híbridos carregados podem servir de matriz para imobilizar espécies eletroativas para preparação de eletrodos⁷⁷. Os eletrodos preparados com esses modificadores apresentaram um aumento na sensibilidade e seletividade, características importantes aos sensores eletroquímicos^{11,21-24}. Na Tabela II são apresentados alguns trabalhos que utilizam os silsesquioxanos iônicos como modificadores de eletrodos para determinação de importantes analitos de interesse farmacêutico, ambiental e para a indústria alimentícia.

Tabela II. Exemplos de materiais utilizados como modificadores de eletrodos que contêm silsesquioxanos iônicos.

Modificador	Eletrodo Base	Analito	LD	Técnica	Referência
nAu-Si4Pic ⁺ Cl ⁻	GCE	o-nitrofenol	46 nmoL ⁻¹	DPV	[73]
		p-nitrofenol	55 nmoL ⁻¹		
AlSiPy/CoTsPc	CPE	Ácido oxálico	0,5 mmoL ⁻¹	CA	[71]
(SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₂ (SiPy ⁺ Cl ⁻ /GO _x /Nf)	FTO	Glicose	0,16 mmoL ⁻¹		[70]
GON/OA-POSS	GCE	1-hidroxipireno	0,04 μmoL ⁻¹	DPV	[72]
ALPO/SiPy ⁺ /CoTsPc ⁴⁻	CPE	Ácido oxálico	10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	CA	[69]
SiPy ⁺ Cl ⁻	CPE	Nitrito	1,86 μmoL ⁻¹	CV	[80]
Au-Py/AlSi	CPE	Nitrito	1,3μmoL ⁻¹	DPV	[22]
Au-Db/AlSi			3,0μmoL ⁻¹		
AuNP (citrate)	CPE	4-nitrofenol	70 nM	CA	[81]
AuNP (borohydride)			75 nM		
Si4Pic ⁺ Cl ⁻	CPE	Hidroquinona	10,0μmoL ⁻¹	DPV	[82]
		Catecol	10,0μmoL ⁻¹		

nAu-Si4Pic⁺Cl⁻: Nanopartículas de ouro-Cloreto de 3-n-propil-4-picolina silsesquioxano;

AlSiPy/CoTsPc: Al₂O₃Cloreto de 3-n-propil(metilpiridínio)silsesquioxano/ftalocianinatetrasulfonada de Cobalto(II);

(SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂(SiPy⁺Cl⁻/GO_x/Nf): (cloreto de 3-n-propil(metilpiridínio)silsesquioxano/ftalocianinatetrasulfonada de Cobre(II))(cloreto de 3-n-propil(metilpiridínio)silsesquioxano/Glucose Oxidase/Nafion);

GON/OA-POSS: Óxido de grafeno/ octahidrocloreto de octa(3-aminopropil)octasilsequioxano; ALPO/SiPy⁺/CoTsPc⁴⁻: AlPO₄/ Al₂O₃Cloreto de 3-n-propil(metilpiridínio)silsesquioxano/ ftalocianinatetrasulfonada de Cobalto(II); SiPy⁺Cl⁻: Cloreto de 3-n-propil(metilpiridínio)silsesquioxano;

Au-Py/AlSi: Nanopartículasde ouro-Cloreto de 3-n-propil(metilpiridínio)silsesquioxano/Sílica modificada com alumina;

Au-Db/AlSi: : Nanopartículasde ouro- cloreto de 1-azonia-4-azabicyclo[2.2.2]octano silsesquioxano/Sílica modificada com alumina;

AuNP (citrate): Nanopartículas de ouro estabilizadas por propil imidazol silsesquioxano (citrato como redutor);

AuNP (borohydride): Nanopartículas de ouro estabilizadas por propil imidazol silsesquioxano (borohidreto como redutor).

Si4Pic⁺Cl⁻: 3-n-propil-4-picolina silsesquioxano.

GCE: Eletrodo de carbono vítreo;

CPE: Eletrodo de Pasta de Carbono;

FTO: óxido de estanho e flúor;

DPV: Voltametria de Pulso diferencial;

CA: Cronoamperometria;

CV: Voltametria Cíclica.

LD: Limite de detecção.

3.7. Pesticidas

Segundo a IUPAC⁸³, pesticidas são substâncias ou mistura de substâncias utilizadas na produção, colheita ou no armazenamento de alimentos. Eles são bioativos e capazes de prevenir, destruir ou combater espécies indesejáveis que, de alguma maneira, possam interferir na produção, no processamento, armazenamento, transporte e estocagem de alimentos, produtos agrícolas em geral, madeira e produtos derivados de madeira.

O uso de pesticidas aumenta a produção agrícola, limitando os danos causados por pragas, mas pode levar ao acúmulo de resíduos tóxicos em alimentos, poluição do solo, ar, água, além de prejudicar animais e os seres humanos⁸⁴. Os pesticidas podem ser compostos por diversas classes químicas como compostos organoclorados, carbamatos, organofosforados, piretróides, derivados de uréia, bupiridílios e nitrocompostos⁸⁵, sendo que os organofosforados e organoclorados são considerados os mais tóxicos. Os organoclorados apresentam elevada estabilidade e capacidade de bioacumulação, enquanto que os organofosforados são menos persistentes no ambiente que os organoclorados. Entretanto, os organofosforados possuem efeito tóxico mais agudo para seres humanos e outros mamíferos, pois são inibidores da enzima acetilcolinesterase que regula a acetilcolina, um neurotransmissor necessário para o funcionamento adequado do sistema nervoso, podendo causar paralisia respiratória e morte⁸⁶.

Dentre os pesticidas organofosforados destaca-se o metil paration (Tiofosfato de O,O-dimetil,O-p-nitrofenil), um importante pesticida utilizado na agricultura e saúde pública em substituição ao seu análogo etil, o paration, que foi banido em diversos países devido a sua alta toxicidade para mamíferos. No entanto, com Classificação Toxicológica I, o metil paration foi considerado pela Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency – EPA*)²⁵, como um pesticida altamente tóxico^{26,27} e de uso restrito nos Estados Unidos.

Utilizado no controle de insetos como pulgões, ácaros e cigarrinhas que atacam diversos tipos de culturas, o metil paration foi primeiramente registrado em 1954^{27,87}. É usado principalmente para o controle do bicudo-do-algodoeiro em culturas de algodão. No Brasil apresenta aplicação foliar nas culturas de algodão, alho, arroz, batata, cebola, feijão, milho, soja e trigo⁸⁸.

Após absorvido o metil paration pode ser bioativado para a sua forma mais tóxica, o metil paraoxon. O metabolismo subsequente deste pesticida em humanos pode

resultar na excreção urinária do dimetil tiofosfato, do dimetil fosfato e do *p*-nitrofenol, na forma de fenol livre, glucuronídeo conjugado ou éster sulfato, conforme Figura 8.

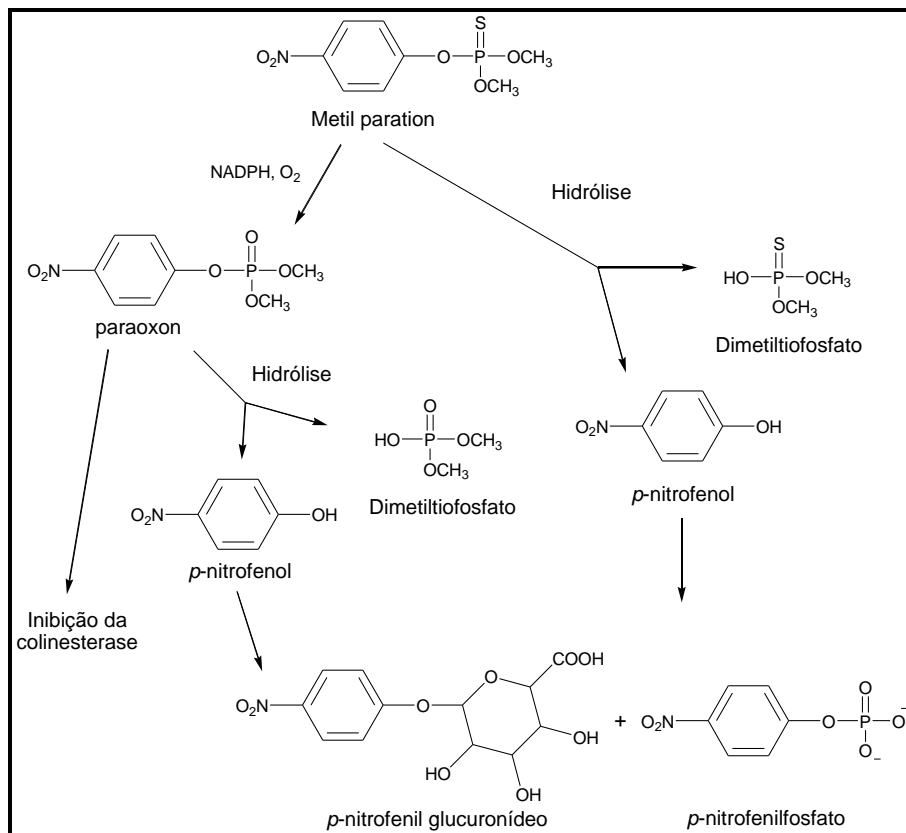


Figura 8. Metabolismo do pesticida metil paration em humanos. (Adaptada da referência 89).

Parte 2



3.8. Materiais Carbono Cerâmicos

Os materiais híbridos à base de sílica geralmente apresentam porosidade e por isso, determinam uma área de reação muito superior à superfície externa do eletrodo. Quando espécies eletroativas são imobilizadas em materiais híbridos porosos, o número de sítios ativos disponíveis aumenta, melhorando a velocidade de transferência eletrônica e a sensibilidade do eletrodo⁶⁻⁸. No entanto, a maior desvantagem dessa classe de materiais é que apresenta considerável resistividade, o que em princípio limita sua utilização nos processos eletroquímicos⁹⁰. Esses materiais podem ser aplicados com esse propósito quando incorporados em eletrodos de pasta de carbono ou dispersos na superfície de metais. Embora os eletrodos de pasta de carbono apresentem bons resultados, sua resistência mecânica é baixa, o que limita seu uso por um longo período de tempo⁹¹. Adicionalmente, os eletrodos de elementos condutores, como ouro, platina e grafite, são pouco reativos, o que impõe limitação ao processo eletroquímico. Como alternativa, os eletrodos carbono cerâmicos foram propostos em meados da década de 1990⁹². Esses materiais compósitos aliam as características de alta resistência mecânica, química e térmica da sílica com as propriedades de condução eletrônica do carbono grafite ou outros materiais contendo carbono, como por exemplo, nanotubos. Os materiais carbono cerâmicos são obtidos pela dopagem com carbono da matriz de sílica pelo método sol-gel, garantindo uma distribuição homogênea do carbono na rede da sílica, conforme representado na Figura 9.

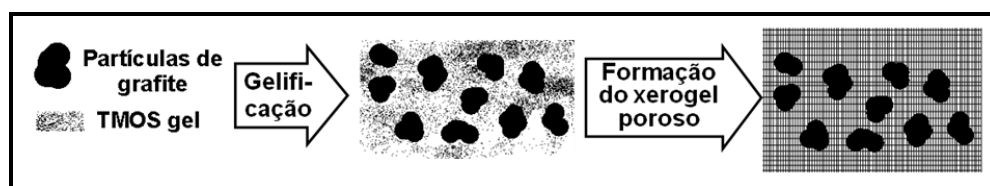


Figura 9. Esquema de preparação do Material Carbono Cerâmico (Adaptada da referência 7).

A vantagem do uso desses materiais quando comparados a outros eletrodos à base de carbono é a combinação das características do processo sol-gel levando a síntese de materiais com características desejáveis para serem aplicados como sensores eletroquímicos, (como elevada área superficial e porosidade controlada) com a

condutividade dos materiais contendo carbono. Os eletrodos carbono cerâmicos, assim como os de pasta de carbono, apresentam a possibilidade de superfície renovável, no entanto, são mais robustos e possuem maior estabilidade. Além disso, esse método possibilita a obtenção de materiais com diferentes configurações tais como: pastilhas, incorporação em tubos de vidro, microeletrodos, entre outras⁹³.

As propriedades físicas (área superficial específica, distribuição e tamanho médio de poros) do material híbrido obtido pelo método sol-gel dependerão dos parâmetros usados na síntese. A natureza e concentração do catalisador, o precursor alcóxido escolhido e a razão molar água:silano afetará fortemente nas reações de hidrólise e condensação o que, por sua vez, ditará as propriedades finais do material⁹⁰. Desta forma, a incorporação de espécies eletroativas nos eletrodos carbono cerâmicos é relativamente fácil e interessante, o que aumenta a possibilidade de aplicação desses materiais em dispositivos eletroanalíticos. Uma dessas estratégias está na modificação desses materiais utilizando-se espécies mediadoras de elétrons tais como enzimas⁹⁴⁻⁹⁷, complexos inorgânicos⁹⁸⁻¹⁰⁰ e orgânicos^{91,101-103} e óxidos metálicos¹⁰⁴. Estes mediadores agem como eletrocatalisadores facilitando o processo de transferência de elétrons, diminuindo os valores de potenciais aplicados. Conseqüentemente, a modificação pode proporcionar ao eletrodo características que favorecem um aumento na sua sensibilidade e a seletividade em relação aos eletrodos não modificados¹⁰⁵. Na Tabela III são apresentadas as características de alguns sensores eletroquímicos à base de carbono cerâmico.

Tabela III. Trabalhos utilizando Eletrodos Carbono Cerâmicos para detecção de analitos de interesse.

Modificador	Analito	Faixa de Resposta Linear	Sensibilidade	LD	Ref.
CCE	DA	0,5 – 50 μM	0,0414 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	0,07 μM	[105]
	AU	1 – 50 μM	0,0303 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	0,4 μM	
	AA	5 – 1000 μM	8,5 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	1,7 μM	
	AD	0,5 – 100 μM	0,044 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	0,07 μM	
SiO ₂ /SnO ₂ /CCE/ SiMePyCl	NO ₂ ⁻	1,3×10 ⁻⁵ – 1,3×10 ⁻³ M	4×10 ⁻² A M ⁻¹	3,3×10 ⁻⁶ M	[104]
Nafion/ PbNP/CCE	Cys	10 ⁻⁶ – 6,72×10 ⁻⁵ M	0,17 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	0,46 μM .	[100]
CCE/ K ₄ [Mo(CN) ₈] +Ni	Insul	0,5 – 500 nM	6140 nA μM^{-1}	0,45 nM	[99]
HRP/FCA/CCE/PPy/ GOD	Glic	8 ×10 ⁻⁵ – 1,3 ×10 ⁻³ M	1,11 $\mu\text{A mM}^{-1}$	1×10 ⁻⁵ M	[96]
GOD/CCE/Luminol	Glic	10 μM – 10 mM		8,16 μM	[97]
SiO ₂ /C/CoPc	AO	3,98 ×10 ⁻⁵ – 4,6 ×10 ⁻⁴ M		0,58 μM	[91]
SGN/NiPc	DA	40 – 1080 μM	104,17 $\mu\text{A mM}^{-1}$	0,26 μM	[101]
	AA	90 – 2110 μM	53,02 $\mu\text{A mM}^{-1}$	0,45 μM	
SiO ₂ /C/CoPc	O ₂	0,5 – 6,6 mg L ⁻¹	2,16 $\mu\text{A L mg}^{-1}$	0,01 mg L ⁻¹	[102]

SiO₂/SnO₂/CCE/ SiMePyCl : cloreto de 3-n-propil-4-picolina silsesquioxano.

CCE/RNSH: CCE/5-(4-dimetilaminobenzoil)rodanina

CCE/ K₄[Mo(CN)₈] +Ni: pó de níquel e octacianomolibdato (IV) de potássio.

HRP/FCA/CCE/PPy/GOD: Horseradish Peroxidase/ Ácido Ferrocenocarboxílico / Eletrodo Carbono Cerâmico / Polipirrol/Glicose Oxidase.

GOD/CCE/Luminol: Glicose Oxidase/ Eletrodo Carbono Cerâmico/Luminol.

SiO₂/C/CoPc: Eletrodo Carbono Cerâmico/Ftalocianina Tetrassulfonada de Cobalto (II).

SGN/NiPc: Eletrodo Carbono Cerâmico (ácido nítrico como catalisador)/Ftalocianina Tetrassulfonada de Níquel (II).

DA: Dopamina.

AU: Ácido úrico.

AA: Ácido Ascórbico.

D: Adrenalina.

Insul: Insulina.

AO: ácido oxálico.

Glic: Glicose.

Cys: L- Cisteína.

3.9. Biossensores Eletroquímicos

O primeiro biossensor desenvolvido por Clark e Lions em 1962 era conhecido como eletrodo enzimático¹⁰⁶. Esse biossensor utilizava a glicose oxidase imobilizada em uma membrana de acrilamida, em eletrodos de Pt e detectava o consumo de oxigênio sob altos potenciais de redução. Assim, quantificou-se a variação da concentração de oxigênio dissolvido que, por sua vez, era proporcional à concentração de glicose¹⁰⁷. Desde então, diversos tipos de biossensores têm sido preparados visando os mais diversos tipos de análises clínicas, praticidade e resultados mais rápidos e precisos.

Em particular, quando biomoléculas (enzimas, anticorpos) são incorporadas aos materiais modificadores de eletrodos, os sensores eletroquímicos são chamados de biossensores eletroquímicos. Os biossensores têm como principal característica a capacidade de combinar a atividade seletiva de um elemento de reconhecimento biológico, sensível a um analito de interesse, e um transdutor que converte um sinal biológico em elétrico¹⁰⁸(Figura 10).

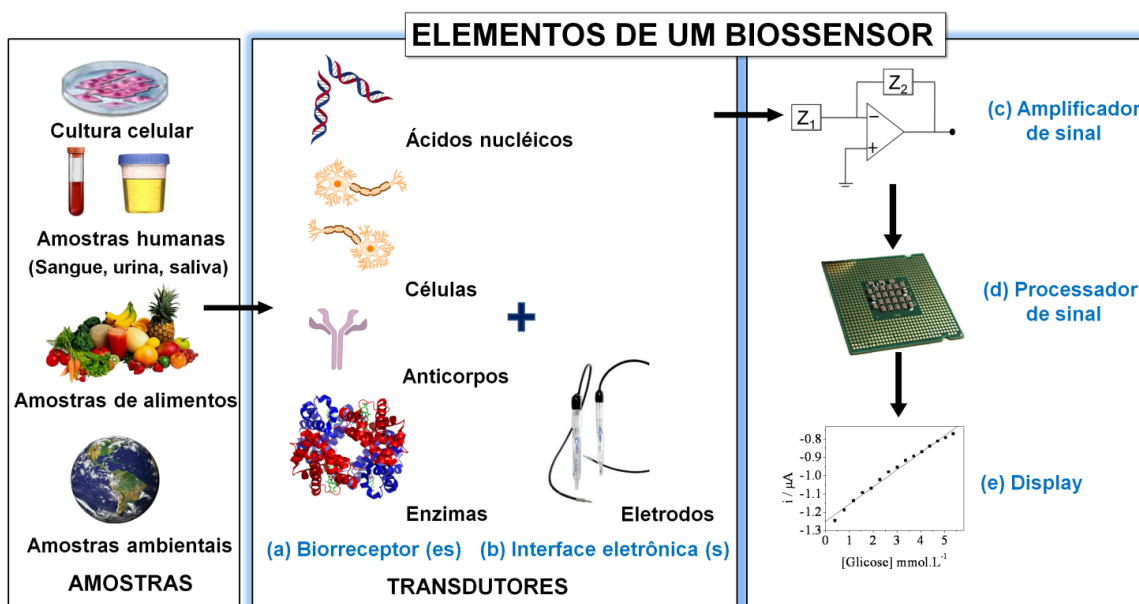


Figura 10. Esquema dos elementos que compõem um biossensor eletroquímico.

As espécies biorreceptoras mais comumente utilizadas no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos são as enzimas¹⁰⁸. Enzimas são biocatalisadores com excelentes propriedades tais como elevadas seletividade e especificidade, que lhes permite realizar uma grande variedade de processos químicos sob diversas condições

reacionais¹⁰⁹. Sua função metabólica exerce influência específica sobre certas interações bioquímicas, usualmente em ambientes muito complexos como no interior de células e incluem transformações oxidativas e conjugativas que ocorrem em altas velocidades catalíticas e com reações altamente regioseletivas ou estereosseletivas¹¹⁰. A especificidade enzimática baseia-se nas interações entre a molécula do substrato/inibidor e o sítio ativo da enzima, como por exemplo, as ligações de hidrogênio, as interações de Van der Waals e as interações eletrostáticas. Isto ocorre somente quando várias dessas interações acontecem simultaneamente entre as duas moléculas (enzima e substrato/inibidor) em uma estrutura tridimensional¹⁰⁹.

Já os transdutores, usados para converter o sinal bioquímico resultante da interação entre o analito e o biorreceptor, geram um sinal elétrico proporcional a concentração do analito. Esses sistemas oferecem vantagens como baixo custo, simplicidade e possibilidade de miniaturização¹⁰⁸. No entanto, o fator determinante para o bom desempenho do biossensor é a imobilização enzimática que deve conferir estabilidade operacional e de armazenamento, resposta rápida, altas sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade^{108,111}.

3.10. Imobilização Enzimática

Enzimas imobilizadas são definidas, segundo a IUPAC, como àquelas que se encontram fisicamente confinadas ou localizadas em determinada região do espaço com retenção da sua atividade catalítica e que podem ser usadas repetida e continuamente¹¹². As matrizes devem conter uma grande quantidade de enzima ativa para serem utilizadas como eletrodos⁴, conferindo maior estabilidade e maior eficiência se comparadas às enzimas em solução¹¹³. Além disso, deve-se buscar um aumento no tempo de vida dos biossensores, controlando a temperatura e a variação de pH, sem que ocorra uma perda considerável da atividade catalítica. Neste caso, há a possibilidade de reutilização da enzima, tornando-a mais resistente às mudanças ambientais.

O melhor método dependerá da especificidade da aplicação do biossensor, podendo ser explorada a sensibilidade ou a estabilidade. A reprodutibilidade, custo e a facilidade do método de imobilização também devem ser considerados. A sensibilidade normalmente diminui com a imobilização da enzima, pois pode haver desnaturação ou mudanças conformacionais, especialmente no sítio ativo. Eletrodos com melhor

sensibilidade são obtidos com a imobilização orientada de enzimas sobre a superfície do transdutor ou pelo uso de espaçadores entre a enzima e o suporte através da ligação covalente. Isso ocorre porque enzimas orientadas corretamente expõem seus sítios ativos ao analito presente em solução e o uso de espaçadores pode evitar impedimento estéreo e promover maior mobilidade das enzimas imobilizadas. A distribuição aleatória ou com baixo grau de orientação das moléculas de enzima acarreta uma perda parcial ou total da atividade enzimática devido à desnaturação ou bloqueio do sítio ativo. Assim, cada método apresenta vantagens e desvantagens e a escolha mais apropriada dependerá da natureza da enzima, do transdutor e do modo de detecção. Os métodos de imobilização difundidos são: adsorção, ligação covalente, encapsulamento, *crosslinking* ou afinidade (Figura 11)¹⁰⁸.

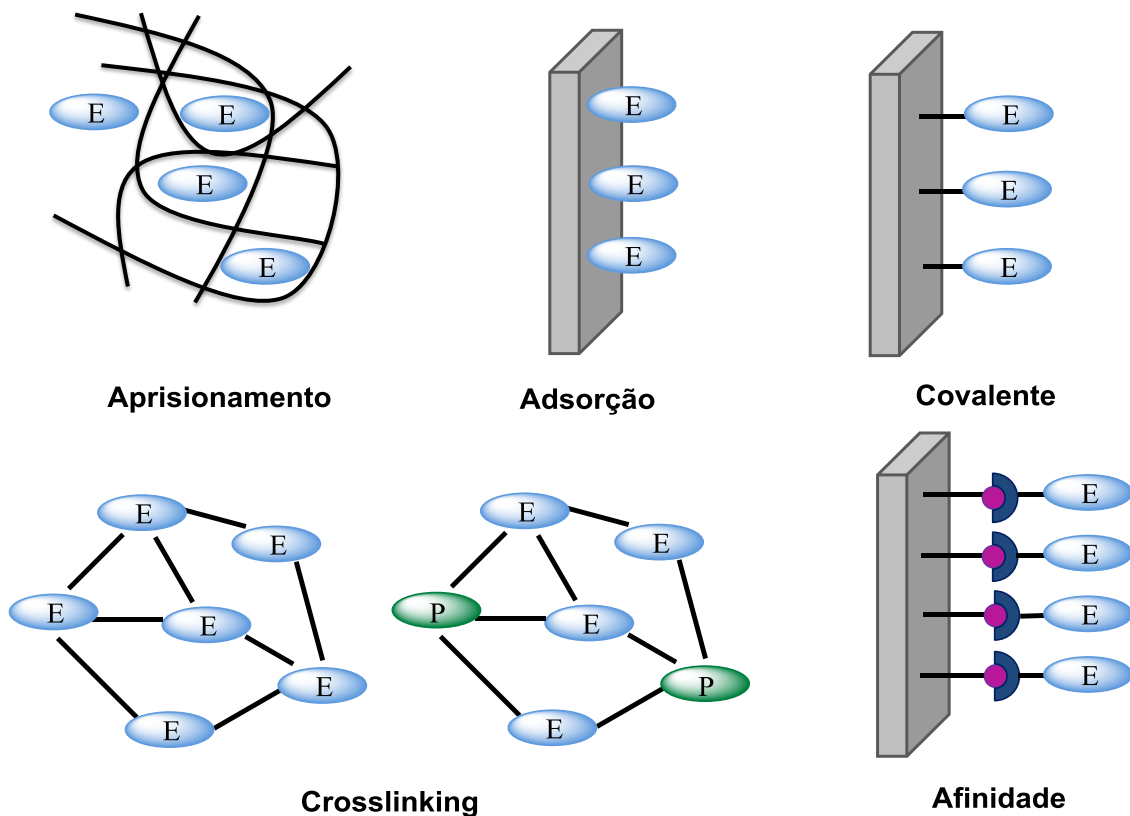


Figura 11. Representação dos diferentes métodos de imobilização enzimática. E: Enzima, P: Proteína inerte. (Adaptada referência 108).

A *adsorção* física de enzimas em suportes sólidos apresenta facilidade na estratégia de imobilização, tendo em vista que o suporte sólido é colocado em contato com o meio enzimático por um período de tempo. Após, a enzima não adsorvida é removida por

lavagem. Os mecanismos de adsorção são baseados em ligações fracas, como forças de Van der Waals. Esta técnica não envolve qualquer funcionalização do suporte e é geralmente não destrutiva para enzima, promovendo pouca ou nenhuma inativação. A desvantagem desta técnica é a possibilidade de dessorção da enzima com mudanças de temperatura, pH e força iônica, visto que se encontram ligadas fracamente ao suporte. Com isso, biossensores baseados em enzima adsorvida são normalmente instáveis e apresentam pouca estabilidade operacional e de armazenamento. Outra desvantagem seria a adsorção não específica de outras proteínas ou substâncias^{108,110,114}.

Enzimas podem ser *aprisionadas/encapsuladas* em matrizes tridimensionais e, nesse caso, destaca-se o método sol-gel que tem se mostrado biocompatível para a imobilização de proteínas e também no preparo de colunas de bioafinidade^{108,110,114}. A enzima é misturada aos precursores moleculares que formarão a matriz e, após as reações de condensação, ficará aprisionada fisicamente na matriz. A porosidade da matriz deve evitar a perda de enzima e ao mesmo tempo permitir o livre movimento do substrato e do produto¹¹⁵.

Biossensores baseados no aprisionamento de enzimas apresentam melhor estabilidade operacional e de armazenagem quando comparados aos que utilizam o método da adsorção. No entanto, ainda existem limitações como lixiviação do biocomponente ou barreiras difusionais^{108,110,114,115}.

A imobilização por *crosslinking* é livre de suporte, e as enzimas estão ligadas umas às outras, ou a proteínas inativas como gelatina ou albumina, formando uma estrutura tridimensional complexa. Pode ser obtida via métodos físicos ou químicos. Quando obtidas por métodos químicos são resultantes das ligações covalentes entre as enzimas e são favorecidas pelo uso de agentes bi ou multifuncionais. Como desvantagens do método estão a baixa retenção da atividade e a baixa estabilidade mecânica, que dificulta sua aplicação industrial, além de pouca reprodutibilidade^{108,110,114,115}.

A imobilização de enzimas via *ligação covalente* é o método mais comum para o desenvolvimento de biossensores. Para esta finalidade, as enzimas estão ligadas à superfície dos suportes através de grupos funcionais que não são essenciais para sua atividade catalítica. A ligação é geralmente realizada por ativação inicial da superfície usando reagentes bi ou multifuncionais, como por exemplo, glutaraldeído ou carbodiimida, seguido pela ligação da enzima^{108,110,114}.

3.11. Classificação dos Biossensores Eletroquímicos

A escolha do método para a imobilização da enzima na superfície do eletrodo está relacionada com o desempenho do biossensor pelo fato de melhorar a estabilidade sem comprometer a atividade catalítica da biomolécula. O acoplamento eletrônico entre as enzimas redox e eletrodos para a construção de biossensores pode ser baseada na eletroatividade do substrato enzimático ou dos produtos (biossensores de primeira geração); a utilização de mediadores redox, livre em solução ou imobilizados com a biomolécula (biossensores de segunda geração), ou transferência eletrônica direta (TED) entre o sítio ativo e a superfície do eletrodo (biossensores de terceira geração)¹¹⁶. A Figura 12 mostra uma representação esquemática destas diferentes abordagens para o desenvolvimento de biossensores.

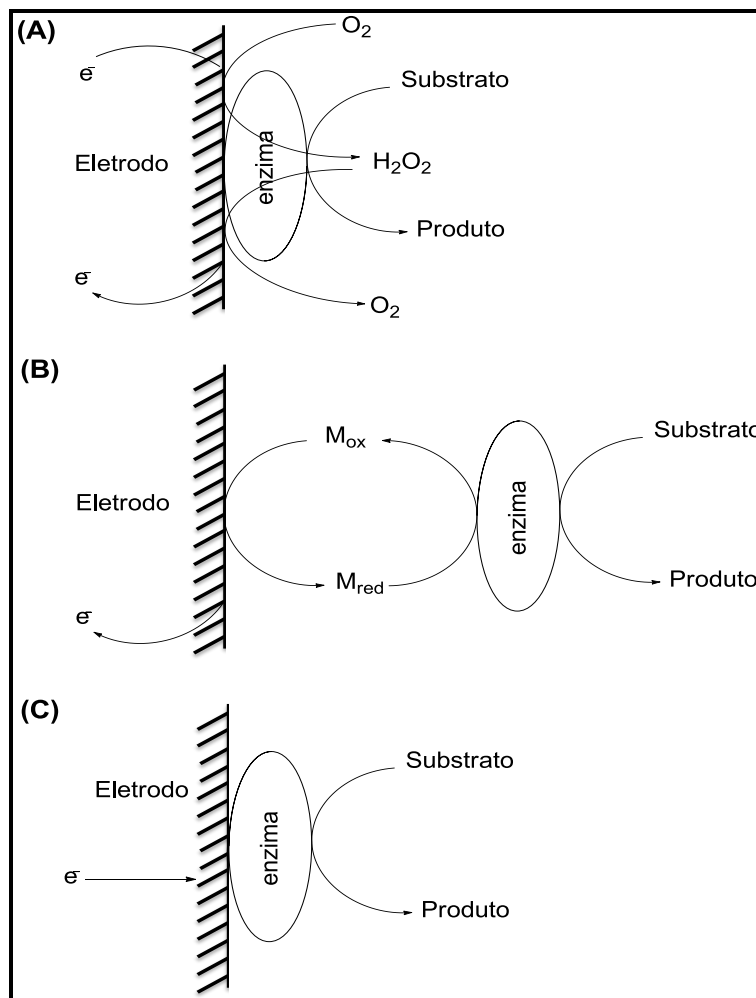


Figura 12. Representação esquemática da Evolução dos Biossensores: (A) primeira geração, (B) segunda geração e (C) terceira geração (Adaptada da referência 116).

Os sensores eletroquímicos de *primeira geração* baseiam-se no monitoramento direto da depleção de um dos substratos ou da acumulação de um dos produtos enzimáticos. O inconveniente nesse tipo de dispositivo é que operam em altos potenciais apresentando interferência de outras espécies¹¹⁷. Na tentativa de diminuir esses potenciais surgiram os eletrodos de *segunda geração* que empregam pequenas moléculas eletroativas (por exemplo, derivados do ferroceno, ferrocianeto, sais orgânicos condutores e quinonas), que podem reagir com o sítio ativo da enzima e com a superfície do eletrodo, transportando os elétrons. Para atuar como um bom mediador eletrônico, as espécies devem atender a alguns pré-requisitos: (1) reagir rapidamente com a enzima reduzida para minimizar a competição com o oxigênio; (2) possuir boas propriedades eletroquímicas, como baixo potencial operacional; (iii) possuem baixa solubilidade em meio aquoso; (iv) ser atóxico e quimicamente estável em ambas as formas reduzidas e oxidadas¹¹⁸.

O uso de mediadores entre a enzima e o eletrodo diminui o potencial aplicado, no entanto, esta configuração pode apresentar problemas de interferências, uma vez que este arranjo pode facilitar também a transferência de elétrons proveniente de reações redox paralelas à reação entre a enzima e o substrato^{8,116,117,119}.

Com o intuito de superar estes problemas surgiram os eletrodos de *terceira geração* que são baseados na transferência direta de elétrons entre enzima e eletrodo na ausência de mediadores, sendo esta uma característica que os torna bastante vantajosos, já que promove uma maior seletividade a medida que eles operam em potenciais mais próximos ao da própria enzima, diminuindo como consequência reações de interferentes. Além disso, dispensam o uso de outros reagentes na sequência das reações enzimáticas.

Desta forma, o melhor funcionamento dos biossensores amperométricos, dependerá da facilidade da transferência de elétrons do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo^{8,116,117,119}.

3.12. Glicose Oxidase (GOx)

As enzimas são componentes de extrema importância para a fabricação de biossensores como elementos de reconhecimento biológico pela alta sensibilidade e seletividade que as reações enzimáticas apresentam. Uma das enzimas amplamente

estudadas para esse fim é a Glicose Oxidase (GOx)^{28,120}. Essa enzima tem atraído especial atenção devido a sua aplicação em diferentes áreas incluindo a indústria alimentícia e têxtil, células biocombustíveis e especialmente para o controle da *Diabetes Mellitus* doença que acomete a saúde pública mundial^{30,118,121}.

A GOx é um homodímero com aproximadamente 160 kDa^{30,122} que catalisa a oxidação da β -D-glicose pelo oxigênio molecular em glucono- δ -lactona, o qual subsequente e espontaneamente se hidrolisa em ácido glucônico, gerando nessa hidrólise peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O sítio ativo dessa enzima é composto pelo cofator Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) o qual é reduzido a FADH₂ durante o processo catalítico³⁰. Na Figura 13 é mostrada a reação de oxidação da glicose pela GOx.

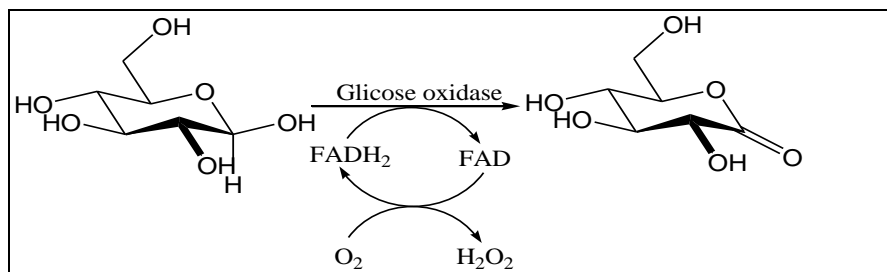


Figura 13. Oxidação de glicose pela ação da enzima glicose oxidase (adaptada da referência 30).

A respeito da sua estrutura, uma unidade monomérica da GOx possui o formato esferóide e compacto com dimensões 6,0 x 5,2 x 3,7 nm e o diâmetro médio da GOx é 8 nm¹²³. O pH ótimo da glicose oxidase é 5,5, entretanto possui uma faixa de boa atividade entre pH 4-7. O seu ponto isoelétrico é 4,2¹²³. A Figura 14 representa a simulação computacional da molécula de GOx com o seu cofator, obtida a partir do fungo *Aspergillus niger* através de um modelo de fitas¹²⁴.

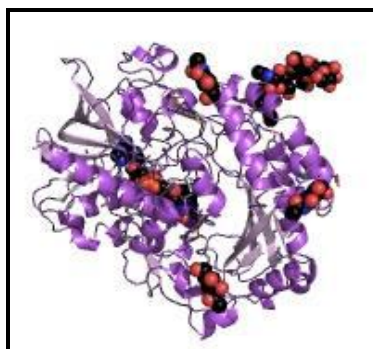
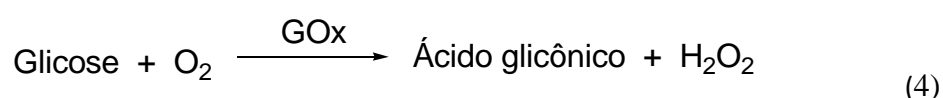


Figura 14. Estrutura de fitas representando a enzima glicose oxidase.

3.13. Biossensores para Glicose

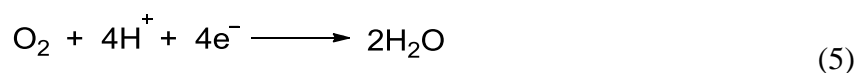
O primeiro biossensor descrito foi proposto por Leyland J. Clark, no início da década de 1960 e utilizava a enzima GOx para a determinação de glicose^{106,117}. Este trabalho resultou na comercialização do primeiro sensor eletroquímico para determinar glicose no sangue, fabricado pela Yellow Springs Instrument (YSI)^{29,117}, usando apenas 25 µL de amostra de sangue¹¹⁶.

O eletrodo enzimático de “Clark” baseia-se na oxidação por catálise enzimática da glicose pela GOx conforme equação 4



Clark e colaboradores descreveram dois sensores de glicose com base em princípios de primeira geração que utilizam a reação da GOx (Equação 4). Esses sensores valiam-se da redução amperométrica do O₂ em um eletrodo de trabalho de platina catodicamente polarizado (Equação 5):

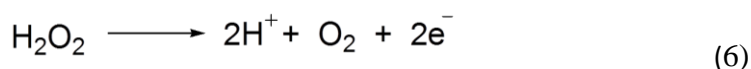
- 700mV vs Ag/AgCl



Porém, esse método é suscetível a flutuações nos níveis de O₂ no ambiente, que podem em condições desfavoráveis, levar a resultados não confiáveis. O sensor consiste em um eletrodo de oxigênio, com a GOx imobilizada sobre a membrana de Teflon seletiva de oxigênio.

O segundo método preconizado por Clark baseava-se no monitoramento de H₂O₂ produzido pela oxidação da glicose catalisada por enzima, de acordo com a Equação 6. Nesse arranjo, o H₂O₂ pode ser amperometricamente oxidado em um eletrodo de platina anodicamente polarizado e proporciona respostas que, em determinada faixa de concentração, podem ser relacionadas diretamente à concentração de glicose.

+ 650 mV vs Ag/AgCl



No entanto, o sítio ativo da enzima GOx que contém o cofator FAD está ocluído por uma camada espessa de proteína e isto dificulta a transferência eletrônica direta entre a enzima e o eletrodo. Para melhorar a velocidade de transferência eletrônica são empregados os eletrodos de segunda geração que utilizam mediadores de elétrons que têm a função de estabelecer o contato elétrico entre o centro redox da enzima, nesse caso o FAD e a superfície do eletrodo^{29,118}.

Um exemplo prático de biossensor que utiliza um mediador é a série ExacTech de sensores portáteis de glicose comercializada pela Medisense®. Esse sensor é muito bem sucedido comercialmente, pois revolucionou o tratamento da diabetes para muitos pacientes já que o monitoramento do nível de glicose no sangue pode ser feito, em casa ou no trabalho, com um método extremamente simples¹¹⁷. O biossensor utiliza a oxidação enzimática da glicose, na presença do mediador ferroceno que age como receptor de elétrons no lugar do oxigênio molecular (Figura 15).

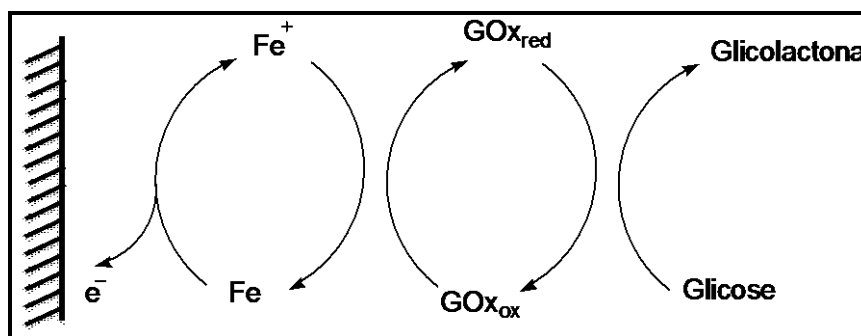


Figura 15. Ferroceno agindo como receptor artificial de elétron em lugar do O₂ para a GOx. (Adaptada das referências 29,118).

Todavia, os biossensores de terceira geração têm sido propostos considerando os benefícios que podem trazer ao sistema, como por exemplo, a minimização da resposta de interferentes devido aos baixos potenciais aplicados. Nessa perspectiva, o uso de diferentes nanomateriais tem sido relatado para facilitar e melhorar a TED entre o sítio redox protegido pela camada proteica e a superfície do eletrodo. Materiais nanométricos

condutores podem penetrar a camada proteica da GOx e promover a transferência de elétrons¹²⁵. Dentre os nanomateriais utilizados para esse fim estão Au¹²⁶, nanotubos de carbono^{122,127-130} e grafeno^{121,131}. A Tabela IV reúne alguns trabalhos e suas características relatadas na literatura para o desenvolvimento de biossensores de terceira geração para detecção de glicose.

Tabela IV. Trabalhos utilizando a GOx no desenvolvimento de biossensores de terceira geração.

Modificador	Eletrodo		Sensibilidade	LD	Ref.
	Base	Faixa de Resposta Linear			
GOx/Au	GCE	2,5 – 32, 5 μmolL^{-1} 60 – 130 μmolL^{-1}		0,32 μM	[126]
GOD-MWCNTs- PVA	GCE	0,5 – 0,8 mM	16,6 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$		[130]
GOx/TiO ₂ -SWCNT Chit-	ITO	10 μM – 1,40 mM	5,32 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	10 μM	[129]
MWCNTs/GOD/Au NRs	GE	0,28 – 5,88 mmolL^{-1}	38,2 $\mu\text{A mmol L}^{-1} \text{cm}^{-2}$	2,06 $\times 10^{-5} \text{M}$	[128]
Nafion/GOD/Ag- Pdop@CNT	GCE	50 μM – 1,1 mM	3,1 $\mu\text{A mM}^{-1}$	17 μM	[127]
GOD/MWCNTs- ACS	GCE	Até 0,8 mM	0,127 $\text{A M}^{-1} \text{cm}^{-2}$	17,5 μM	[122]
CS-GOD-ERGO	GCE	0,02 – 3,2 mM	6,82 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	1,73 μM	[121]
RGO-GOx	GCE	0,1 – 27 mM	1,85 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$		[131]

GOx/Au: Glicose Oxidase adsorvida fisicamente em filmes de ouro nanoestruturados;

GOD-MWCNTs-PVA: Glicose Oxidase- nanotubos de Carbono- filme de polivinil álcool;

GOx/TiO₂-SWCNT: Glicose Oxidase/óxido de titânio revestidos com nanotubos de carbono;

Chit-MWCNTs/GOD/AuNRs: Quitosana-nanotubos de carbono/Glicose Oxidase/nanobastões de ouro.

Nafion/GOD/Ag-Pdop@CNT:Nafion/GlicoseOxidase/Prata-Polidopamina@nonotubos de carbono;

GOD/MWCNTs-ACS: Glicose Oxidase/nanotubos de Carbono-sílica revestida com alumina;

CS-GOD-ERGO: Quitosana- Glicose Oxidase-óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente;

RGO-GOx: Óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente- Glicose Oxidase.

GCE: Eletrodo de carbono vítreo (do inglês *glassy carbon electrode*).

ITO: Óxido de estanho e índio.

GE: Eletrodo de ouro (do inglês *gold electrode*).

*Procedimiento
Experimental*



4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes

3-cloropropiltrimetoxisilano CPTMS (Acros 98%), 3-aminopropiltrimetoxisilano, APTMS (Aldrich, 97%), 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano DABCO (Aldrich), N,N-dimetilformamida (Aldrich, 97%), Ortossilicato de tetraetila, TEOS (Acros 98%), carbono grafite (Aldrich, 99,99%), formamida (Vetec). Glutaraldeído, GA, (solução aquosa 25% Sigma- Aldrich), Glucose Oxidase, GOx (EC 1.1.3.4 50KU, Aldrich); dopamina (Sigma 98%), ácido L-ascórbico (99% Synth) e ácido úrico (Aldrich). Metil paration (Aldrich). Metanol, etanol, HF (40%) e HCl, ferri/ferrocianeto de potássio, cloreto de potássio e ácido fosfórico, ácido acético glacial e ácido bórico foram obtidos da Merck. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (98%) e Na_2HPO_4 (99%) foram adquiridos da Fmaia. Todos os reagentes empregados foram de grau analítico e usados conforme recebidos sem prévia purificação. As soluções foram preparadas usando água destilada.

4.2. Síntese do Silsesquioxano Iônico

O silsesquioxano iônico contendo o grupo cloreto de 1,4-bis-3-(propiltrimetoxisilano)diazoniabicyclo[2,2,2]octano foi sintetizado com base no procedimento previamente descrito por Arenas e colaboradores²¹ com algumas adaptações. Primeiramente, 5,605g de DABCO (30 mmol) foram dissolvidos em 40 mL de N,N-dimetilformamida. Posteriormente, foram adicionados 60 mmol (11,4 mL) de CPTMS, sob atmosfera de argônio. Esta mistura foi aquecida na temperatura de 75 °C, sob agitação e atmosfera inerte por 72 h, até a formação de um sólido branco (precursor organossilano iônico) denominado cloreto de bis(3-n-propiltrimetoxisilil)-1,4dizoniabicyclo[2,2,2]octano. Essa etapa da síntese está esquematizada na Figura 16a. Esse sólido foi lavado com metanol e posteriormente seco por 2 h a 70 °C. Na síntese do silsesquioxano, 4,0 g do organossilano precursor bis(3-n-propiltrimetoxisilil)-1,4dizoniabicyclo[2,2,2]octano foi dissolvido em 40 mL de formamida, sob constante agitação. Após adicionou-se 0,8 mL de água e 5 gotas de ácido fluorídrico, sob agitação e aquecimento de 70 °C. Após a total homogeneização do sistema, a temperatura foi mantida constante 40 °C para gelificação e evaporação do solvente. O sólido resultante é o silsesquioxano cloreto de

bis(3-n-propiltri-hidroxissilil)-1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano, aqui designado de SiDbCl₂ (Figura 16b).

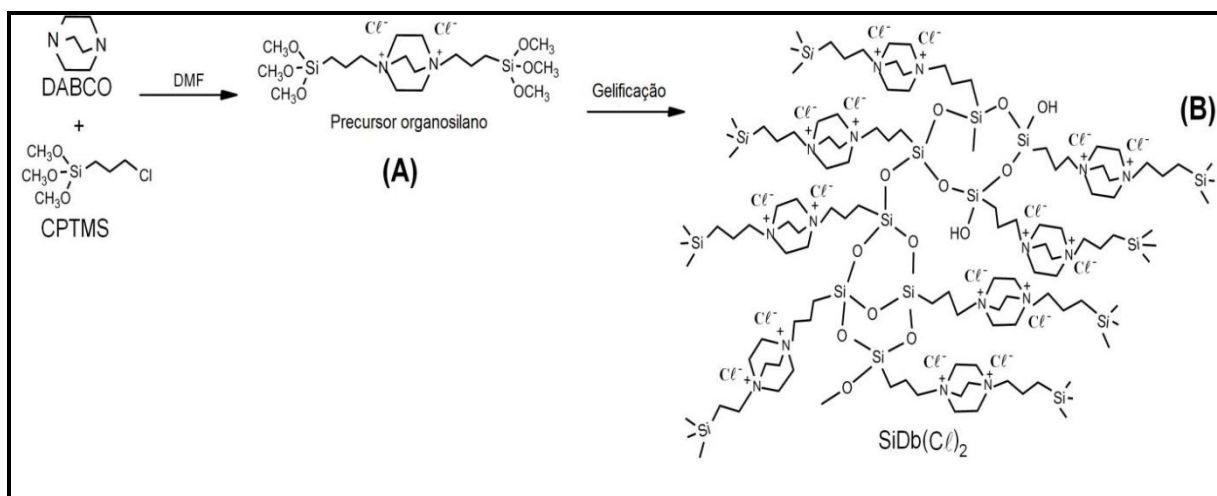


Figura 16. Representação esquemática da síntese do silsesquioxano: (a) precursor cloreto de bis(3-n-propiltrimetoxissilil)-1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano; (b) silsesquioxano cloreto de bis(3-n-propiltri-hidroxissilil)-1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano (SiDbCl₂)

4.2.1. Síntese da Sílica

A sílica foi sintetizada usando 5 mL de TEOS, 13 mL de metanol e 3 mL de água contendo 3 gotas de HF. A mistura foi deixada em repouso, a temperatura ambiente, para gelificação e evaporação do solvente. O sólido resultante é um xerogel de sílica, que foi lavado exaustivamente com água e etanol e após foi seco por 2 h, em vácuo a 80 °C para remoção de solvente residual. Esse material foi designado como Sílica.

4.2.2. Imobilização do Silsesquioxano Iônico na Superfície da Sílica

O silsesquioxano SiDbCl₂ foi imobilizado na superfície da sílica (seção 4.2.1) por reação de enxerto. Primeiramente foram dissolvidos 100 mg de SiDbCl₂ em 17,5 mL de água, na temperatura de 65 °C e agitação eventual, por cerca de 3 h. A solução foi transferida para uma cápsula de vidro e a essa foi adicionado 1g de sílica. A mistura permaneceu sob agitação constante por 12 h sob condições ambientes. Após, o sólido foi separado da solução e seco a 80 °C por 2 h, em vácuo. Então, o material foi lavado

com água e etanol e novamente seco a 110 °C, sob vácuo, para eliminar o solvente residual. O material foi designado como Db/Sílica.

4.2.3 Preparação dos Eletrodos de Pasta de Carbono

Os eletrodos de pasta de carbono foram preparados pela mistura dos materiais Sílica e Db/Sílica (10 mg) com grafite em pó (10 mg) e 3 mg de óleo mineral em um almofariz de ágata para formar uma pasta homogênea. Uma porção da pasta foi alocada em uma cavidade de 1 mm de profundidade, em contato com um disco de platina de 0,5 cm de diâmetro, dentro de um tubo de vidro e um fio de cobre como condutor. A molécula sonda utilizada foi o par redox Ferro/Ferricianeto de potássio 0,001 mol L⁻¹ em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹. Para os experimentos contendo o analito metil paration foi usado 0,1 mol L⁻¹ de KCl em 0,04 mol L⁻¹ de tampão Britton-Robinson. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente e sob atmosfera de argônio.

4.3. Matrizes Carbono Cerâmico

Foram sintetizadas três matrizes carbono cerâmico, denominadas SG, pelo método sol-gel, usando TEOS como precursor molecular e grafite. Foram utilizados protocolos de sínteses disponíveis no Laboratório de Sólidos e Superfícies. As matrizes carbono cerâmico foram preparadas utilizando uma razão mássica 1:1 SiO₂/C_{graf} e a síntese ocorreu em duas etapas. Os materiais finais são xerogéis de sílica contendo grafite e foram designados como matrizes SG1, SG2 e SG3.

4.3.1. Modificação das Matrizes SG1, SG2 e SG3 com 3-aminopropiltrimetoxisilano

Previamente, as matrizes SG1, SG2 e SG3 foram ativadas em linha de vácuo, a 120 °C por 2 h. A modificação da superfície dos materiais foi feita utilizando 1mmol de APTMS por grama de SG1, SG2 ou SG3. Cada matriz foi transferida para um balão contendo APTMS solubilizado em etanol. Os sistemas foram mantidos sob refluxo, em atmosfera inerte, com agitação mecânica a 65 °C, durante 24 h. Após, o sobrenadante foi retirado e os materiais foram secos em linha de vácuo, a 80 °C, por 2 h. Finalmente,

foram lavados exaustivamente com água e etanol e novamente secos em vácuo a 80 °C, por mais 2 h. As matrizes modificadas com 3-aminopropil foram então denominadas SG1/AP, SG2/AP e SG3/AP.

4.3.2. Modificação com Glutaraldeído

Dois gramas de SG1/AP, SG2/AP ou SG3/AP foram colocados em contato com 20 mL de uma solução de glutaraldeído 5% em tampão fosfato (STF) 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 como solvente. Os materiais foram deixados em contato com a solução de glutaraldeído por cinco horas, sob agitação constante. Após, foram lavados com STF e secos em linha de vácuo por 2 h, na temperatura de 60 °C. Os materiais ativados com glutaraldeído foram denominados SG1/AP/GA, SG2/AP/GA e SG3/AP/GA.

4.3.3. Imobilização da enzima Glicose Oxidase

Uma solução de concentração 20,3 mg mL⁻¹ da enzima GOx (proteína total quantificada pelo Método Espectrofotométrico de Bradford) em STF 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 foi preparada. Para 0,5 g dos suportes SG/AP/GA foram adicionadas alíquotas de 4 mL da solução de GOx. Os materiais foram deixados em contato com as soluções enzimáticas por 5 h em banho de gelo, sob agitação mecânica e deixadas a 4°C durante a noite. Posteriormente os materiais foram lavados por 10 vezes com STF e alíquotas das lavagens foram recolhidas para posterior quantificação de proteína não imobilizada. Os materiais foram secos em linha de vácuo e em banho de gelo, por aproximadamente 2 h. Os suportes SG/AP/GA tratados com a solução enzimática foram denominados SG1/AP/GA/GOx, SG2/AP/GA/GOx e SG3/AP/GA/GOx. Ainda, para o suporte SG3/AP/GA, além do experimento relatado acima efetuou-se, para outra porção de amostra do material, a imobilização da enzima a partir de uma solução mais concentrada de enzima GOx. Nesse caso a concentração da solução de GOx oferecida para 0,5g do suporte SG3/AP/GA foi de 33,8 mg mL⁻¹.(proteína total quantificada pelo Método Espectrofotométrico de Bradford). O restante do procedimento foi o mesmo adotado para os outros suportes.

4.3.4. Preparo dos eletrodos utilizando os materiais SG/AP/GA/GO_x

Eletrodos foram preparados misturando 20 mg dos materiais SG/AP/GA/GO_x, juntamente com 3 mg de óleo mineral. Discos destes materiais, com diâmetro de 6 mm e espessura de aproximadamente 1 mm, foram obtidos usando 3 Ton de pressão. Os discos foram colados em tubos de vidro com cola instantânea e utilizados como eletrodos de trabalho na cela eletroquímica. A resposta dos eletrodos SG/AP/GA/GO_x para o substrato glicose foi avaliada utilizando uma solução de glicose 0,1 mol L⁻¹.

4.4. Técnicas de Caracterização

4.4.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho

Os materiais denominados Sílica e Db/Sílica foram analisados utilizando espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), usando uma cela de quartzo. Essa cela permite obter espectros após tratamento térmico e sob vácuo, sem exposição ao ar. Discos dos materiais com diâmetro de 2,5 cm e pesando aproximadamente 100 mg foram preparados e acomodados dentro da cela. Os discos foram aquecidos até 130 °C, sob vácuo (10⁻² Torr) por 1 h com o intuito de verificar a estabilidade térmica do silsesquioxano aderido à superfície da Sílica. Os espectros foram obtidos usando um equipamento Shimadzu FTIR, Prestige 21, com resolução de 4 cm⁻¹ e 100 acumulações.

4.4.2. Análise elementar de cloreto

A quantidade de silsesquioxano imobilizado na superfície da sílica foi estimada por análise elementar de cloreto. Foram transferidas para um béquer (100 mg) das amostras SiDbCl₂ ou Db/Sílica e adicionado 30 mL de uma solução de HNO₃ (0,1 mol L⁻¹) sob agitação magnética por 30 min. Posteriormente, a solução foi titulada com uma solução de nitrato de prata padronizada (0,01 mol L⁻¹) usando o método potenciométrico.

4.4.3. Isotermas de adsorção e dessorção de N₂

As isotermas de adsorção e dessorção de N₂ foram obtidas na temperatura do nitrogênio líquido utilizando um equipamento Tristar II Krypton 3020 Micromeritics. A partir das curvas de adsorção e dessorção de N₂ foram obtidas as curvas de distribuição de tamanho de poros dos materiais aplicando-se o método BJH (Barret, Joyner e Halenda). A área superficial específica dos materiais foi obtida usando-se o método de BET (Brunauer, Emmett e Teller)⁵⁶.

4.4.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica das amostras foi realizada em um equipamento TGA-50 Shimadzu Thermogravimetric Analyser com rampa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ entre 30 e 600 °C sob atmosfera inerte de N₂.

4.4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Inicialmente as amostras foram dispersas em suporte de alumínio usando fita dupla face condutora que, foi coberta com um filme de ouro com o auxílio de um metalizador Baltec SCD 050. As matrizes SG foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6060, usando-se 20 kV, com um aumento de 30000 ou 35000 vezes. Para a análise EDS (*Energy Dispersive Spectroscopy*) o equipamento empregado foi o microscópio JEOL JSM 5800 acoplado com um detector de energia dispersiva da NORAN. Nessa análise usou-se aumento de 1500 vezes.

4.4.6. Quantificação de proteína imobilizada

Para determinar a quantidade de proteína total imobilizada nos suportes SG/AP/GA foi utilizado o método espectrofotométrico de Bradford que utiliza o corante Coomassie brilliant blue (BG-250), comumente chamado de Reagente de Bradford. A curva de calibração para a quantificação de proteína pelo método de Bradford utiliza albumina de soro bovino como padrão¹³². Este método é baseado na interação entre o Reagente de Bradford e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de

alto peso molecular e o Reagente de Bradford provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm¹³³. O equipamento utilizado foi um Espectrofotômetro Amersham Bioscience Ultrospec 3100 pro.

Para quantificar a proteína imobilizada no suporte fez-se a diferença entre o total protéico oferecido e o total residual de proteína das soluções provenientes das lavagens dos suportes SG/AP/GA após imobilização.

4.4.7. Medidas Eletroquímicas

As análises eletroquímicas incluindo voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD) para os eletrodos de pasta de carbono modificados com Sílica e Db/Sílica foram realizadas em um potenciostato/galvanostato IviumStat.

As medidas eletroquímicas de Voltametria Cíclica e Cronoamperometria dos eletrodos carbono cerâmicos foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT302N. Os eletrodos de trabalho utilizados foram os discos dos materiais SG/AP/GA/GOx. O software para tratamento dos dados foi o Gpes.

Uma cela convencional de três eletrodos, a temperatura de ambiente, foi usada para todas as medidas eletroquímicas, sendo o eletrodo de calomelano saturado (ECS) o eletrodo de referência, um fio de platina como eletrodo auxiliar e o eletrodo de pasta de carbono ou eletrodo carbono cerâmico como eletrodo de trabalho.

Resultados e Discussões



Parte 1



5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Filme de Silsesquioxano Iônico imobilizado na Superfície da Sílica utilizado como modificador de Eletrodo de Pasta de Carbono para determinação de Metil Paration.

Nessa etapa foi sintetizado um silsesquioxano iônico contendo o grupo iônico cloreto de 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano (SiDbCl_2) para ser imobilizado na superfície de um xerogel de sílica (Sílica). O silsesquioxano iônico SiDbCl_2 obtido foi submetido a análise potenciométrica de cloreto e os resultados indicam que mesmo apresenta 1,75 mmol de grupo iônico 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano por grama de material. O silsesquioxano iônico SiDbCl_2 foi imobilizado na forma de um filme na superfície da Sílica, descrita no item 4.2.2. O material resultante foi denominado Db/Sílica.

5.1.1. Caracterização do material Db/Sílica

5.1.1.1. Espectroscopia no infravermelho

Na Figura 17 são mostrados os espectros de absorção na região do infravermelho da matriz Sílica e do Db/Sílica.

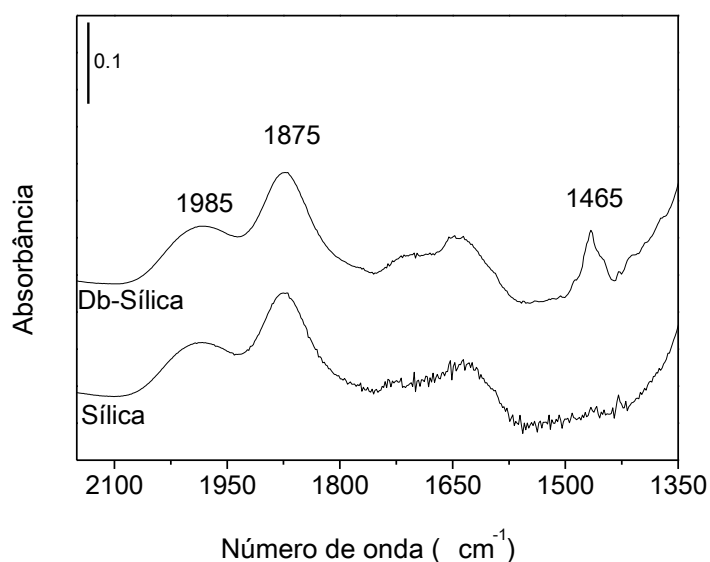


Figura 17. Espectro de absorção na região do infravermelho da Sílica e do Db/Sílica, obtido em temperatura ambiente, após tratamento térmico a 130 °C, sob vácuo por 1h.

A presença de grupos orgânicos pode ser identificada pela banda em 1465 cm^{-1} , presente apenas no material Db/Sílica, a qual corresponde ao estiramento dos grupos CH_2 do DABCO e da cadeia propil⁷⁵. O componente inorgânico pode ser identificado pelas bandas típicas da Sílica com máximos próximos a 1875 e 1985 cm^{-1} ¹³⁴. A presença da banda correspondente aos grupos orgânicos, mesmo após o tratamento térmico em 130 °C , sob vácuo por 1 hora, é um indicativo que o filme está fortemente aderido na superfície da sílica¹³⁵.

5.1.1.2. Análise elementar de cloreto

O teor de grupo orgânico 1,4 diazoniabicyclo[2,2,2]octano presente no Db/Sílica foi determinado por titulação potenciométrica dos íons cloreto, resultando em um valor estimado de $0,095\text{ mmol}$ de grupos por grama de Sílica.

5.1.1.3. Isotermas de adsorção e dessorção de N_2

As isotermas de adsorção e dessorção de N_2 e a distribuição de tamanho de poros determinada pelo método BJH são mostradas na Figura 18.

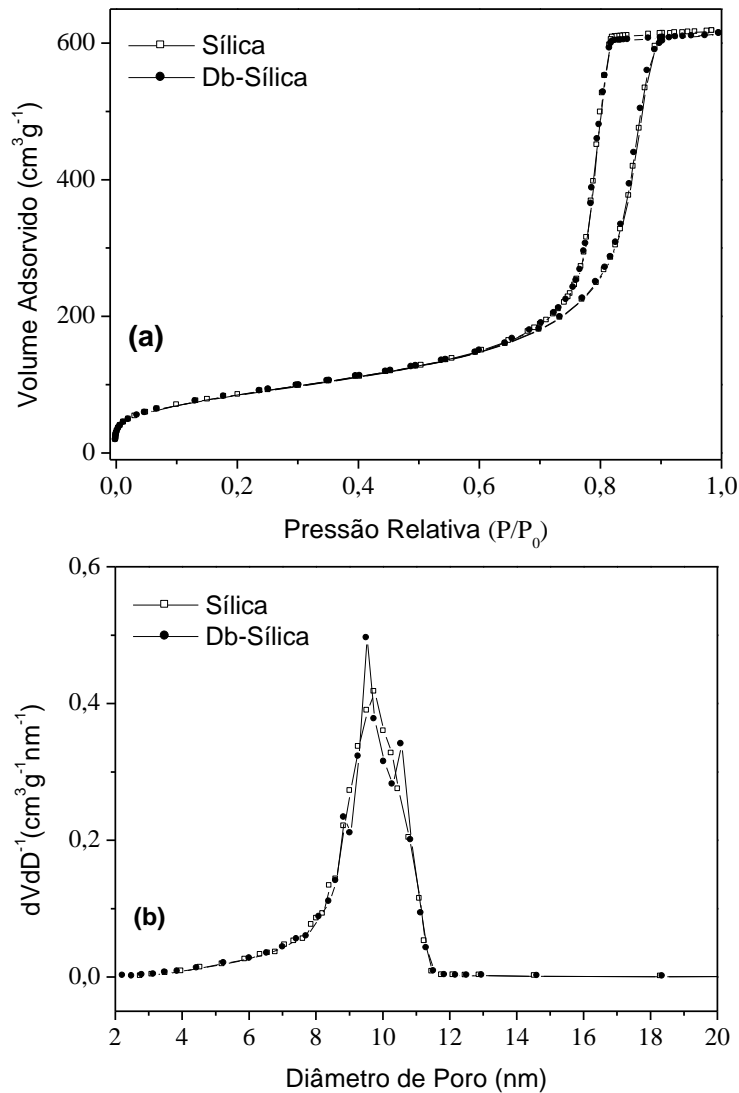


Figura 18. Análise textural (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e (b) Distribuição de tamanho de poros.

É possível observar curvas similares para Sílica e Db/Sílica. As isotermas são típicas de materiais mesoporosos⁵⁶ pois adsorvem em altas pressões relativas de N₂ indicando a presença de poros maiores para serem preenchidos com N₂. As curvas BJH apresentam distribuição de tamanho de poros com um máximo próximo a 10 nm. Os valores da área superficial BET e do volume de poros são apresentados na Tabela V.

Tabela V. Características texturais dos materiais.

Amostra	Área Superficial BET (± 5 m² g⁻¹)	Volume de Poro BJH (± 0,02 cm³ g⁻¹)
Sílica	348	1,03
Db/Sílica	311	0,96

Embora a área superficial BET sofra um decréscimo, o volume de mesoporos permanece praticamente inalterado após a imobilização do silsesquioxano. A diminuição na área superficial é um indicativo que houve modificação na região dos microporos após a imobilização do silsesquioxano na superfície da Sílica, conforme apresentado na Figura 19.

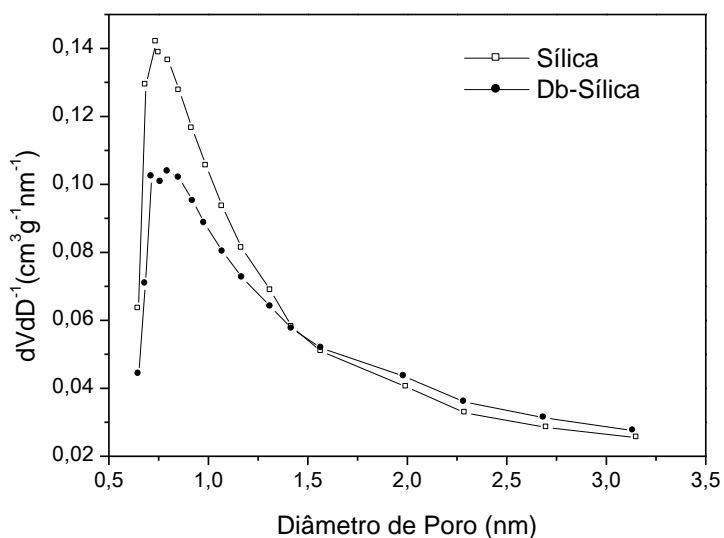


Figura 19. Distribuição de tamanho de poros para os materiais Sílica e Db/Sílica na região de microporos.

Portanto, a presença do componente orgânico não produz mudança significativa na estrutura dos mesoporos, indicando que os grupos orgânicos estão altamente dispersos na superfície da Sílica.

5.1.2. Caracterização eletroquímica

Foram preparados eletrodos de pasta de carbono contendo Sílica e Db/Sílica. Inicialmente, para comparar a eletroatividade entre os eletrodos foi utilizado o par redox ferro/ferricianeto de potássio como molécula sonda e os eletrodos foram avaliados por voltametria cíclica. Os voltamogramas cíclicos obtidos em uma faixa de potencial entre -0,2 e +0,7 V, a uma velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹, estão mostrados na Figura 21.

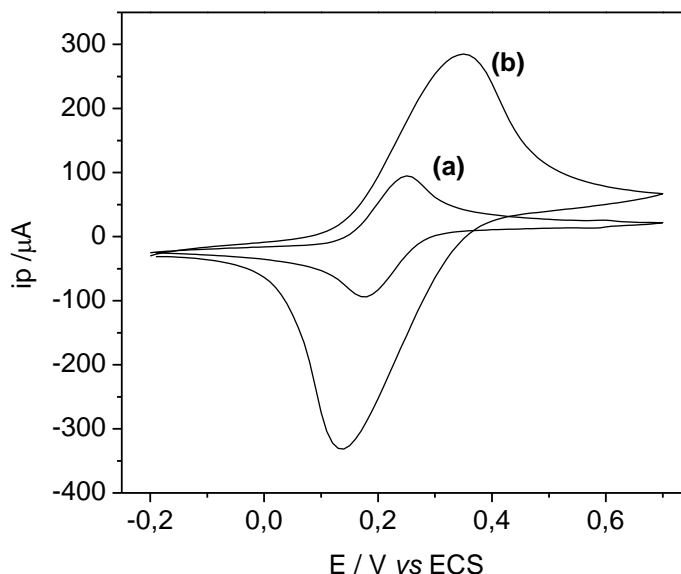


Figura 20. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de pasta de carbono modificados com (a) Sílica e (b) Db/Sílica em uma solução $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl. Velocidade de varredura 20 mV s^{-1} .

Pode-se observar na Figura 20 que os voltamogramas cíclicos mostram um par de picos redox *quasi*-reversíveis referentes ao $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4}$ para ambos os eletrodos, Sílica e Db/Sílica. No entanto, os materiais apresentaram valores distintos para os potenciais de pico (E_{pa} e E_{pc}) e para as intensidades de corrente (i_{pa} e i_{pc}). Esses valores são mostrados na Tabela VI.

Tabela VI. Valores de intensidade de corrente e de potencial dos picos anódicos e catódicos e variação dos potenciais de pico ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$) obtidos dos voltamogramas cíclicos.

Eletrodo	Corrente de Pico Anódico $i_{pa}/\mu\text{A}$	Corrente de Pico Catódico $i_{pc}/\mu\text{A}$	i_{pa}/i_{pc}	Potencial de Pico Anódico E/V	Potencial de Pico Catódico E/mV	$\Delta E_p/\text{mV}$
Sílica	93,8	-94,0	0,99	251,1	174,8	76,3
Db/Sílica	285,0	-332,1	0,85	348,8	133,8	214,2

Pode-se observar na Tabela VI que o eletrodo de pasta de carbono contendo Sílica mostrou menor separação de pico (76,3 mV) quando comparado ao eletrodo de pasta de carbono do material Db/Sílica (214,2 mV). Essa diferença foi interpretada considerando-se a presença do filme de silsesquioxano disperso na superfície da sílica

que deve resultar em aumento na resistência de transferência de carga na superfície do eletrodo, conforme já reportado na literatura ^{21,22}. Por outro lado, elevados valores de corrente de pico foram observados para o eletrodo Db/Sílica quando comparado ao eletrodo contendo Sílica.

O filme de silsesquioxano promove um aumento na área eletroativa do eletrodo, característica importante aos sensores eletroquímicos. Assim, o eletrodo de pasta de carbono Db/Sílica foi usado para avaliar a resposta eletroquímica do analito metil paration.

5.1.2.1. Comportamento eletroquímico do eletrodo Db/Sílica frente ao metil paration

Na Figura 21 são mostrados os voltamogramas do eletrodo Db/Sílica, na ausência e na presença de $2,91 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$ de metil paration, em solução tampão BR (pH 5,0).

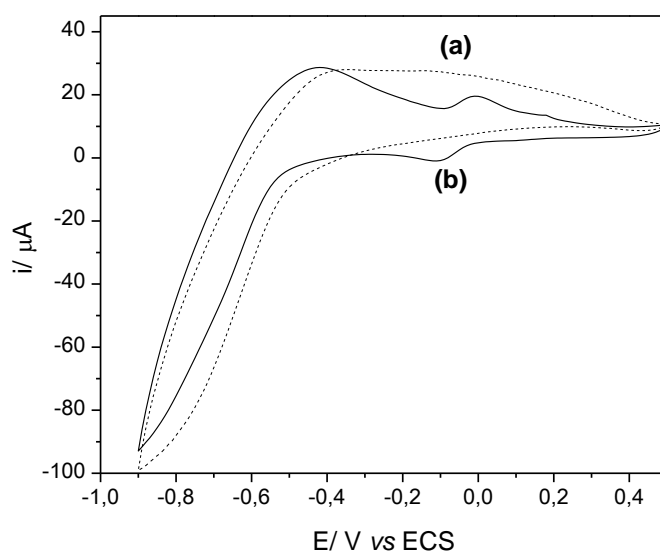


Figura 21. Voltamogramas do eletrodo Db/Sílica (a) na ausência e (b) na presença de $2,91 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$ de metil paration em solução tampão BR (pH 5,0) e atmosfera de argônio. Velocidade de varredura 20 mV s^{-1}

Pode-se observar que, na ausência de metil paration, não foi detectada corrente de pico. No entanto, um par definido de picos redox foi observado na presença de metil paration, com potencial de oxidação em $-0,007 \text{ V}$ e potencial de redução em $-0,100 \text{ V}$.

O aparecimento desses picos pode ser atribuído à reação de oxidação e redução envolvendo o grupo hidroxilamina (– NHOH) e o grupo nitroso (– NO). Assim, o grupo hidroxilamina surge como uma consequência da redução do grupo nitro do metil paration^{136–138}, como representado na Figura 22.

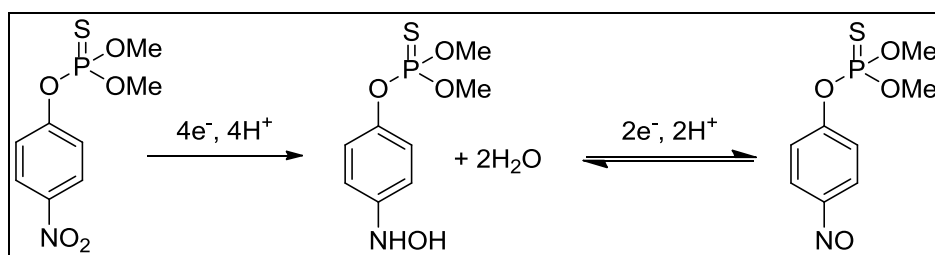


Figura 22. Representação das reações de oxidação e redução do metil paration.

Informações sobre o mecanismo do sistema eletroquímico podem ser obtidas de medidas de corrente em função da velocidade de varredura. Os voltamogramas cíclicos do eletrodo Db/Sílica em diferentes velocidades de varredura (0,01 – 0,40 V s⁻¹), na presença de metil paration, são mostrados na Figura 23.

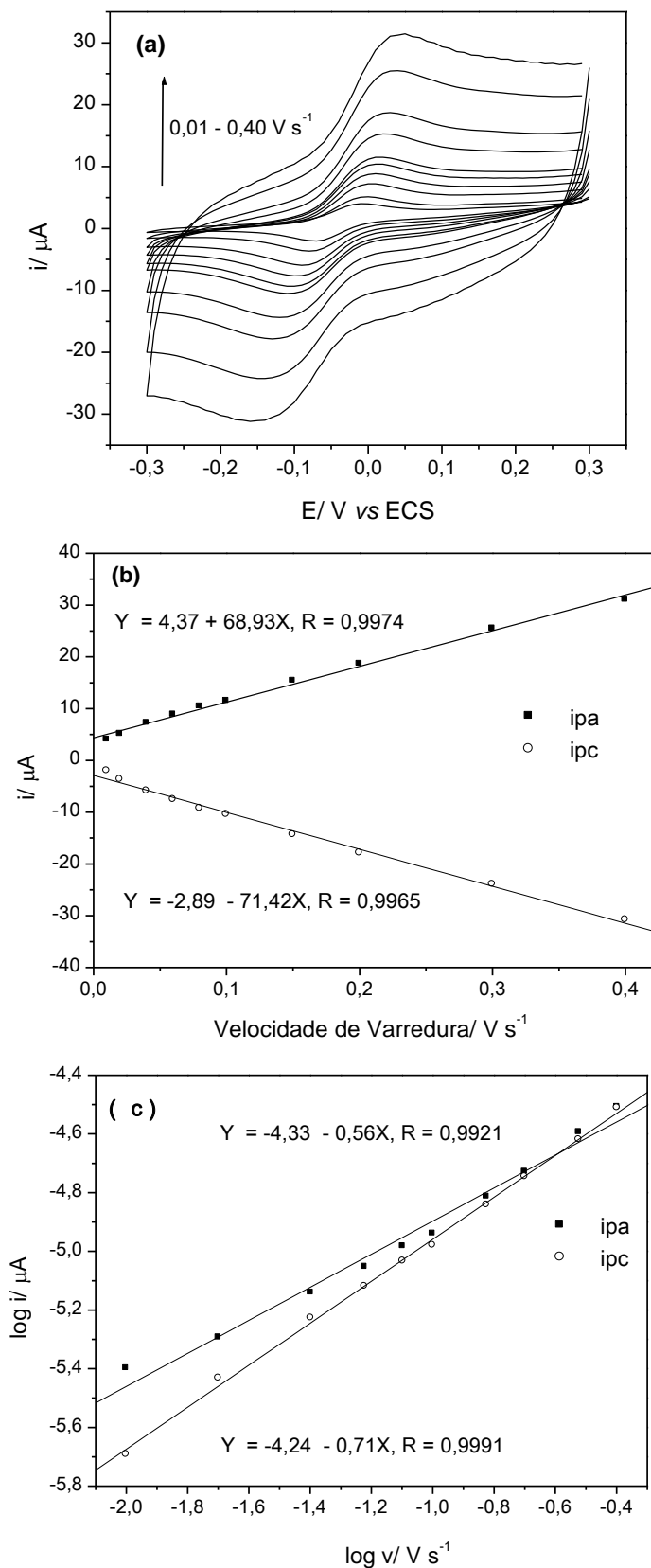


Figura 23. (a) Voltamogramas Cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (0,01 – 0,40 V s^{-1}) para eletrodo de pasta de carbono Db/Sílica em $2,91 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$ de metil paration em solução tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0); (b) Relação entre (ipa ou ipc) e (v).; (c) Relação entre \log (ipa ou ipc) e $\log v$.

É possível observar que as correntes de pico anódico e catódico aumentam linearmente com a velocidade de varredura, sugerindo que a reação na superfície do eletrodo é controlada por um processo de adsorção¹³⁹. Por outro lado, os potenciais de pico anódico e catódico se deslocam com o aumento da velocidade de varredura (Figura 23 a) e esse é um comportamento atípico para processos adsorptivos. Para confirmar se o processo é controlado por adsorção ou difusão do analito na superfície do eletrodo fez-se a relação entre o $\log v$ e $\log i_p$ (Figura 23c). Neste sentido, na equação da reta obtida, valores de coeficiente angular entre 0,5 e 1,0 implicariam em um processo controlado simultaneamente por difusão e adsorção; já o valor de 0,5 indicaria um processo controlado por difusão. Se a reação é controlada por adsorção, o coeficiente angular deve ser 1,0.

Considerando os coeficientes angulares obtidos (0,56 e 0,71), pode-se concluir que os processos de oxidação e redução do metil paration na superfície do eletrodo são controlados por difusão acompanhada de adsorção.

5.1.2.2. Efeito do pH

O comportamento do eletrodo Db/Sílica foi estudado na faixa de pH entre 4 – 8 em solução tampão BR 0,04 mol L⁻¹ usando-se voltametria cíclica. A Figura 24 mostra a variação do potencial de pico e da intensidade de corrente do eletrodo Db/Sílica na presença de $2,56 \times 10^{-3}$ mmol L⁻¹ de metil paration, em função do pH.

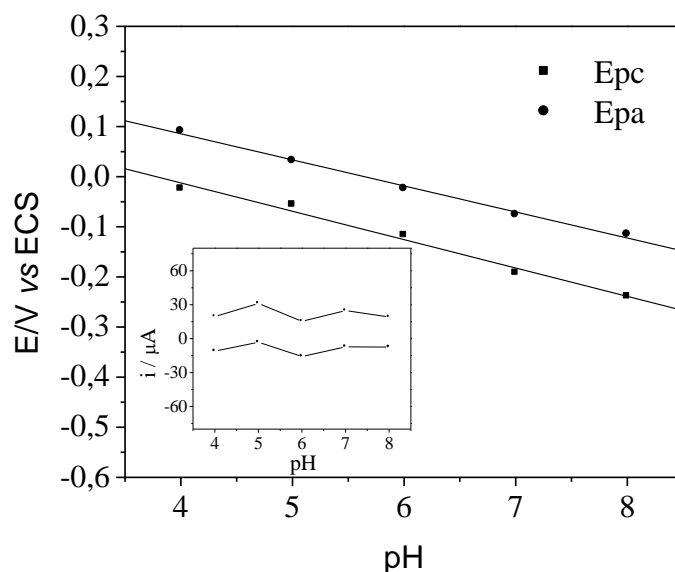


Figura 24. Relação entre E_{pa} e E_{pc} em função do pH na presença de $2,56 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$ de metil paration. Figura inserida: efeito do pH na corrente de pico.

As equações da reta que descrevem o comportamento do E_p em função do pH são descritas como:

$$E_{pa} = -0,057 \text{ pH} + 0,21 \quad R = 0,996 \quad (7)$$

$$E_{pc} = -0,052 \text{ pH} + 0,29 \quad R = 0,998 \quad (8)$$

Os coeficientes angulares das equações acima obedecem a equação de Nernst quando igual número de íons H^+ e elétrons são transferidos^{136,137}. As intensidades de corrente de pico anódico e catódico são pouco afetadas pelo pH das soluções na faixa estudada, no entanto em pH 6,0 observa-se a maior intensidade de corrente para a redução do metil paration. Desta forma, o pH 6,0 foi selecionado para a determinação por voltametria de pulso diferencial do metil paration.

5.1.2.3. Voltametria de Pulso Diferencial do Eletrodo Db/Sílica

A resposta do eletrodo Db/Sílica frente a adições de metil paration foi avaliada por voltametria de pulso diferencial em solução tampão BR (pH 6,0). A Figura 25 mostra a variação da intensidade de corrente em função da concentração do metil paration.

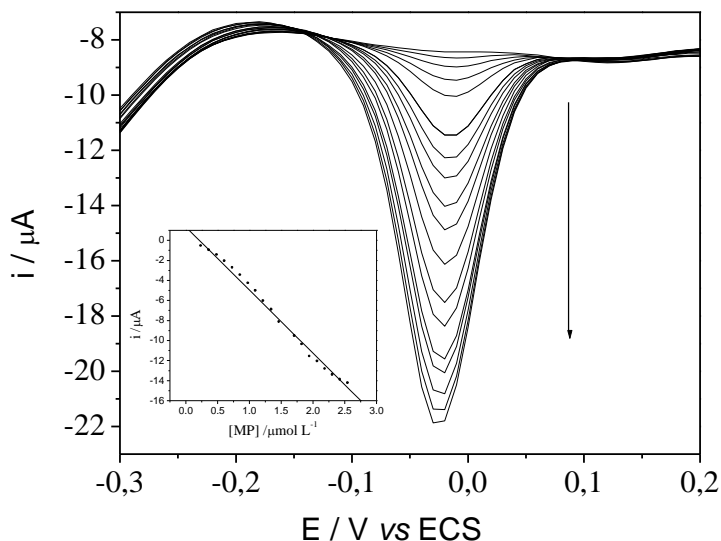


Figura 25. Voltamogramas de Pulso Diferencial do eletrodo de pasta de carbono Db/Sílica em solução tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) com sucessivas adições de metil paration. Figura inserida: Relação linear entre i_{pc} e a concentração de metil paration na faixa entre $1,25 \times 10^{-4}$ e $2,56 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$.

Observa-se uma relação linear entre i_{pc} e a concentração de metil paration, na faixa de concentração entre $1,25 \times 10^{-4} \text{ mmol L}^{-1}$ e $2,56 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$, descrita por $i(\mu\text{A}) = 1,3 - 6,3 [\text{metil paration}] (\mu\text{mol L}^{-1})$, com ($R = 0,997$). A sensibilidade (S) do eletrodo foi calculada a partir da inclinação da reta como sendo de $6,3 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$. O limite de detecção ($LD = 3 \cdot S_B \text{ } S^{-1}$) calculado foi de $0,013 \mu\text{M}$. O desempenho do eletrodo Db/Sílica foi comparado com outros sistemas para a detecção do MP e a comparação entre os dados está resumida na Tabela VII.

Tabela VII. Comparação de diferentes eletrodos usados na determinação de metil paration.

Eletrodo	Faixa de resposta linear (mol L⁻¹)	Limite de detecção (nmol L⁻¹)	Referência
Ag/nafion/GCE	$3,9 \times 10^{-7} - 14,4 \times 10^{-7}$	87	[140]
Clay Modified/GCE	$4,0 \times 10^{-7} - 6,0 \times 10^{-5}$	70	[141]
CPE	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	50	[142]
Chitosan/Composite/ CGE	$2,0 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-4}$	2,0	[143]
MWCNTs-PAAM/GCE	$5,0 \times 10^{-9} - 1,0 \times 10^{-5}$	2,0	[137]
MIP-IL-EGN/GCE	$1,0 \times 10^{-8} - 7,0 \times 10^{-6}$	6,0	[144]
CNPs/Clay/CPE	$1,55 \times 10^{-9} - 3,67 \times 10^{-6}$	0,47	[136]
MWCNTs/CeO ₂ /Au/GCE	$1,0 \times 10^{-10} - 1,0 \times 10^{-7}$	0,03	[145]
AuNPs/GCE	$5,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-4}$	86	[146]
Silk modified/MWNT/GCE	$3,5 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-3}$	500	[147]
Db/Sílica/CPE	$1,25 \times 10^{-7} - 2,56 \times 10^{-6}$	13	Este trabalho

Ag/nafion/GCE: nanopartículas de prata/nafion.

Clay Modified/GCE: Argila modificando eletrodo de carbono vítreo.

CPE: Eletrodo de pasta de carbono.

Chitosan/Composite/ CGE:

Compósito de quitosana.

MWCNTs-PAAM/GCE: filme de nanotubos de carbono de paredes múltiplas-poli(acrilamida)

MIP-IL-EGN/GCE: filme de polímero de impressão molecular-líquido iônico-grafeno.

CNPs/Clay/CPE: nanopartículas de carbon e argila.

MWCNTs/CeO₂/Au/GCE: nanotubos de carbono de paredes múltiplas -CeO₂-ouro.

AuNPs/GCE: nanopartículas de ouro.

Silk modified/MWNT/GCE: fibra de seda/ nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

GCE: eletrodo de carbono vítreo.

CPE: Eletrodo de pasta de carbono.

Analisando os dados da Tabela VII verifica-se que o limite de detecção do eletrodo Db/Sílica é comparável aos outros sistemas relacionados, no entanto, é importante enfatizar que na maior parte desses sistemas, os eletrodos contém nanopartículas metálicas, materiais nanoestruturados ou nanotubos de carbono para melhorar a atividade eletrocatalítica^{148,149}, enquanto o eletrodo Db/Sílica é um sistema simples onde o filme de silsesquioxano iônico é responsável pela melhora na atividade eletrocatalítica. Esses resultados mostram que o eletrodo Db/Sílica pode ser utilizado como potencial sensor eletroquímico na determinação do metil paration.

Parte 2



5.2. Desenvolvimento de matrizes carbono cerâmico (SG) utilizadas como suporte na imobilização da enzima glicose oxidase (GOx) e sua aplicação como biossensor eletroquímico de terceira geração para detecção de glicose

Nessa etapa do trabalho foram sintetizadas três matrizes carbono cerâmico chamadas SG1, SG2 e SG3, que foram planejadas para apresentar tamanhos crescentes de poros, entre 7 e 20 nm. As matrizes foram sintetizadas via método sol-gel utilizando protocolo de síntese disponível no Laboratório de Sólidos e Superfícies. Essas matrizes foram modificadas sequencialmente com 3-aminopropiltrimetoxissilano, glutaraldeído e a enzima GOx. A quantidade de enzima imobilizada bem como a difusão do substrato até o sítio ativo da enzima são fatores importantes para o desempenho de um eletrodo. Assim, os materiais modificados foram caracterizados e testados a fim de avaliar sua aplicação como biossensores eletroquímicos para glicose.

5.2.1. Modificação das Matrizes Carbono Cerâmico

Inicialmente, a superfície das matrizes carbono cerâmico (SG1, SG2 e SG3) foram modificadas através de uma reação de enxerto com o composto 3-aminopropiltrimetoxissilano e foram denominadas SG/AP. Nesta reação, o reagente organossilano reage com os grupos silanóis da matriz deixando grupos amina disponíveis para a imobilização do glutaraldeído^{108,111,150}. Assim, um grupo aldeído do glutaraldeído e um grupo amina do suporte SG/AP reagem para formar uma base de Schiff¹⁰⁸. Os materiais resultantes desta etapa foram designados SG/AP/GA. Então, o segundo grupo aldeído do glutaraldeído imobilizado reage com um grupo amina da enzima GOx imobilizando-a covalentemente ao suporte. O suporte com a enzima imobilizada foi denominado SG/AP/GA/GOx. A Figura 26 ilustra todas as reações para a imobilização da enzima GOx, descritas acima.

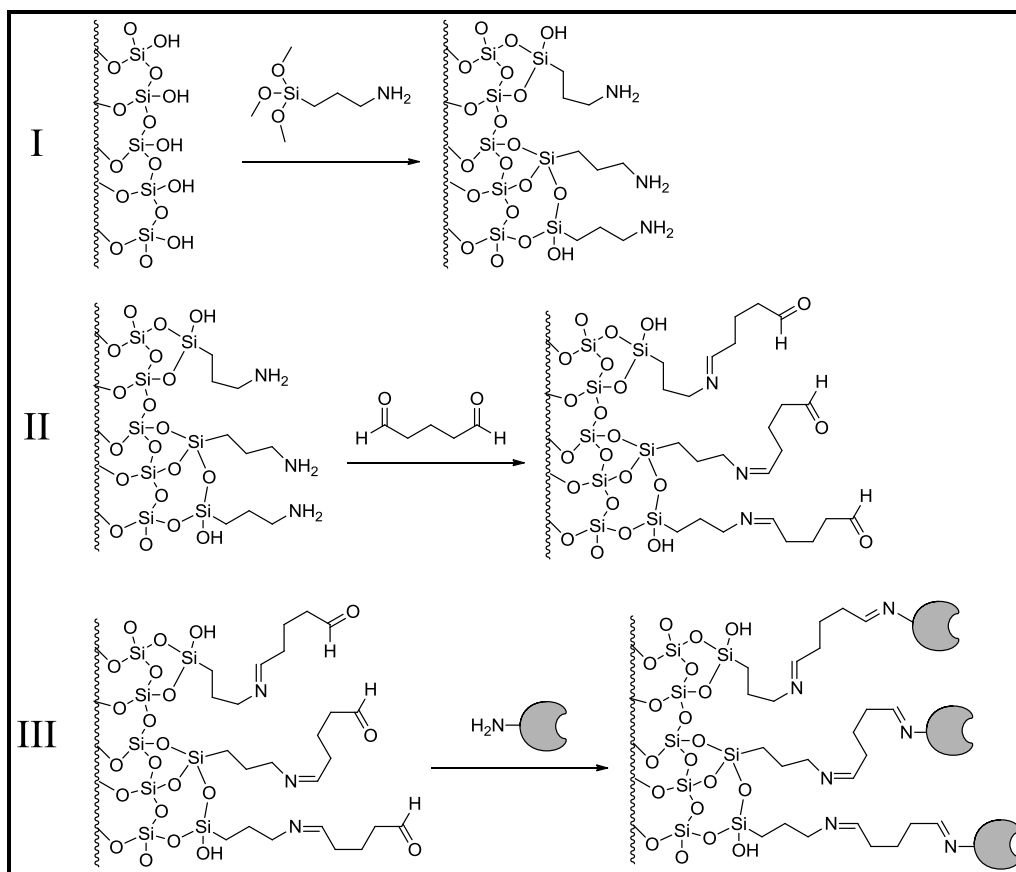


Figura 26. Representação da imobilização covalente da enzima GOx: (I) Reação de funcionalização da matriz com o grupo 3-aminopropil; (II) ativação com glutaladeído; (III) imobilização da enzima GOx.

Os dados referentes à imobilização da enzima GOx nos suportes SG1, SG2 e SG3 são mostrados na Tabela VIII.

Tabela VIII. Dados da quantidade de proteína imobilizada nos suportes SG/AP/GA.

Material	Total de Proteína Oferecido (mg)	Total de Proteína Residual (mg)	% Imobilização
SG1/AP/GA	20,3	19,0	6
SG2/AP/GA	20,3	2,63	87
SG3/AP/GA	20,3	0	100
SG3/AP/GA	33,8	4,57	86

Verifica-se a imobilização de 6% para o suporte SG1/AP/GA e de 87% para o suporte SG2/AP/GA do total proteico oferecido, indicando que a superfície dos suportes estariam saturadas com a enzima. No entanto, para o suporte SG3/AP/GA houve 100% de imobilização do total proteico oferecido, ou seja, considerou-se que ainda havia

grupos do reagente bifuncional glutaraldeído disponíveis para se ligarem com a enzima. Assim, uma solução enzimática mais concentrada ($33,8 \text{ mg mL}^{-1}$) foi oferecida para a mesma quantidade de suporte SG3/AP/GA e houve imobilização de 86% do total de proteína oferecida. Portanto, nesse caso, considera-se que a superfície do suporte SG3/AP/GA foi saturada com a enzima.

A imagem da Figura 27 mostra a intensidade de cor das soluções de lavagem provenientes da imobilização da enzima GOx nos suportes.

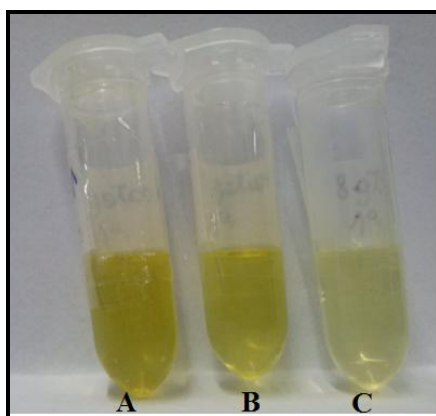


Figura 27. Imagem referente a solução enzimática residual da imobilização aos suportes, (A) SG1/AP/GA, (B) SG2/AP/GA e (C) SG3/AP/GA.

É possível observar que a intensidade da cor amarela, característica da enzima GOx, decresce de SG1 para SG3. Esse resultado está em concordância com o observado na análise espectrofotométrica onde uma menor quantidade de enzima foi encontrada na solução onde foi feita a imobilização no material SG3/AP/GA indicando que uma maior quantidade de enzima foi imobilizada nesse suporte.

5.2.2. Caracterização dos materiais

5.2.2.1. Isotermas de adsorção e dessorção de N_2

A Figura 28 mostra as isotermas de adsorção e dessorção de N_2 para as três matrizes (SG1, SG2 e SG3) carbono cerâmico sintetizadas. A área superficial específica das matrizes, obtida pelo método BET foi de 273, 158 e $73 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ respectivamente.

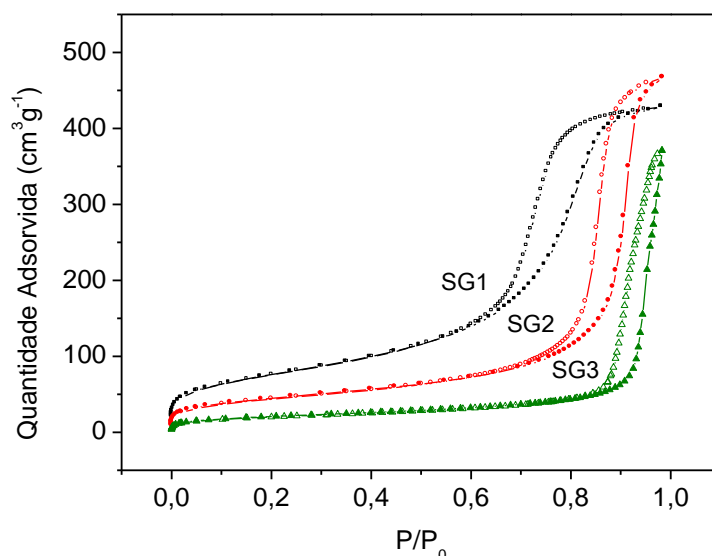


Figura 28. Isothermas de adsorção e dessorção de N₂ das matrizes SG1, SG2 e SG3.

A isoterma da matriz SG1 mostra a adsorção do N₂ em pressões relativas mais baixas quando comparadas às matrizes SG2 e SG3. Essa observação tem relação com o tamanho de poros da matriz. Quando os materiais adsorvem a pressões relativas mais altas tem-se um indicativo da presença de poros com tamanhos maiores. Quanto maior o tamanho do poro maior deve ser a pressão relativa para que o mesmo possa ser totalmente preenchido com o N₂ líquido (condensação capilar)⁵⁶.

As curvas de distribuição de tamanho de poros, obtidas pelo método BJH são mostradas na Figura 29 e revelam, de acordo com a classificação IUPAC, uma distribuição de tamanho de poros na faixa de mesoporos (entre 2 e 50 nm) para as três matrizes.

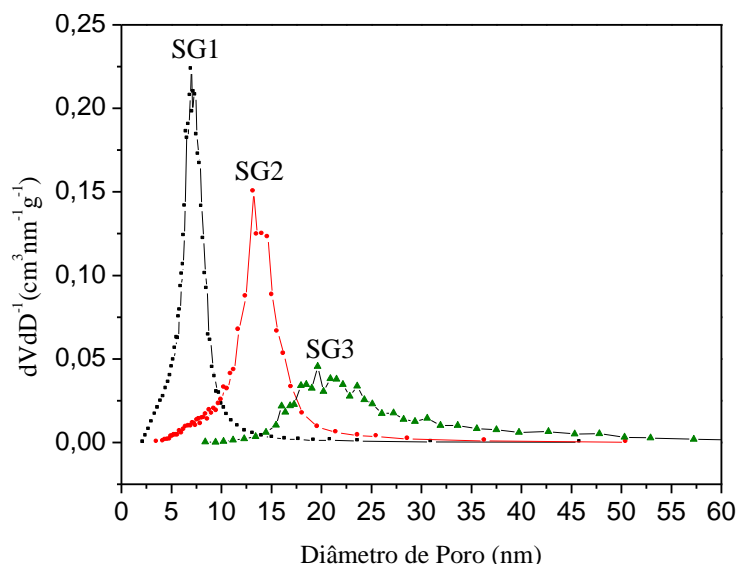


Figura 29. Curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SG1, SG2 e SG3.

A partir dos gráficos de distribuição de tamanho de poros observa-se que as matrizes SG1, SG2 e SG3 apresentaram poros com distribuição bastante estreita com máximos em aproximadamente 7, 14 e 21 nm. Assim, observa-se que para as matrizes SG1, SG2 e SG3 a área superficial específica é inversamente proporcional ao tamanho dos poros. Esses resultados indicam que a síntese ocorreu conforme o planejado.

As isotermas de adsorção e dessorção e a distribuição de tamanho de poros das matrizes mesoporosas SG1, SG2 e SG3 antes e após todas as modificações são mostradas nas Figuras 30, 31 e 32. De um modo geral, as isotermas apresentam comportamento similar para os três materiais com diminuição da quantidade de N₂ líquido adsorvida, após as modificações com 3-aminopropiltrimetoxisilano, glutaraldeído e a enzima GOx.

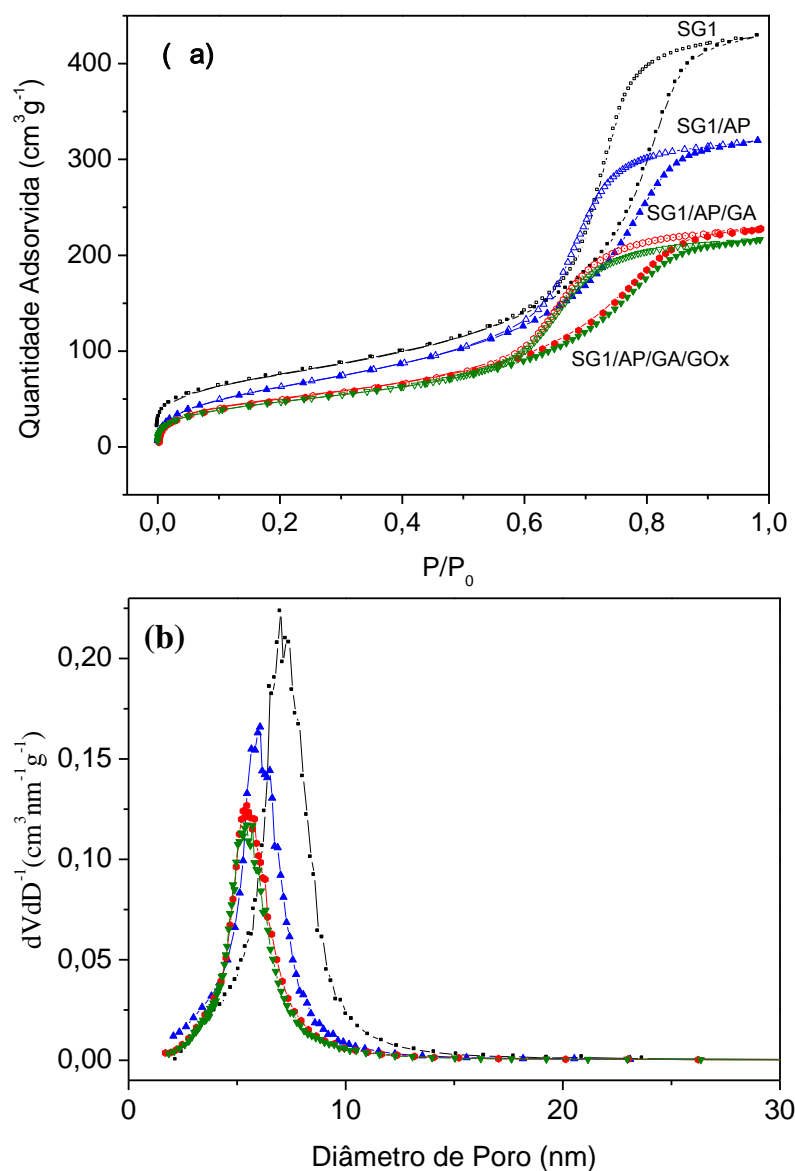


Figura 30. (a) Isothermas de adsorção e dessorção de N_2 da matriz SG1, SG1/AP, SG1/AP/GA e SG1/AP/GA/GOx. (b) Curvas de distribuição de tamanho de poros para a matriz SG1 antes e após todas as modificações.

A Figura 30a mostra que a quantidade de N_2 líquido adsorvida é maior para a matriz SG1 quando comparada à matriz modificada SG1/AP. Esse decréscimo na quantidade de N_2 adsorvido é uma consequência da modificação da superfície com o grupo 3-aminopropil acarretando também uma diminuição do volume de poros da matriz SG1 de $0,66 cm^3 g^{-1}$ para $0,48 cm^3 g^{-1}$. O mesmo comportamento é observado para o suporte SG1/AP/GA onde a imobilização do glutaraldeído acarreta uma diminuição no volume dos poros para $0,35 cm^3 g^{-1}$. Foi observada também uma diminuição da área superficial específica da matriz SG1 de $273 m^2 g^{-1}$ para $240 m^2 g^{-1}$ após modificação com 3-aminopropil e para $184 m^2 g^{-1}$ após modificação com

glutaraldeído. No entanto, o volume de poros do material após a imobilização da enzima ($0,32 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) e a área superficial específica ($172 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) não sofreram alteração significativa quando comparado ao suporte SG1/AP/GA.

As curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SG1 antes e após modificações são mostradas na Figura 30b. Observa-se um deslocamento do pico com máximo em 7,0 nm para a matriz SG1 para 6 nm após modificação com 3-aminopropil e para 5,4 nm após modificação com glutaraldeído. Essas variações são evidências que, de fato, as modificações com os grupos 3-aminopropil e glutaraldeído ocorrem nos poros da matriz. Por outro lado, a imobilização da enzima não provoca mudança na curva de distribuição de tamanho de poros indicando que a enzima GOx não está imobilizada nos poros da matriz.

As isotermas e a distribuição de tamanho de poros para a matriz SG2 e as modificações com 3-aminopropil, glutaraldeído e a enzima GOx são mostradas nas Figuras 31a, e 31b respectivamente.

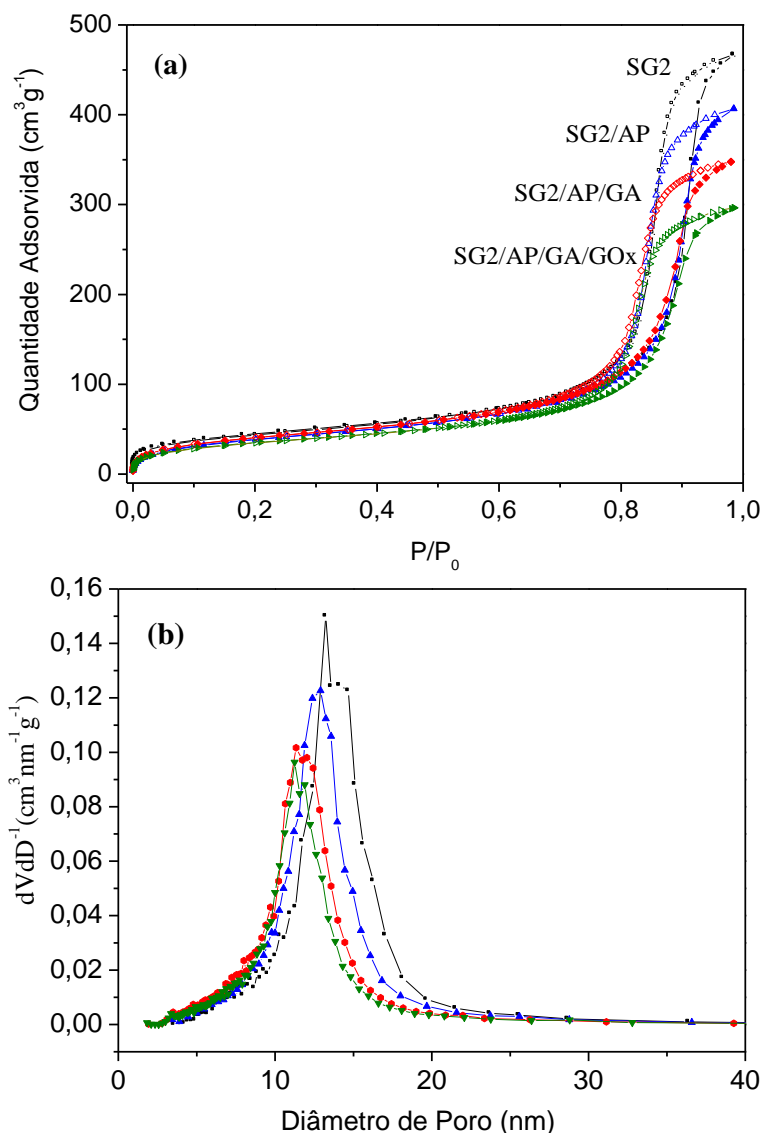


Figura 31. (a) Isothermas de adsorção e dessorção de N₂ da matriz SG2, SG2/AP, SG2/AP/GA e SG2/AP/GA/GOx. (b) Curvas de distribuição de tamanho de poros para a matriz SG2 antes e após todas as modificações.

Pelas isothermas da matriz SG2 antes e após modificação, mostradas na Figura 31a, observa-se que a matriz modificada com 3-aminopropil teve seu volume de poros alterado de 0,72 para 0,63 cm³ g⁻¹ e após modificação com glutaraldeído para 0,53 cm³ g⁻¹. As áreas superficiais específicas sofreram pouca variação de 158 m² g⁻¹ para 142 m² g⁻¹ e 147 m² g⁻¹ nessa sequência de modificações. A imobilização da enzima GOx ao suporte levou a uma diminuição no volume de poros de 0,53 para 0,45 cm³ g⁻¹ e na área superficial específica de 147 para 127 m² g⁻¹. Essas diminuições sugerem que a enzima bloqueia parcialmente o acesso do N₂ líquido aos poros da matriz.

As curvas de distribuição de tamanho de poros referentes à matriz SG2 e suas modificações, contempladas na Figura 31b, revelam um deslocamento para tamanhos menores de poros conforme a matriz foi modificada com 3-aminopropil e glutaraldeído. Esses resultados indicam que as modificações ocorrem nos poros da matriz. Ressalta-se que a modificação com a enzima GOx não produz alteração significativa na curva de distribuição de tamanho de poros. Assim, enzima GOx não está imobilizada nos poros da matriz SG2 mesmo esta apresentando um tamanho de poros maior que a matriz SG1.

As isotermas e as curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SG3 antes e após modificações são mostradas nas Figuras 32a e 32b, respectivamente. O gráfico inserido na Figura 31a facilita a visualização na variação das isotermas.

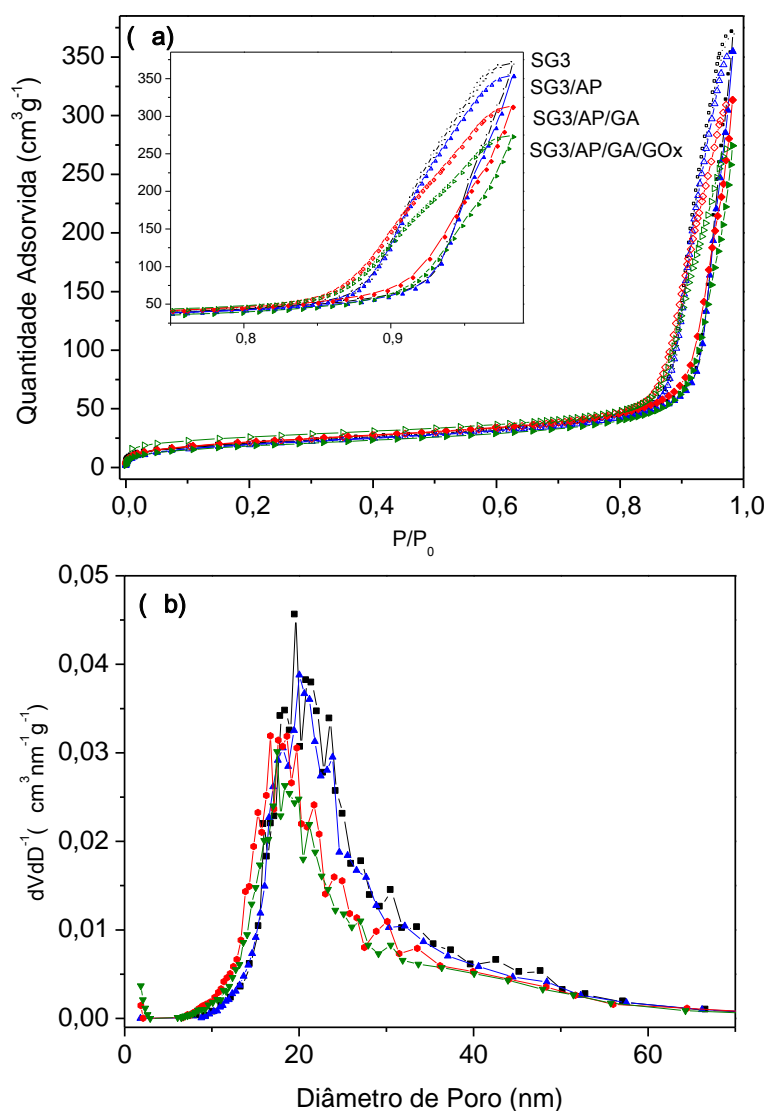


Figura 32. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ da matriz SG3, SG3/AP, SG3/AP/GA e SG3/AP/GA/GOx. (b) Curvas de distribuição de tamanho de poros para a matriz SG3 antes e após todas as modificações.

Pela análise das isotermas, inseridas na Figura 32a, observa-se que a modificação da matriz SG3 com o grupo 3-aminopropil não produz uma alteração significativa na superfície. A área superficial específica de $73 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e o volume de poros de $0,57 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ da matriz SG3 permanecem praticamente inalterados. Esse resultado indica que os grupos 3-aminopropil estão distribuídos na superfície de forma altamente dispersa. A modificação com glutaraldeído embora não altere significativamente a área superficial específica diminui o volume de poros de $0,57$ para $0,47 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. No entanto, a imobilização da enzima faz com que os valores de área superficial específica e de volume de poros decresçam de forma significativa passando para $65 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e $0,41 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ respectivamente.

Na sequência das modificações com 3-aminopropil, glutaraldeído e a enzima GOx, as curvas de distribuição de tamanho de poros revelaram que a matriz antes e após modificação com 3-aminopropil apresentam máximos em aproximadamente 21 nm, enquanto a modificação com glutaraldeído deslocou a curva de distribuição para 18,1 nm. Já a imobilização com a enzima GOx praticamente não alterou a distribuição de tamanho de poros que permaneceu com o máximo próximo de 18 nm.

De um modo geral observou-se que as modificações com aminopropil e glutaraldeído causaram um deslocamento do máximo da curva de tamanho de poros para valores menores ao passo que a imobilização da enzima não causa esse efeito. Na literatura^{151,152} foram relatados resultados similares para matrizes porosas modificadas com glutaraldeído e enzima. Os detalhes da porosidade e área superficial específica estão sumarizados na Tabela IX.

Tabela IX. Área superficial específica e volume de poros matrizes carbono cerâmico e suas modificações.

Amostra	Área Superficial	Volume de Poro	Tamanho de
	BET ($\pm 5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)	BJH ($\pm 0,02 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$)	Poros ^a (nm)
SG1	273	0,66	7,0
SG1/AP	240	0,48	5,7
SG1/AP/GA	184	0,35	5,6
SG1/AP/GA/GO _x	172	0,32	5,6
SG2	158	0,72	14
SG2/AP	142	0,63	12,5
SG2/AP/GA	147	0,53	11,3
SG2/AP/GA/GO _x	127	0,45	11,2
SG3	73	0,57	21,0
SG3/AP	72	0,54	20,7
SG3/AP/GA	78	0,47	18,1
SG3/AP/GA/GO _x	65	0,41	17,6

^a= máximo das curvas de distribuição de tamanho de poros.

5.2.2.2. Análise Termogravimétrica

Os termogramas obtidos para as matrizes SG1, SG2 e SG3 antes e após modificação com 3-aminopropil, glutaraldeído e a enzima GO_x são mostrados na Figura 33. Como todas as matrizes contêm 50 % de grafite, realizou-se também a análise termogravimétrica do grafite na qual nenhuma perda de massa significativa pode ser observada, confirmando sua elevada estabilidade térmica em atmosfera inerte até 600 °C.

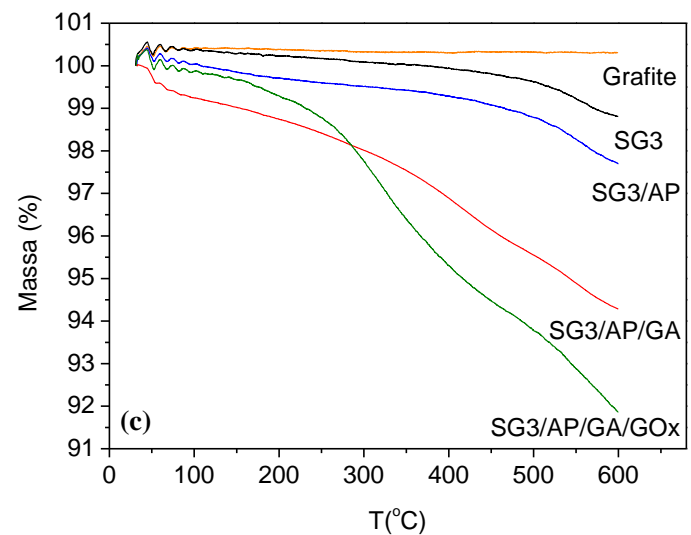
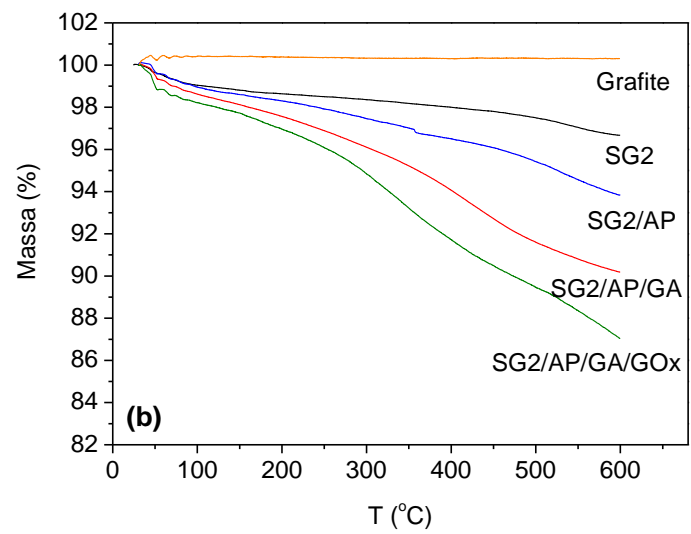
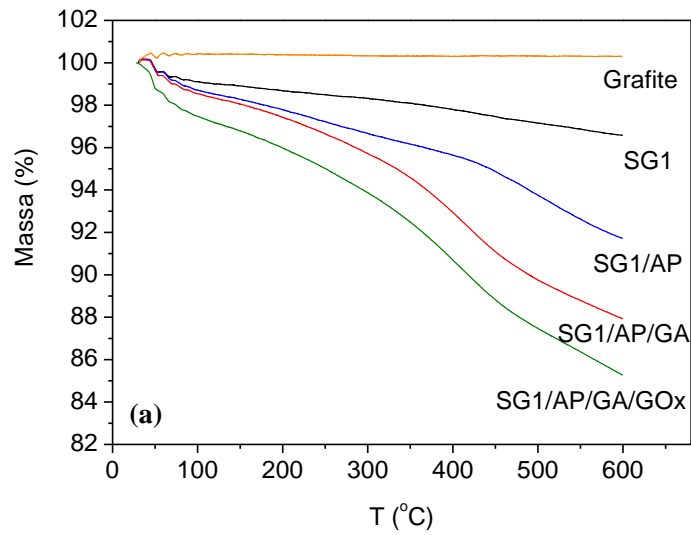


Figura 33. TGA para as diferentes matrizes e suas respectivas modificações: (a) SG1, (b) SG2 e (c) SG3.

Pela análise dos termogramas na Figura 33 foram observadas duas regiões distintas de perdas de massa. A primeira até 150 °C, que foi atribuída a dessorção de água da superfície dos materiais. A segunda perda de massa entre 150 até 600 °C, atribuída a desidroxilação da superfície da sílica, como também da decomposição da matéria orgânica, proveniente da funcionalização das matrizes, ou seja, do aminopropil, do glutaraldeído e da enzima, imobilizados. Foi observado para todos os conjuntos de materiais que essa perda de massa entre 150 até 600 °C aumenta com a sequência das modificações estando relacionado com o aumento de matéria orgânica incorporada nos materiais. A Tabela X reúne os resultados referentes às análises termogravimétricas das amostras.

Tabela X. TGA das matrizes SG e suas respectivas modificações.

Amostras	% Perdas de massa	% Perdas de massa
	0 até 150 °C	150 até 600 °C
grafite	0,417	0,128
SG1	1,081	2,324
SG1/AP	1,711	6,467
SG1/AP/GA	1,950	10,013
SG1/AP/GA/GOx	3,221	11,390
SG2	1,196	2,138
SG2/AP	1,392	4,771
SG2/AP/GA	1,866	7,930
SG2/AP/GA/GOx	2,263	10,652
SG3	0,295	1,475
SG3/AP	0,148	2,163
SG3/AP/GA	0,977	4,690
SG3/AP/GA/GOx	0,325	7,692

Esses dados foram usados para estimar o conteúdo orgânico correspondente aos grupos 3-aminopropil, glutaraldeído e da enzima GOx imobilizados. Para tal, efetuou-se

a diferença entre o material modificado com o grupo orgânico de interesse e a modificação anterior. Os valores correspondentes estão relacionados na Tabela XI.

Tabela XI. Determinação do teor orgânico referente às modificações das matrizes SG.

Grupo Orgânico	(mg/g SG) 150 até 600 °C
<u>SG1</u>	
AP	41,43
GA	35,46
GOx	13,77
<u>SG2</u>	
AP	26,33
GA	31,59
GOx	27,22
<u>SG3</u>	
AP	6,88
GA	25,27
GOx	30,02

Pode-se observar na Tabela XI que ocorre uma redução da quantidade de 3-aminopropil e glutaraldeído imobilizados à medida que a área de superfície diminui e o tamanho de poros aumenta, ou seja, de SG1 para SG3. No caso da enzima, observa-se um efeito inverso, ou seja, com o aumento do tamanho dos poros aumenta a quantidade de enzima imobilizada e a área específica sofre pouca alteração. Entretanto, o aumento na quantidade de enzima não foi acompanhado de redução no tamanho dos poros, conforme mostrado nas Figuras 30b, 31b e 32b.

Mesmo após modificação com 3-aminopropil, glutaraldeído e enzima GOx as isotermas indicam a predominância de mesoporos e são compatíveis com isotermas do Tipo IV propostas por Brunauer^{13,56,153,154}. A histerese ocorre quando há diferenças entre os processos de adsorção e dessorção e está intimamente relacionada ao tamanho e forma dos poros. As isotermas apresentadas em 30a, 31a e 32a são compatíveis com materiais que apresentam poros com uma extremidade aberta de raio menor que o corpo

do poro, conhecida como “pote de tinta”¹⁵⁵. A Figura 34 esquematiza a proposta de imobilização da enzima GOx nas matrizes SG1, SG2 e SG3.

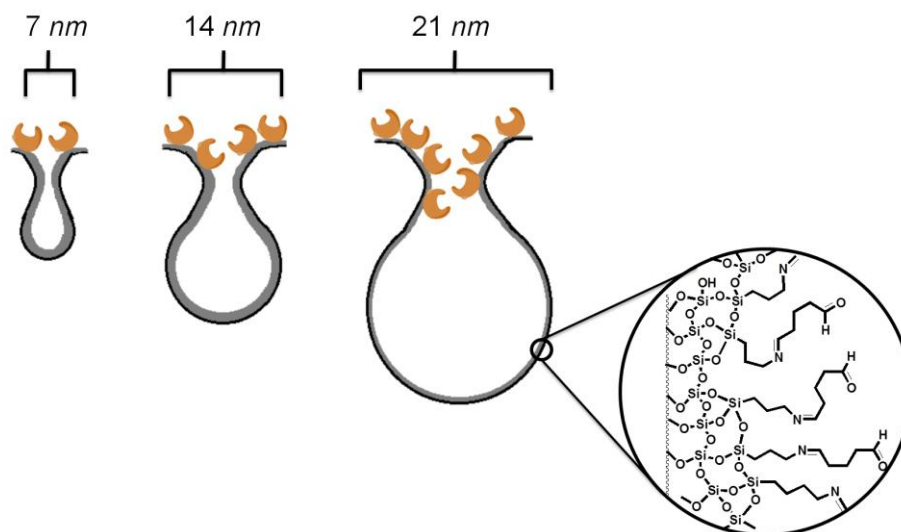


Figura 34. Esquema da modificação com a enzima GOx e seu efeito nos poros das matrizes SG1, SG2 e SG3.

A enzima GOx não difunde para o interior dos poros pois as matrizes estão modificadas em toda sua extensão com grupos amina e glutaraldeído fazendo que imobilização da enzima ocorra antes que esta acesse o interior dos poros. No entanto, poros maiores permitem que mais moléculas de enzima sejam imobilizadas ao acessar os poros, causando um bloqueio parcial na adsorção do nitrogênio. Essa proposta justifica a diminuição da área superficial específica e do volume de poros após a imobilização da enzima GOx bem como a manutenção do tamanho dos poros.

5.2.2.3. Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ das matrizes SG1, SG2 e SG3 pressionadas

As matrizes carbono cerâmicos SG1, SG2 e SG3 foram submetidas a uma pressão de aproximadamente 10 ton/cm² para a preparação dos eletrodos de trabalho. Análises de área superficial específica foram feitas para avaliar o efeito da pressão na superfície e tamanho de poros dos materiais. As Figuras 35, 36 e 37 mostram as isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e as curvas de distribuição de tamanho de poros das matrizes SG1, SG2 e SG3 antes e após terem sido pressionadas.

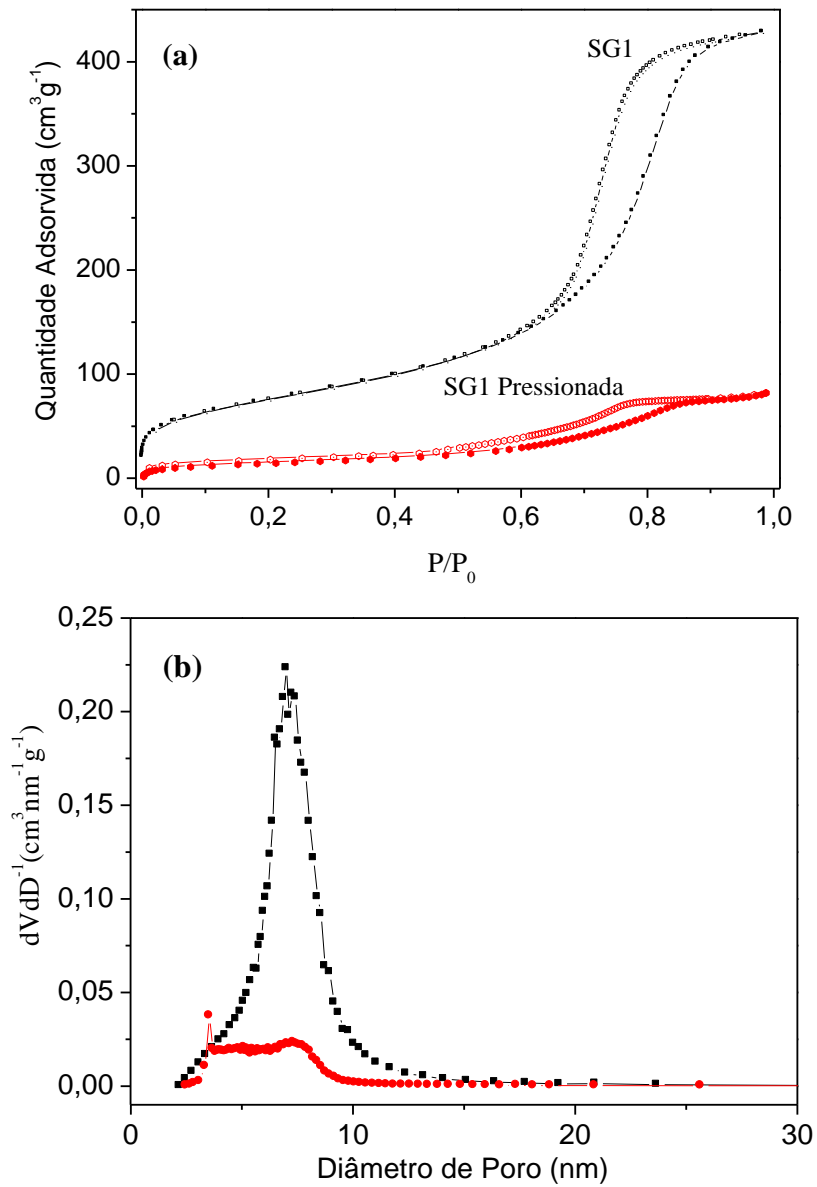


Figura 35. (a) Isothermas de adsorção e dessorção de N_2 e (b) Curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SG1 antes e após submetida à pressão.

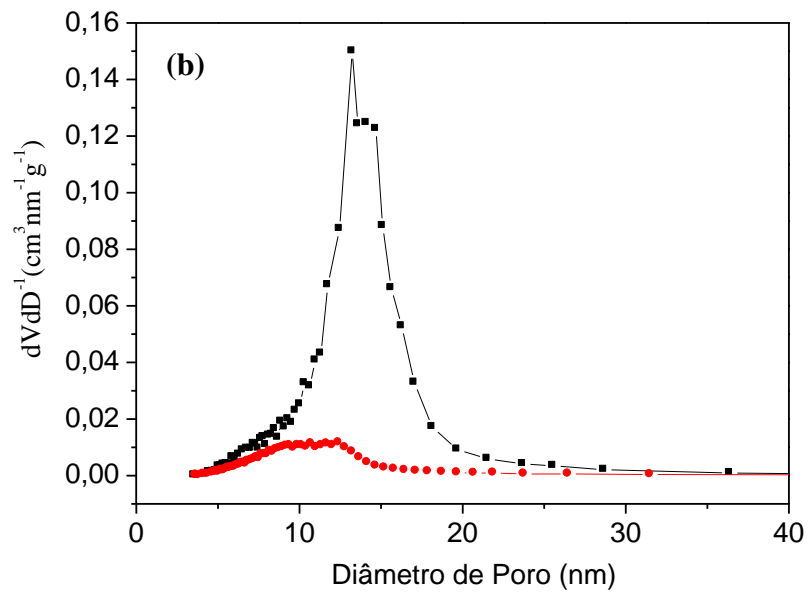
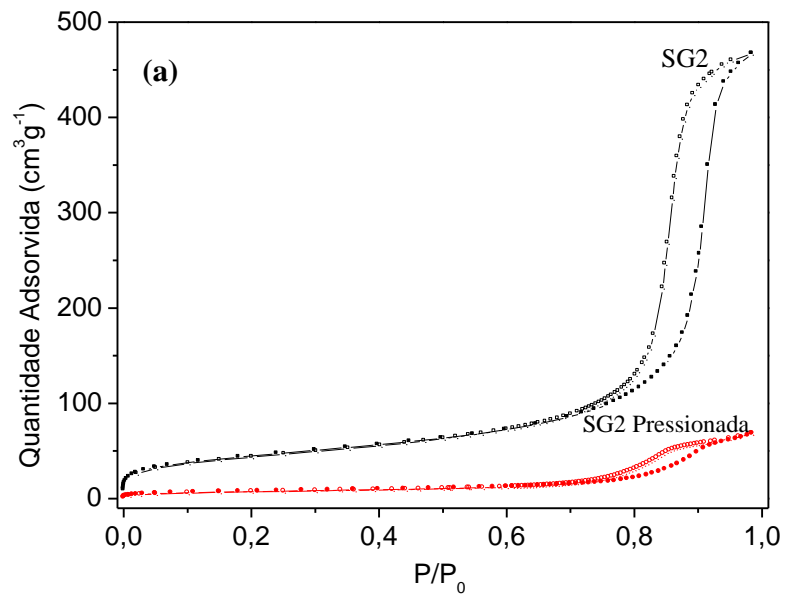


Figura 36. a) Isothermas de adsorção e dessorção de N_2 e (b) Curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SG2 antes e após submetida à pressão.

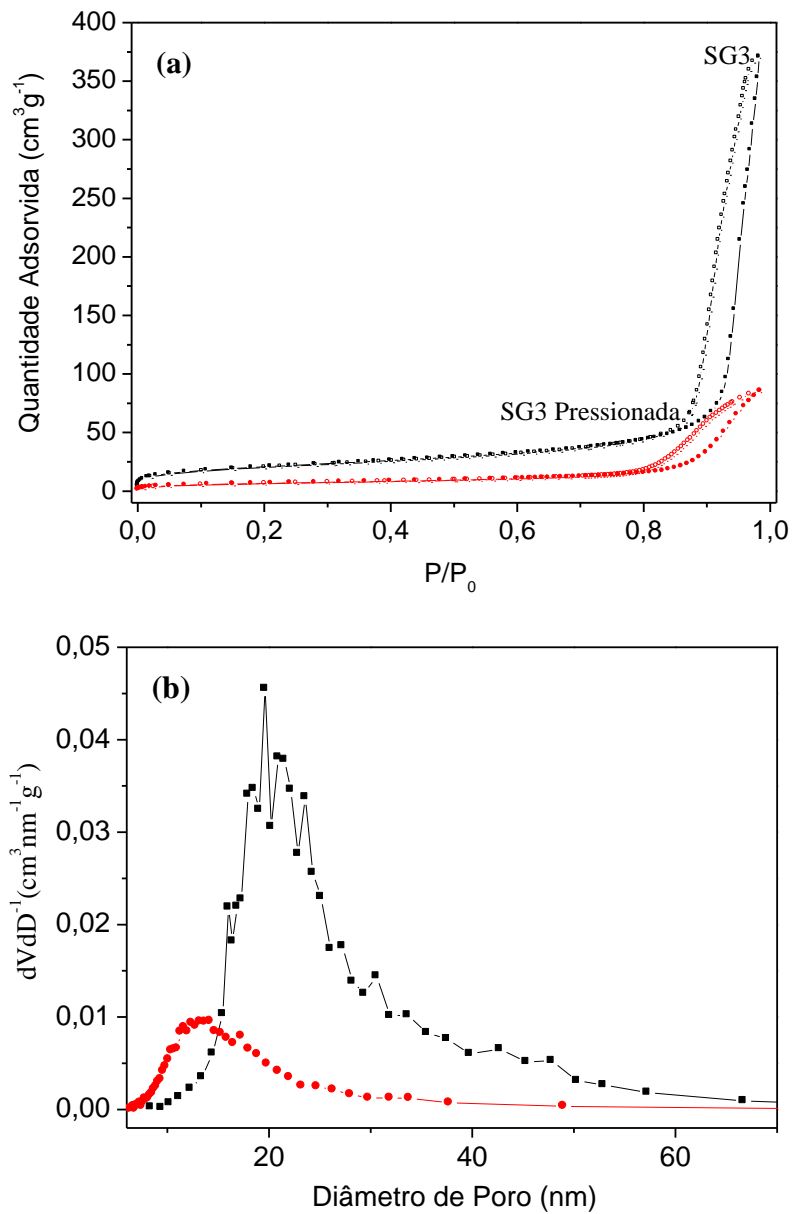


Figura 37. (a) Isothermas de adsorção e dessorção de N_2 e (b) Curvas de distribuição de tamanho de poros da matriz SG3 antes e após submetida à pressão.

Pelas isothermas mostradas nas Figuras 35a, 36a e 37a é possível observar uma drástica diminuição na quantidade de N_2 adsorvida nas matrizes SG1, SG2 e SG3 após terem sido submetidas à pressão de 10 ton/cm^2 . As curvas de distribuição de tamanho de poros foram deslocadas para valores menores após a prensagem das matrizes. A Tabela XII sumariza as informações referentes à área superficial específica dos materiais, volume e tamanho de poros antes e após serem pressionados.

Tabela XII. Valores comparativos da área específica para as matrizes carbono cerâmico antes e após serem pressionadas.

Amostra	Área Superficial	Volume de Poro	Tamanho médio (nm)
	BET ($\pm 5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)	BJH ($\pm 0,02 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$)	
SG1	273	0,66	7,0
SG1/Press	56,45	0,13	6,1
SG2	158	0,72	14
SG2/Press	26,55	0,10	11,7
SG3	73	0,57	25
SG3/Press	23,50	0,13	17

É possível observar que a área superficial específica e o volume de poros das três matrizes decaem após a prensagem. Esse resultado é compatível com o bloqueio de parte dos poros e também pela diminuição do tamanho. Ressalta-se que mesmo após terem sido pressionadas as matrizes ainda apresentam diâmetro de poros com tamanhos grandes o suficiente para permitir a difusão do analito, característica desejável no desenvolvimento de um sensor eletroquímico.

A Figura 38 mostra imagens de MEV e de mapeamento EDS de C, O e Si para a matriz SG3. Na ampliação utilizada, observa-se que não existem fases segregadas entre SiO_2 e partículas de C_{graf} . Nessa ampliação as imagens de EDS mostram que o C_{graf} está homogeneamente disperso na matriz.

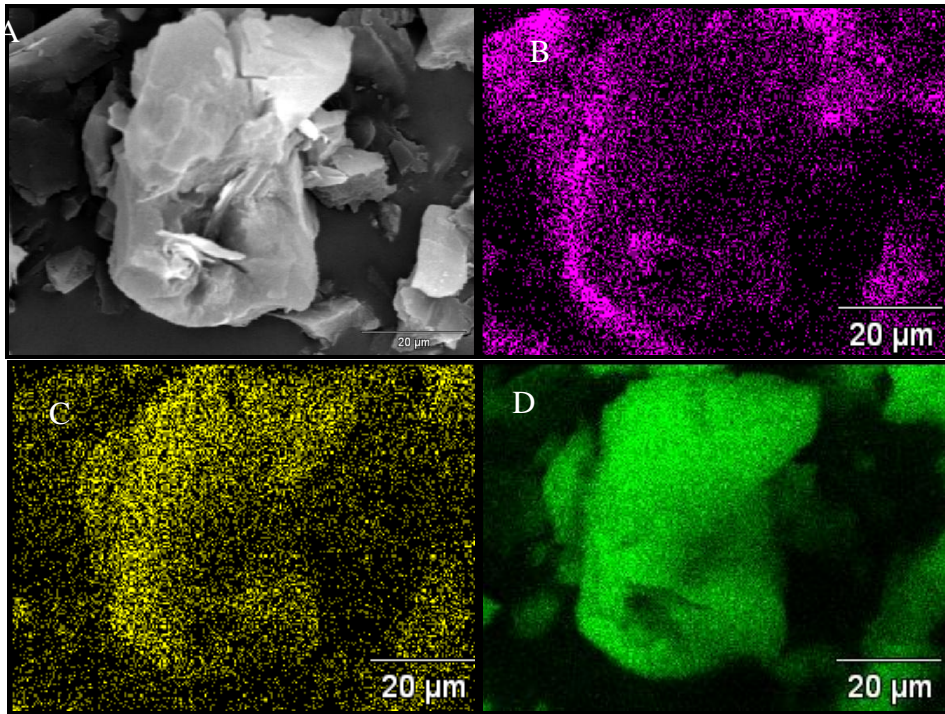


Figura 38. Micrografia obtida por MEV da amostra SG3 (A) e mapeamento de C (B), O (C) e Si (D) por EDS (b) a 1500 vezes.

Na Figura 39 são mostradas imagens obtidas por MEV das amostras SG3, SG3/AP, SG3/AP/GA E SG3/AP/GA/GOx.

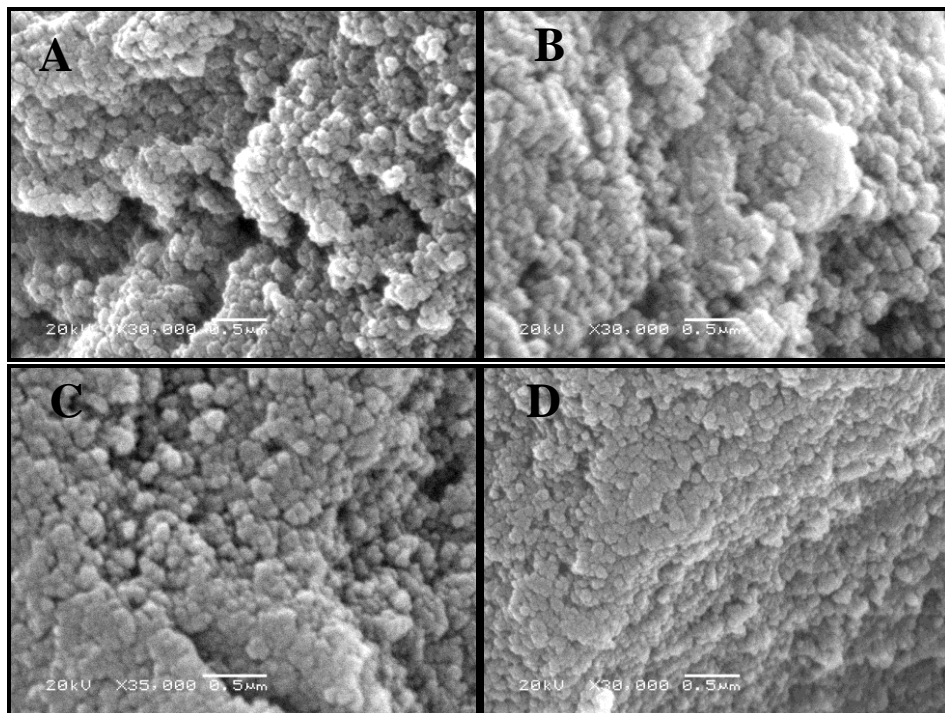


Figura 39. Imagens obtidas por MEV para as amostras (A) SG3, (B) SG3/AP, (C) SG3/AP/GA E (D) SG3/AP/GA/GOx.

As imagens da matriz SG3 antes e após modificação apresentam aglomerados característicos de partículas primárias esféricas com diâmetros entre 50 e 200 nm. A interconexão dessas partículas primárias resulta nas largas frações de mesoporos¹³. Os dados de distribuição de tamanho de poros confirmam a proposição acima. Observa-se também que as modificações não ocasionaram uma modificação na morfologia dos materiais no nível micrométrico.

5.2.3. Caracterização eletroquímica dos materiais SG1/AP/GA/GO_x, SG2/AP/GA/GO_x e SG3/AP/GA/GO_x por voltametria cíclica

Com o objetivo de avaliar o comportamento eletroquímico da enzima GO_x imobilizada nos suportes SG1/AP/GA/GO_x, SG2/AP/GA/GO_x e SG3/AP/GA/GO_x foram realizadas medidas preliminares por voltametria cíclica. A Figura 40 mostra os voltamogramas obtidos para os materiais SG/AP/GA/GO_x onde observa-se picos redox bem definidos devido a imobilização da espécie eletroativa (GO_x).

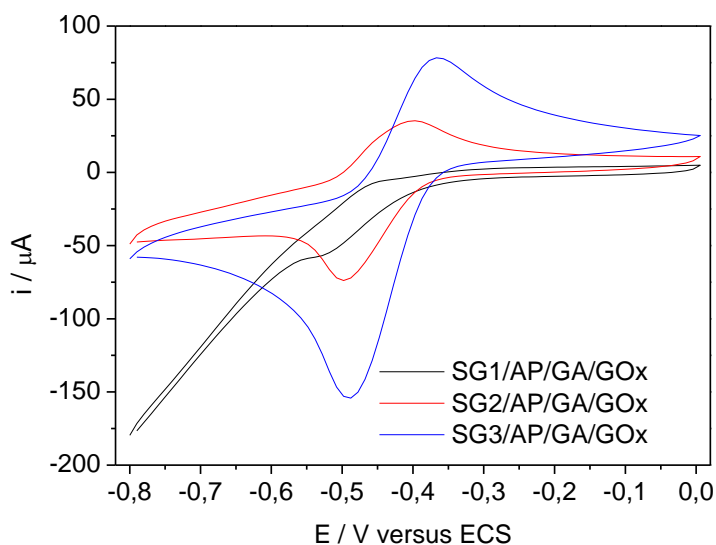


Figura 40. Voltamogramas dos eletrodos em atmosfera de gás argônio, tampão fosfato (pH 7,0) e $v=50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

A Tabela XIII mostra os valores de corrente de pico anódico e catódico, potenciais anódico e catódico, bem como a razão i_{pa}/i_{pc} e o valor de ΔE_p a partir dos voltamogramas apresentados na Figura 40. Para os três materiais, verifica-se a razão $i_{pa}/i_{pc} \neq 1$, esta é uma característica de sistemas *quasi-reversíveis*. O material

SG1/AP/GA/GOx ($\Delta E_p = 60\text{mV}$) apresenta menor separação entre os picos anódicos e catódicos que SG2/AP/GA/GOx ($\Delta E_p = 100\text{mV}$) e SG3/AP/GA/GOx ($\Delta E_p = 123\text{mV}$). No entanto, o eletrodo SG3/AP/GA/GOx é aquele com maior intensidade de corrente referente a imobilização da GOx e os picos atribuídos ao par redox FAD/FADH₂.

É possível verificar que a intensidade dos picos anódico e catódico aumenta com o tamanho de poros da matriz. Esse resultado corrobora com os dados obtidos e discutidos pelas técnicas de TGA e análise de adsorção e dessorção de N₂ em que foi demonstrado uma maior imobilização da enzima GOx na matriz SG3. Além disso, essa observação está de acordo com os dados obtidos através do método de quantificação de proteína (Bradford) que indicou uma maior quantidade de proteína imobilizada no material denominado SG3/AP/GA/GOx e, por isso, as correntes de pico são mais intensas para esse material, onde há uma maior quantidade de espécie eletroativa imobilizada.

Tabela XIII. Parâmetros obtidos por voltametria cíclica para os eletrodos SG/AP/GA/GOx.

Eletrodos Carbono Cerâmicos	i_{pa} μA	i_{pc} μA	i_{pa}/i_{pc}	E_{pa} mV	E_{pc} mV	ΔE_p mV
SG1/AP/GA/GOx	-8,731	-55,47	0,157	-461	-521	60
SG2/AP/GA/GOx	34,83	-73,81	0,472	-397	-497	100
SG3/AP/GA/GOx	78,20	-154,00	0,508	-366	-489	123

Considerando que o material SG3/AP/GA/GOx é aquele com maior quantidade de enzima imobilizada e que a matriz SG3 após pressionada apresenta maior tamanho de poros quando comparada a SG1 e SG2, o material SG3/AP/GA/GOx foi escolhido para ser testado como sensor para a glicose.

O efeito do pH para o par redox FAD/FADH₂ da GOx foi estudado em soluções de pH 6,0 a 7,5. Essa faixa foi escolhida levando em consideração que esta é a faixa citada na literatura³⁰. Diferentes soluções foram preparadas e, quando necessário, seus respectivos pH ajustados com NaOH (0,01 mol L⁻¹) e/ou HCl (0,01 mol L⁻¹), os resultados desta análise estão apresentados nas Figuras 41a e 41b.

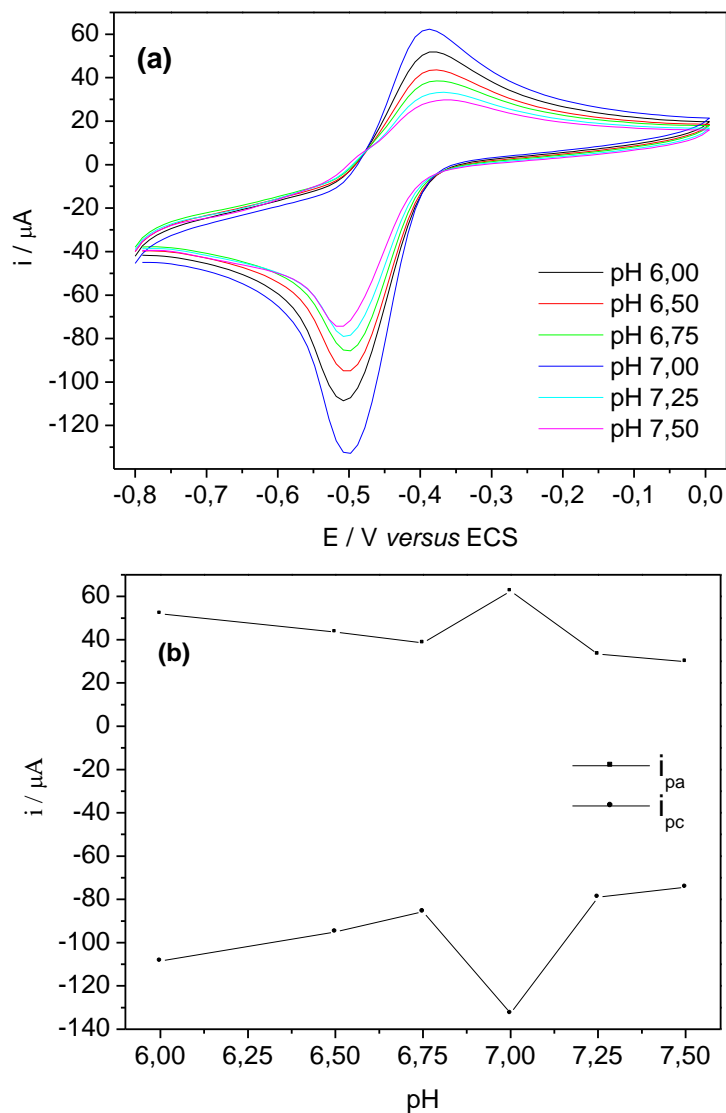


Figura 41. (a) Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo SG3/AP/GA/GOx em STF com diferentes valores de pH em atmosfera de gás Argônio. (b) Relação entre corrente de pico anódico e catódico e o pH.

Pela análise das correntes de pico anódico e catódico é possível observar que em pH 7,0 os picos apresentam maior intensidade de corrente. Desta forma, o pH selecionado para todas as medidas foi o pH 7,0.

Na Figura 42 as medidas de voltametria cíclica do material SG3/AP/GA/GOx comparado ao suporte SG3/AP/GA(voltamograma a) comprovam que os picos redox (voltamogramas b e c) são, de fato, devido a imobilização da espécie eletroativa (GOx), já que nenhum pico redox pode ser observado no material onde não há enzima imobilizada.

Ao pressionar o material SG3/AP/GA/GOx para a confecção dos discos, a

espécie eletroativa contida na superfície pode ter sua conformação afetada diferentemente daquelas que se encontram no interior do material, que poderiam estar com seu sítio ativo mais disponível. Desta forma, foram realizadas medidas de voltametria cíclica para o eletrodo SG3/AP/GA/GOx antes e após sua superfície ser polida manualmente com lixa de granulometria 1200.

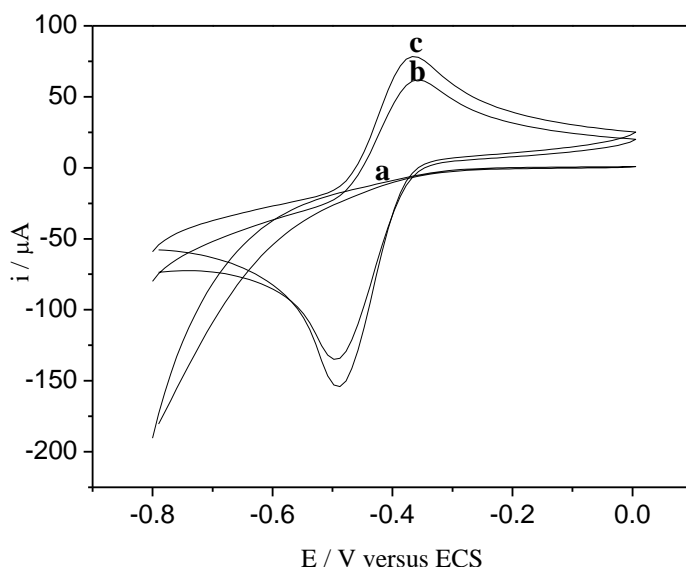


Figura 42. Voltamogramas dos eletrodos (A) SG3/AP/GA, (B) SG3/AP/GA/GOX (sem polir) (C) SG3/AP/GA/GOX (polida), em atmosfera de gás argônio, tampão fosfato (pH 7,0) e $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$.

A análise da Figura 42 permite inferir que i_{pa} e i_{pc} são maiores para o eletrodo SG3/AP/GA/GOx com a superfície polida (voltamograma C), quando comparados aos mesmos antes do polimento (voltamograma B). Assim, os picos redox bem definidos e *quasi*-reversíveis podem ser atribuídos a transferência eletrônica direta envolvida no processo redox da enzima GOx para conversão de GOx(FAD) para GOx(FADH₂)^{121,130,131,156}, conforme equacionado abaixo:



A Tabela XIV mostra os valores de corrente de pico anódico e catódico, potenciais anódico e catódico bem como a razão i_{pa}/i_{pc} , o valor de ΔE_p e o potencial formal E^0 obtidos a partir dos voltamogramas B e C. Os potenciais formais foram estimados de acordo com a equação $[(E_{pa} + E_{pc}) / 2]$. Esses valores de E^0 são próximos aos citados em outros trabalhos¹⁵⁷⁻¹⁶⁰. Como o eletrodo com a superfície polida

apresentou maior intensidade nas correntes de pico anódica e catódica, essa condição foi a escolhida para dar continuidade às medidas. O valor elevado ΔE_p do eletrodo SG3/AP/GA/GOx (Tabela XIV) provavelmente está relacionado ao método de imobilização por ligação covalente e que dificulta a transferência eletrônica direta entre o centro redox da GOx e o eletrodo. Sabe-se que o centro redox da GOx, FAD, está ocluído em uma camada proteica resultando em uma longa distância entre o centro redox e a superfície do eletrodo^{130,127}. Adicionalmente, a imobilização por ligação covalente pode deixar o sítio ativo da enzima inacessível. Por outro lado, com este procedimento de imobilização se obtém uma maior área eletroativa, pois as intensidades de corrente dos picos anódico e catódico são muito maiores do que aquelas citadas na literatura^{120-122,128}.

Tabela XIV. Dados dos eletrodos SG3/AP/GA/GOx (antes do polimento), SG3/AP/GA/GOx (polido).

Eletrodos Carbono Cerâmicos	i_{pa} μA	i_{pc} μA	i_{pa}/i_{pc}	E_{pa} mV	E_{pc} mV	ΔE_p mV	$E^{o'}$ mV
SG3/AP/GA/GOx (sem polimento)	61,80	-134,40	0,459	-360	-496	136	- 428
SG3/AP/GA/GOx (polido)	78,20	-154,00	0,508	-366	-489	123	- 428

A influência da velocidade de varredura nas correntes de pico anódico e catódico para o eletrodo SG3/AP/GA/GOx foi estudada por voltametria cíclica, conforme mostrado na Figura 43.

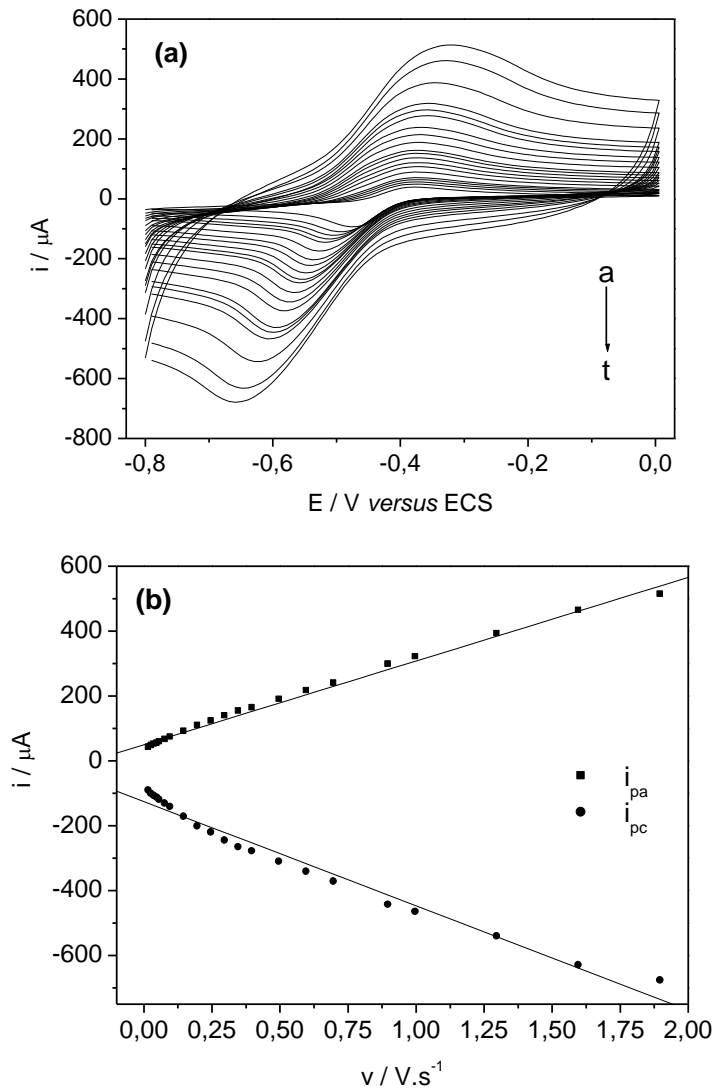


Figura 43. (a) Voltamogramas do eletrodo SG3/AP/GA/GOx em gás argônio, STF 0,01mol L⁻¹ pH 7,0 em 20 – 1900 mV.s⁻¹, respectivamente. (b) relação entre i_{pa} e i_{pc} com a velocidade de varredura.

Ambas, i_{pa} e i_{pc} , aumentam linearmente com o aumento da velocidade de varredura entre 0,02 e 1,9 V s⁻¹. Este comportamento é característico de um processo redox controlado por espécies eletroativas adsorvidas na superfície do eletrodo^{161–163}.

As equações das retas i_{pa} e i_{pc} versus velocidade de varredura para o material SG3/AP/GA/GOx são descritas abaixo.

$$i_{pa} \text{ (A)} = 4,986 \times 10^{-5} + 2,579 \times 10^{-4} v \text{ (V s}^{-1}\text{)} \quad R= 0,997 \quad (10)$$

$$i_{pc} \text{ (A)} = -1,254 \times 10^{-4} - 3,216 \times 10^{-4} v \text{ (V s}^{-1}\text{)} \quad R= 0,989 \quad (11)$$

Através da dependência linear observada entre i_{pa} e i_{pc} e a velocidade de varredura (equações 10 e 11), foi possível estimar a quantidade de enzima eletroativa na

superfície do eletrodo pela seguinte equação³³:

$$i_p = n^2 F^2 v A \Gamma / 4RT \quad (12)$$

Onde:

n = número de elétrons transferidos;

F = 96485 C mol⁻¹

v = velocidade de varredura

A = área do eletrodo (cm²)

Γ = concentração de GOX na superfície do eletrodo (mol cm⁻²)

R = 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹

T = 298K

Para o eletrodo carbono cerâmico em estudo, a área calculada através da equação $A = \pi r^2$ foi de 0,283 cm². Conforme discutido e equacionado, o número de elétrons envolvidos no processo redox da GOx é 2. Assim, através dos coeficientes angulares das equações 10 e 11 e da equação 12 foi possível estimar a quantidade de GOx eletroativa na superfície do eletrodo como sendo $5,3 \times 10^{-5}$ mol cm⁻². O valor encontrado para a quantidade de enzima GOx na superfície do eletrodo SG3/AP/GA/GOx é superior àqueles citados na literatura^{120,126,128,130} e justifica as correntes de pico anódico e catódico serem também. Acredita-se que isso ocorreu devido ao tamanho de poros da matriz SG3 que possibilitou a imobilização de maior quantidade de enzima.

Conforme descrito por Laviron¹⁶⁴, uma medida experimental bastante útil na determinação dos parâmetros cinéticos como o coeficiente de transferência de carga (α) e a constante de transferência heterogênea (k_s) é a diferença entre E_{pa} e E_{pc} , definida como ΔE_p . De acordo com Laviron, para $\Delta E_p > 200 / n$ (mV), onde n corresponde ao número de elétrons transferidos ($n=2$), os valores de α e k_s podem ser obtidos através da relação entre o potencial de pico E_p e $\log v$ que em elevadas velocidades possui um comportamento linear.

Para o cálculo de α , o coeficiente angular das retas citadas acima foi utilizado e, segundo Laviron, correspondem a $-2,3RT/\alpha nF$ para o pico catódico e $2,3RT/(1-\alpha)nF$ para o pico anódico.

O coeficiente de transferência heterogênea foi calculado segundo a equação:

$$\text{Log } k = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \alpha \log - \log(RT/nFv) - \alpha(1 - \alpha) nF\Delta E_p / 2,3RT \quad (13)$$

A Figura 44a exibe o gráfico da relação E_p e $\log v$ do eletrodo. Como pode ser visto, para velocidades de varredura maiores, a condição de Laviron é obedecida com valores superiores de ΔE_p . Assim, para a aplicação da equação de Laviron o gráfico está apresentado conforme a Figura 44b.

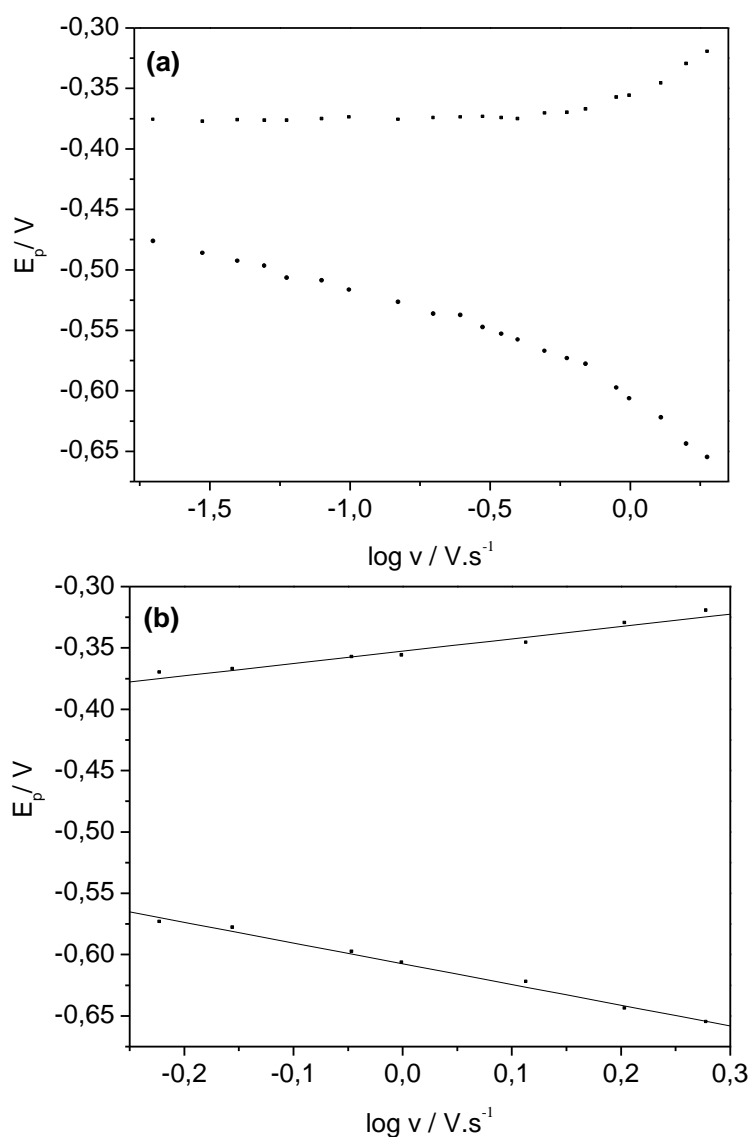


Figura 44. (a) Curvas E_{pa} e E_{pc} versus $\log v$ e (b) Curvas E_{pa} e E_{pc} versus $\log v$ com $v > 0,60 \text{ V.s}^{-1}$ para o eletrodo carbono cerâmico SG3/AP/GA/GOx.

As equações que descrevem as retas mostradas na Figura 44b são:

$$E_{pa}(V) = -0,35263 + 0,10044 \log v \text{ (V.s}^{-1}\text{)} \quad R = 0,980 \quad (14)$$

$$E_{pc}(V) = -0,60745 - 0,16896 \log v \text{ (V.s}^{-1}\text{)} \quad R = 0,996 \quad (15)$$

O coeficiente angular da equação 14 corresponde a:

$$2,3RT/(1 - \alpha)nF \quad (16)$$

O coeficiente angular da equação 15 corresponde a:

$$-2,3RT/\alpha nF \quad (17)$$

Relacionando os coeficientes angulares com suas respectivas equações 16 e 17 o valor de α foi estimado através da média dos valores obtidos como sendo 0,44. Esse valor é próximo ao esperado para um processo simples de transferência de elétrons onde $\alpha = 0,5$. Conhecido o valor de α , a equação 13 foi utilizada para o cálculo do k_s entre a GOx e o eletrodo como sendo $0,279 \text{ s}^{-1}$.

A Figura 45 mostra o comportamento do eletrodo SG3/AP/GA/GOx em atmosfera inerte (gás argônio), atmosfera aberta e em atmosfera de gás oxigênio (O_2).

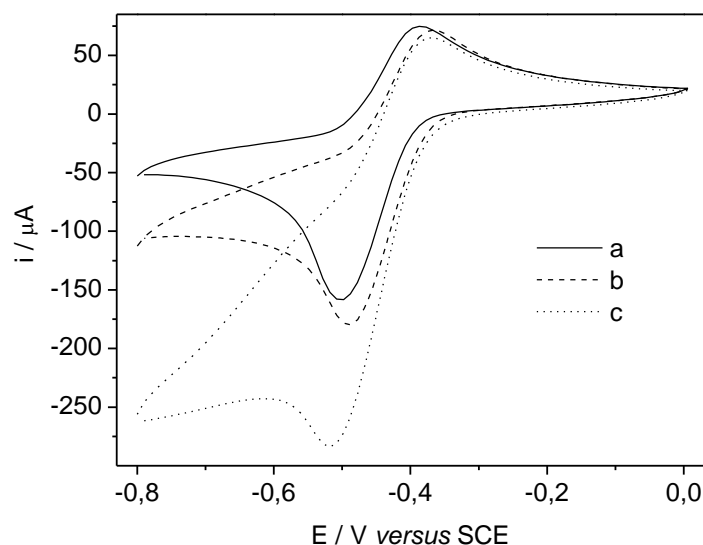
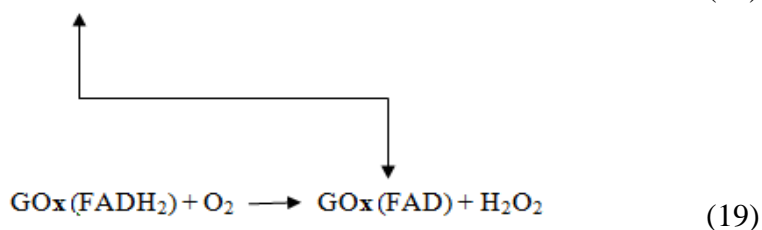
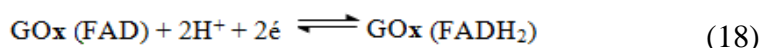


Figura 45. Voltamogramas de SG3/AP/GA/GOx em (a) atmosfera de gás argônio, (b) atmosfera aberta e (c) atmosfera de gás oxigênio em tampão fosfato 0,01mol L⁻¹ pH7,0, v= 50mVs⁻¹.

Mediante análise dos voltamogramas da Figura 45 percebe-se um aumento na corrente de pico catódico e um decréscimo na corrente de pico anódico em atmosfera aberta e em atmosfera de O₂, respectivamente, quando comparado com atmosfera de gás argônio. Isso indica que o eletrodo exibe boa atividade eletrocatalítica para oxigênio dissolvido. Tal observação pode ser explicada de acordo com as equações 18 e 19:



Devido a rápida transferência de elétrons entre a GOx e o eletrodo, a reação eletroquímica direta da GOx imobilizada no eletrodo ocorre, levando a conversão de GOx(FAD) a GOx(FADH₂). Então, GOx(FADH₂) reduz o oxigênio dissolvido e regenera GOx(FAD), resultando em uma reação eletrocatalítica que ocorre outra vez. Resultados similares foram reportados na literatura^{121,122,161}.

A estabilidade do biossensor foi testada por voltametria cíclica. O eletrodo foi ciclado repetidas vezes em solução tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹. Durante as varreduras a

50 mV s^{-1} , não se observou mudanças significativas nas correntes de pico tanto anódica quanto catódica conforme pode ser constatado na Figura 46.

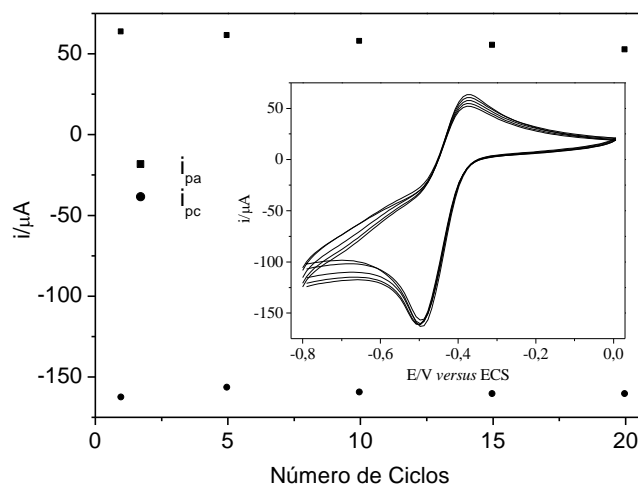


Figura 46. Estudo de Voltametria Cíclica para avaliar a estabilidade do eletrodo SG3/AP/GA/GOx.

Com isso, pode-se afirmar que a enzima GOx está fortemente aderida à matriz SG3/AP/GA, evitando lixiviação da mesma e, com isso, proporcionando estabilidade ao biossensor. Essa resposta era esperada, tendo em vista que a imobilização foi realizada por meio da formação de ligações covalentes entre a enzima GOx e o suporte. Assim, o eletrodo modificado apresenta boa estabilidade física e química.

5.2.4. Estudo da atividade eletrocatalítica do material SG3/AP/GA/GOx para a glicose

Considerando a efetiva imobilização da enzima GOx no suporte, o eletrodo SG3/AP/GA/GOx foi testado para avaliar sua resposta frente a adições consecutivas de glicose ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$), conforme mostrado na Figura 47.



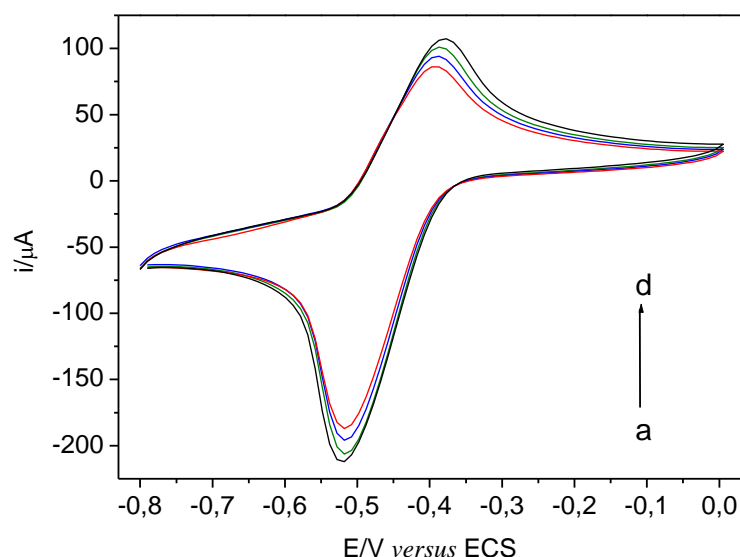


Figura 47. Voltamogramas Cíclicos SG3/AP/GA/GOx em atmosfera de argônio, solução tampão Fosfato pH 7,0 contendo 0,00; 1,92; 3,70 e 6,90 mmol L⁻¹ de glicose (de (a) a (d)) com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Pode-se observar uma diminuição nas intensidades de pico anódico e catódico com as adições de glicose indicando que a transferência eletrônica direta entre a enzima e o eletrodo foi restringida quando comparada ao sistema sem glicose. Isso pode ser atribuído ao fato de que a glicose é o substrato da reação catalisada pela enzima GOx e, consome a forma oxidada GOx(FAD) da superfície do eletrodo.

O decréscimo na intensidade das correntes de pico anódico pode ser atribuído a saturação da superfície do eletrodo pelo substrato devido a cinética lenta de transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo.

Após a caracterização eletroquímica e análise dos dados produzidos por voltametria cíclica, é possível confirmar a existência de transferência eletrônica direta entre a enzima e o suporte. A concentração de glicose pode ser detectada pelo decréscimo da corrente anódica e, adicionalmente afirmar que a GOx está fortemente aderida ao suporte atribuindo estabilidade ao mesmo.

Para avaliar quantitativamente e inferir sobre o desempenho dos eletrodos, os mesmos foram testados pela técnica de cronoamperometria, onde se aplica um potencial controlado e a resposta da corrente e a sua variação com o tempo é registrada³².

A Figura 48 mostra a resposta amperométrica do eletrodo para adições consecutivas de glicose.

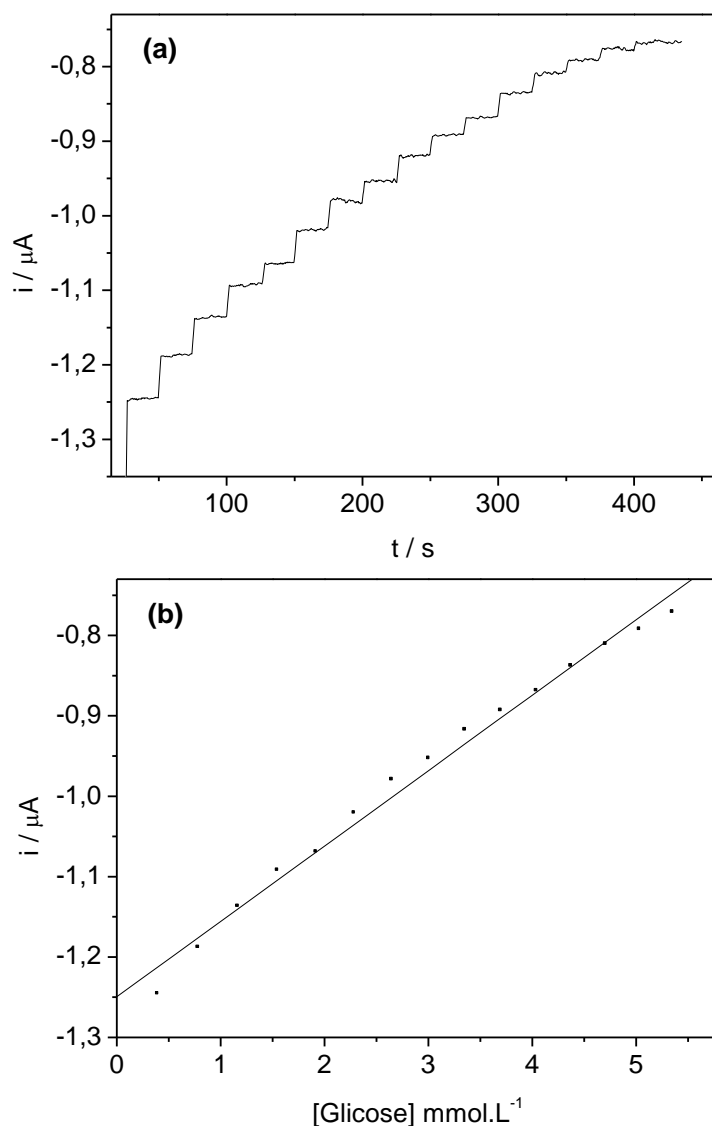


Figura 48. Resposta amperométrica (i versus t) em atmosfera inerte de gás argônio. (a) SG3/AP/GA/GOx com adições sucessivas de 0,01 mmol de glicose, potencial aplicado -0,366 V e (b) curva de calibração para o eletrodo SG3/AP/GA/GOx.

A resposta linear foi na faixa de concentração entre 0,39 e 5,36 mmol L⁻¹ (Figura 48b). A equação de regressão linear é $i(\mu\text{A}) = -1,249 + 0,094 [\text{glicose}] (\text{mmol L}^{-1})$, com coeficiente de correlação linear de 0,994. A sensibilidade (S) do eletrodo foi calculada a partir da inclinação da reta como sendo de 0,33 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$. O limite de detecção ($\text{LD} = 3 \cdot S_B S^{-1}$) calculado foi de 0,93 mmol L⁻¹.

No intuito de melhorar a sensibilidade do material que apresentou maior faixa linear de concentração, um estudo alterando a atmosfera do sistema foi realizado. Assim, na tentativa de simplificar o sistema optou-se por utilizar atmosfera saturada de O₂ (11,8 mg L⁻¹), as medidas estão ilustradas nas Figuras 49a e 49b.

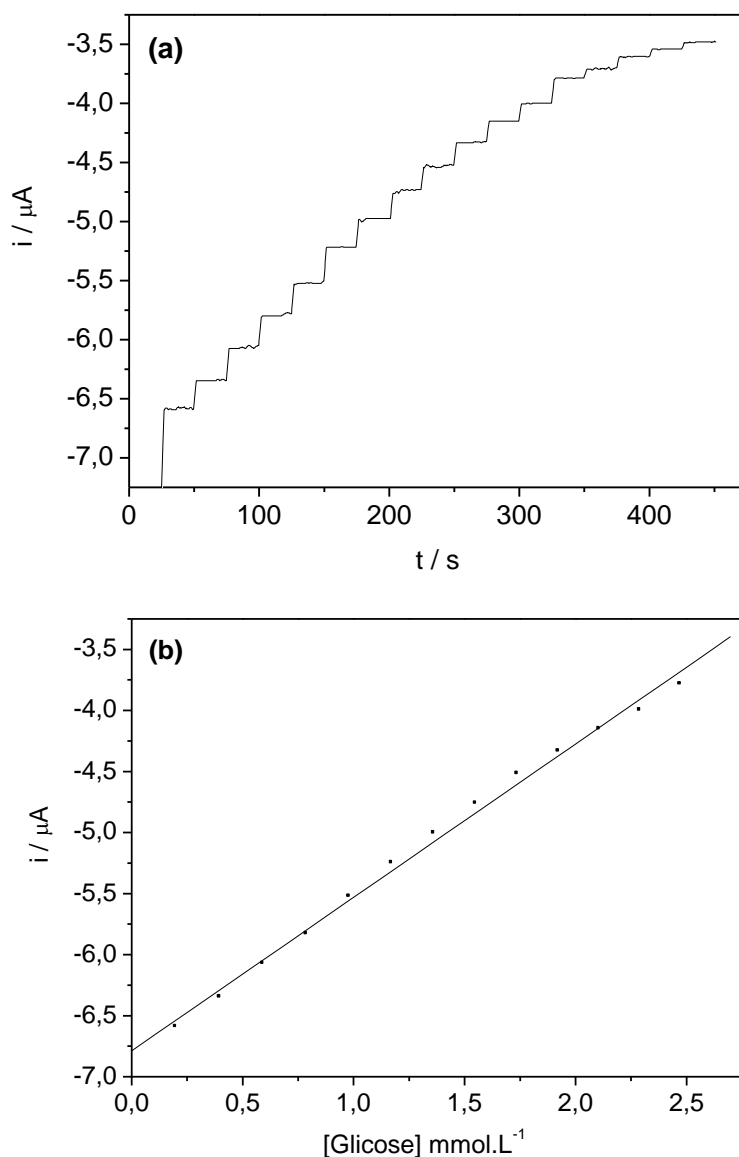


Figura 49. (a) Resposta cronoamperométrica do eletrodo SG3/AP/GA/GOx em atmosfera saturada de O_2 , STF pH 7,0. $E = -0,366\text{V}$. (b) Curva de calibração do eletrodo SG3/AP/GA/GOX sucessivas adições de $0,005 \text{ mmol}$ de glicose.

A faixa linear de resposta para o eletrodo SG3/AP/GA/GOx foi entre $0,2$ e $2,47 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 49b). A equação de regressão linear traçada corresponde a equação $i(\mu\text{A}) = -6,788 + 1,257 [\text{glicose}] (\text{mmol L}^{-1})$, com coeficiente de correlação linear de $0,997$. A sensibilidade do eletrodo foi calculada a partir da inclinação da reta como sendo de $4,44 \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. O LD calculado foi de $0,26 \text{ mmol L}^{-1}$.

As Figuras 48a e 49a mostram que as respostas de corrente tendem a atingir um patamar quando a concentração de glicose aumenta mais que $4,7 \text{ mmol L}^{-1}$ e $2,6 \text{ mmol L}^{-1}$. Esse é um comportamento típico de sistemas com cinética regida por Michaelis-Menten¹²⁶, ou seja, sistemas enzimáticos com o efeito da concentração da

glicose na taxa de uma reação catalisada. A constante aparente de Michaelis-Menten (K_M) é um importante parâmetro da cinética entre a enzima e o eletrodo no biossensor pois está associada a afinidade da enzima ao substrato. Assim, para o desenvolvimento de eletrodos é desejável valores menores para K_M e maiores para $i_{máx}$. A constante de Michaelis-Menten pode ser calculada de acordo com a equação de Lineweaver-Burk:

$$1/i_{ss} = K_M/i_{máx} 1/C + 1/i_{máx} \quad (21)$$

Onde i_{ss} é a corrente de estado estacionário após a adição de glicose, $i_{máx}$ é a corrente máxima obtida após a saturação da curva e C é a concentração de glicose na solução. A partir dos dados das Figuras 48b e 49b obteve-se uma curva de i_{ss}^{-1} vs C^{-1} e então, K_M e $i_{máx}$ para o eletrodo SG3/AP/GA/GOx foram estimados em 1,27 mmol L⁻¹ e 0,59 µA em atmosfera de gás argônio e em 0,52 mmol L⁻¹ e 3,12 µA em atmosfera saturada de O₂. Os valores de K_M são comparáveis aos relatados na literatura^{121,126,127,165}, conforme Tabela XV.

Tabela XV. Valores de K_M e $i_{máx}$ para biossensores eletroquímicos de glicose e do eletrodo SG3/AP/GA/GOx.

Biossensor	K_M (mM)	Referência
GOD/MWCNT-ACS	0,5	[122]
Nafion/GOD/Ag-Pdop@CNT	5,46	[127]
GOD/Chit-MWCNTs/AuNRs	1,34	[128]
PPyAA-Au/GOx	1,83	[165]
SG3/AP/GA/GOx (Argônio)	1,27	Este
SG3/AP/GA/GOx (O ₂)	0,52	Trabalho

GOD/MWCNTs-ACS: Glicose Oxidase/nanotubos de Carbono-sílica revestida com alumina.

Nafion/GOD/Ag-Pdop@CNT: Nafion/Glicose Oxidase/Prata-Polidopamina@nanotubos de carbono.

Chit-MWCNTs/GOD/AuNRs: Quitosana-nanotubos de carbono/Glicose Oxidase/nanobastões de ouro.

PPyAA-Au/GOx: Ácido poli pirrol propílico- nanopartículas de ouro/Glicose Oxidase.

Desta forma, verifica-se que a sensibilidade do biossensor é, de fato, maior em atmosfera de oxigênio, isso é devido ao O₂ ser a espécie elétron-aceptor da reação de oxidação da glicose.

Sabe-se que dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico são compostos de grande interesse biomédico por executarem funções essenciais no metabolismo dos mamíferos. No entanto, quando presentes em amostras biológicas podem interferir nos ensaios que utilizam reações de oxidorredução^{166,167}. A reação da GOx com a glicose envolve processos redox e, por isso, o eletrodo foi testado para os interferentes citados, considerando o sistema com maior sensibilidade, ou seja, àquele em atmosfera saturada de oxigênio. A Figura 50 mostra o efeito dessas possíveis espécies interferentes na detecção da glicose.

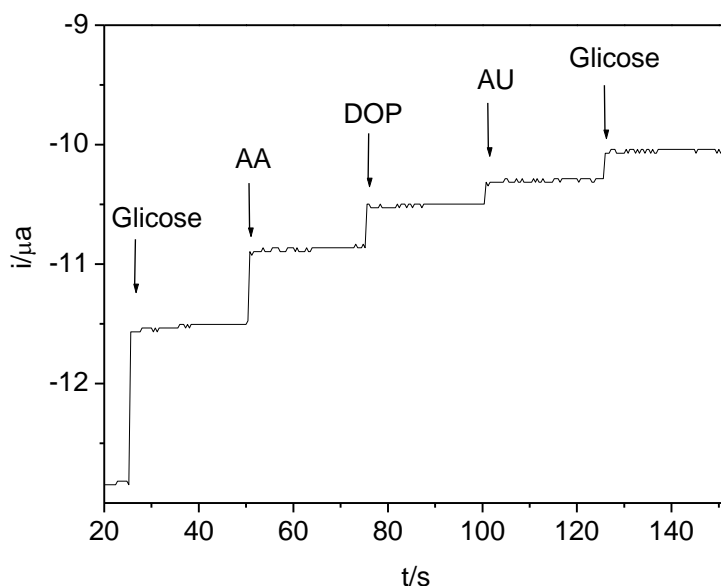


Figura 50. Cronoamperograma do eletrodo SG3/AP/GA/GOx para adição de 0,5 mM de glicose; 0,5 mM AA; 0,5 mM DOP; 0,5 mM AU e 0,5 mM de glicose, em atmosfera saturada de O₂ STF (pH=7,0). Potencial aplicado= -0,366V.

Nota-se na Figura 50, que além do material ter respondido para as espécies eletroativas que coexistem com a glicose no sangue, após a adição dos mesmos, houve um decréscimo na resposta do biossensor para o analito de interesse, a glicose. A Figura 51 mostra a resposta do eletrodo SG3/AP/GA/GOx frente adições dos mesmos interferentes porém, em atmosfera inerte.

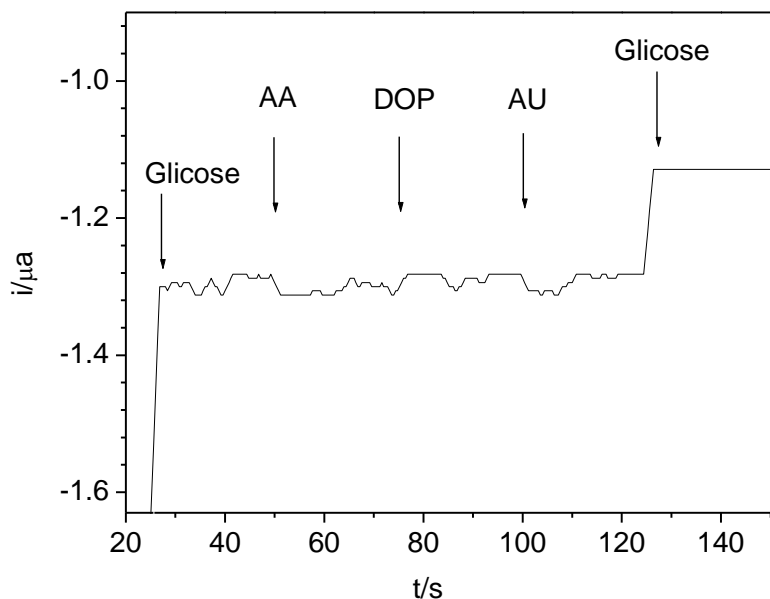


Figura 51. Cronoamperograma do eletrodo SG3/AP/GA/GOx com adições consecutivas de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose; $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ácido ascórbico; $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ dopamina; $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ácido úrico e $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose em atmosfera inerte STF (pH=7,0). Potencial aplicado= - 0,366V.

Em atmosfera inerte observa-se que as adições de ácido ascórbico, ácido úrico e dopamina, não causaram qualquer interferência significativa na resposta de corrente da glicose. Assim, pode-se afirmar que em atmosfera inerte, o sensor torna-se mais seletivo.

A reprodutibilidade na preparação do eletrodo foi avaliada por voltametria cíclica em STF pH 7,0 e sob atmosfera inerte utilizando seis diferentes eletrodos preparados a partir do material SG3/AP/GA/GOx. O desvio padrão relativo entre os eletrodos foi calculado como sendo de 22%. Esse desvio se deve a dificuldade de reproduzir a área superficial do eletrodo¹⁶⁸, considerando o método de preparação e o polimento. No entanto, para um mesmo eletrodo do material SG3/AP/GA/GOx polido repetidamente, as intensidades de corrente avaliadas por voltametria cíclica, após cada polimento, estão mostradas na Figura 52.

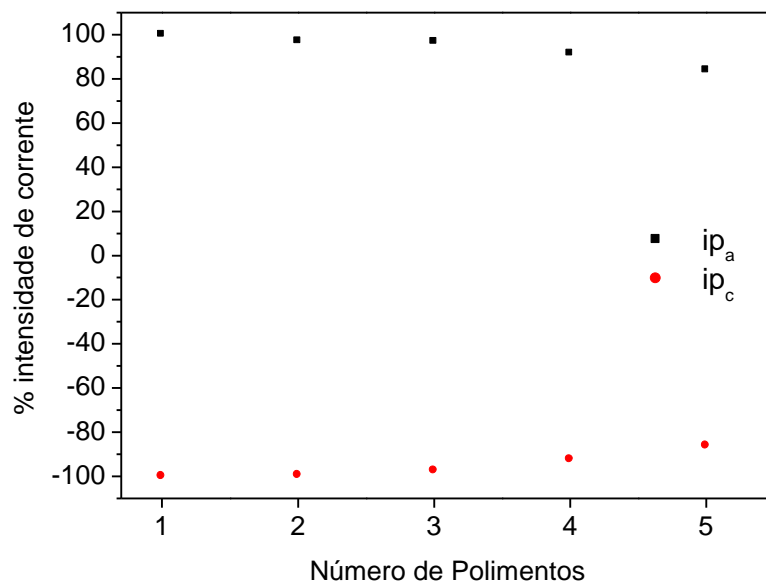


Figura 52. Intensidade relativa das correntes de pico anódico e catódico do eletrodo SG3/AP/GA/GOx em atmosfera inerte STF (pH=7,0). Potencial aplicado= -0,366V.

O eletrodo apresentou um desvio padrão relativo de 6% após ser polido por 5 vezes. Esse resultado mostra que o eletrodo carbono cerâmico com a enzima imobilizada é uma alternativa interessante no campo de desenvolvimento de biossensores, pois além de dispensar o uso de eletrodos comerciais é passível de reutilização.

Conclusões



6. CONCLUSÕES

Esta tese de doutorado foi organizada de forma a apresentar os resultados obtidos no desenvolvimento de dois diferentes materiais híbridos denominados Db/Sílica e SG/AP/GA/GOx. Esses materiais foram utilizados como modificadores de eletrodos e testados como dispositivos eletroquímicos na detecção do pesticida metil paration e de glicose, respectivamente.

O silsesquioxano iônico contendo o grupo cloreto de 1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octano foi imobilizado, na forma de um filme, na superfície de um xerogel de sílica (Db/Sílica). A imobilização foi confirmada pela espectroscopia no infravermelho e análise elementar. O filme de silsesquioxano apresentou boa aderência à superfície da sílica além de ser estável termicamente até 130 °C. A modificação da sílica com o filme de silsesquioxano não produziu mudanças nas suas características texturais, indicando que o filme está altamente disperso na sua superfície. O material Db/Sílica foi aplicado no desenvolvimento de um eletrodo de pasta de carbono para determinação do metil paration usando voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial com resposta linear para o metil paration na faixa de concentração entre $1,25 \times 10^{-7}$ e $2,56 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, em pH 6,0. O limite de detecção e a sensibilidade do eletrodo de pasta de carbono contendo Db/Sílica foram estimados em 0,013 μmol L⁻¹ e 6,3 μA μmol L⁻¹. Os resultados indicam que esse sistema é promissor para ser aplicado no desenvolvimento de um sensor eletroquímico para metil paration.

Com o controle e o planejamento da síntese foi possível obter as matrizes carbono cerâmico denominadas SG1, SG2 e SG3 com distribuição estreita de tamanho de poros com máximos em 7, 14 e 21 nm e área específica de 273, 158 e 73 m² g⁻¹ respectivamente. Os dados obtidos por análise termogravimétrica e pelo método espectrofotométrico de Bradford indicam que o tamanho de poros é um fator importante para a imobilização da enzima. A matriz SG3 foi a que apresentou maior quantidade de enzima imobilizada quando comparada às matrizes SG2 e SG1.

A área específica e o volume de poros das matrizes diminuem drasticamente após a prensagem. No entanto, os materiais SG/AP/GA/GOx ainda apresentam apreciável área específica e tamanho de poros, que são características importantes para permitir a difusão de analitos, nesse caso, a glicose.

Os eletrodos carbono cerâmico SG1/AP/GA/GOx, SG2/AP/GA/GOx e SG3/AP/GA/GOx foram testados por voltametria cíclica e o eletrodo SG3/AP/GA/GOx foi aquele que apresentou maior intensidade de corrente referente a enzima GOx, confirmando que a matriz SG3 é aquela que, de fato, possibilita a imobilização de maior quantidade de enzima GOx.

A atividade electrocatalítica do eletrodo SG3/AP/GA/GOx foi avaliada por cronoamperometria em atmosfera de gás argônio e em atmosfera saturada de O₂. A resposta linear foi na faixa de concentração entre 0,39 e 5,36 mmol L⁻¹, em atmosfera de gás argônio. A sensibilidade e o limite de detecção do eletrodo nesta atmosfera foram estimados em 0,33 μA mM⁻¹ cm⁻² e 0,93 mM respectivamente, K_M 1,27 mmol L⁻¹ e i_{máx} 0,59 μA. Além disso, o eletrodo SG3/AP/GA/GOx não apresentou resposta aos interferentes ácido ascórbico, ácido oxálico e dopamina. No entanto, ao ter sua atividade electrocatalítica avaliada em atmosfera saturada de O₂ o eletrodo SG3/AP/GA/GOx apresentou resposta linear na faixa de concentração entre 0,2 e 2,47 mmol L⁻¹. A sensibilidade e o limite de detecção foram estimados em 4,44 μA mM⁻¹ cm⁻² e 0,26 mmol L⁻¹ respectivamente, K_M 0,52 mmol L⁻¹ e i_{máx} 3,12 μA. Embora a atividade catalítica do eletrodo tenha sido otimizada, nessa condição, os interferentes testados mostram resposta de corrente.

Esses resultados apontam que as matrizes carbono cerâmicos constituem-se de um ambiente favorável para a imobilização da enzima GOx e de sua atividade catalítica tornando o sistema promissor para ser utilizado no desenvolvimento de um biossensor electroquímico para glicose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 1247–1250.
- (2) Grundler, P. *Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers*; Springer: Berlin, 2008; Vol. 61, pp. 56–57.
- (3) Alfaya, A. A. S.; Kubota, L. T. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 835–841.
- (4) Rosatto, S.S.; Freire, R.S.; Dúran, N.; Kubota, L. T. *Quim. Nova* **2002**, *24*, 77–86.
- (5) Wang, J. *Electroanalysis* **1991**, *3*, 255–259.
- (6) Souza, M. F. B. . *Quim. Nova* **1997**, *20*, 191–195.
- (7) Walcarius, A. *Electroanalysis* **1998**, *10*, 1217–1235.
- (8) Pereira, A. C.; Santos, A. S.; Kubota, L. T. . *Quim. Nova* **2002**, *25*, 1012–1021.
- (9) Freire, R. S.; Pessoa, C. A. **2003**, *26*, 381–389.
- (10) Walcarius, A. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4098–4140.
- (11) Walcarius, A.; Delacote, C.; Sayen, S. *Electrochim. Acta* **2004**, *49*, 3775–3783.
- (12) Walcarius, A.; Mandler, D.; Cox, J. A.; Collinson, M.; Lev, O. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3663–3689.
- (13) Benvenutti, E. V; Moro, C. C.; Costa, T. M. .; Gallas, M. R. *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1926–1933.
- (14) José, N. M. .; Prado, L. A. S. A. . *Quim. Nova* **2005**, *28*, 281–288.
- (15) Soler-Illia, G. J. A. A.; Azzaroni, O. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1107–1150.
- (16) Luz, R. de C. S.; Damos, F. S.; Tanaka, A. A.; Kubota, L. T.; Gushikem, Y. *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 4706–4714.
- (17) Gushikem, Y.; Lucho, A. M. S.; Marafon, E.; Francisco, M. S. P.; Landers, R. Processo de preparação do material cerâmico eletricamente condutor SiO₂/ZrO₂/C-Grafite. PI 0506395-7, 2006.
- (18) Gushikem, Y.; Benvenutti, E. V.; Ribeiro, E. S. Composto de sílica-titania-grafite (SiO₂/TiO₂/Grafite) como material cerâmico eletricamente condutor e processo sol-gel de obtenção do mesmo. PI 0303303-1, 2003.
- (19) Gushikem, Y.; Benvenutti, E. V.; Kholin, Y. V *Pure Appl. Chem.* **2008**, *80*, 1593–1611.
- (20) Schneid, A. C.; Roesch, E. W.; Sperb, F.; Matte, U.; Silveira, N. P.; Costa, T. M. H.; Menezes, E. W.; Benvenutti, E. V. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 1079–1086.

- (21) Arenas, L. T.; Dias, S. L. P.; Moro, C. C.; Costa, T. M. H.; Benvenuti, E. V.; Lucho, A. M. S.; Gushikem, Y. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *297*, 244–250.
- (22) Menezes, E. W.; Nunes, M. R.; Arenas, L. T.; Dias, S. L. P.; Garcia, I. T. S.; Gushikem, Y.; Costa, T. M. .; Benvenuti, E. V. *J. Solid State Eletrochemistry* **2012**, *16*, 3703–3713.
- (23) Cardoso, W. S.; Francisco, M. S. P.; Lucho, A. M. S.; Gushikem, Y. *Solid State Ionics* **2004**, *167*, 165–173.
- (24) Darder, M.; Colilla, M.; Lara, N.; Ruiz-Hitzky, E. *J. Mater. Chem.* **2002**, *12*, 3660–3664.
- (25) Edwards, F. L.; Tchounwou, P. B. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2005**, *2*, 430–441.
- (26) Keprasertsup, C.; Upatham, E. S.; Sukhapanth, N.; Prempre, P. *Sci. Asia* **2001**, *27*, 261–270.
- (27) Reregistration Eligibility Decision for Methyl Parathion
<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/methyl_parathion_red.pdf>.
- (28) Gao, Q.; Guo, Y.; Zhang, W.; Qi, H.; Zhang, C. *Sensors Actuators B Chem.* **2011**, *153*, 219–225.
- (29) Zhu, Z.; Garcia-Gancedo, L.; Flewitt, A. J.; Xie, H.; Moussy, F.; Milne, W. I. *Sensors* **2012**, *12*, 5996–6022.
- (30) Bankar, S. B.; Bule, M. V.; Singhal, R. S.; Ananthanarayan, L. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 489–501.
- (31) Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 2333–2348.
- (32) Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O. *Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*; Coimbra, 1993.
- (33) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons.: New York, 2001.
- (34) Lowinsohn, D.; Bertotti, M. *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1318–1325.
- (35) Murray, R. W. *Acc. Chem. Rev* **1980**, *13*, 135.
- (36) Murray, R. W. In *Electroanalytical Chemistry: A series of advances*; Bard, A. J., Ed.; New York, 1984; p. 191.
- (37) Newnham, R. E.; Giniewicz, J. R. . In *Comprehensive Composite Materials*; Oxford, 2000; pp. 431 – 463.
- (38) Hu, Y.; Chung, y. J.; Mackenzie, J. D. . *J. Mater. Sci.* **1993**, *28*, 6549–6554.
- (39) Wang, T.; Chen, Y.; Ma, J.; Chen, M.; Nie, C.; Hu, M.; Li, Y.; Jia, Z.; Fang, J.; Gao, H. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1308*, 63–72.

- (40) Nunes, M. R.; Gushikem, Y.; Landers, R.; D, J.; Benvenutti, E. V; Costa, T. M. H. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2012**, *63*, 258–265.
- (41) Mak, C. A.; Ranjbar, S.; Riente, P.; Rodríguez-escrich, C.; Pericás, M. A. *Tetrahedron* **2014**, 1–5.
- (42) Sérgio, P.; Gasparini, B. C.; Magosso, H. A.; Spinelli, A. *J. Hazard. Mater.* **2014**, *273*, 70–77.
- (43) Motorina, A.; Tananaiko, O.; Kozytska, I.; Raks, V.; Badía, R.; Díaz-garcía, M. E.; Zaitsev, V. N. *Sensors Actuators B* **2014**, *200*, 198–205.
- (44) Yamane, S.; Iwasakia, N.; Majimaa, T.; Funakoshia, T. .; Masuko, T.; Harada, K.; Minamia, A.; Monde, K.; Nishimurab, S. . *Biomaterials* **2005**, *26*, 611–619.
- (45) Wang, S.; Kang, Y.; Wang, L.; Zhang, H.; Wang, Y.; Wang, Y. *Sensors Actuators B Chem.* **2013**, *182*, 467–481.
- (46) Sjöberg, S. . *Non-Cryst. Solids* **1996**, *196*, 51–57.
- (47) Vansant, E. F.; Van der Voort, P.; Vrancken, K. C. . *Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface*; Elsevier.; Amsterdam, 1995.
- (48) Tsionsky, M.; Gun, G.; Giezer, V.; Lev, O. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1747–1753.
- (49) Hench, L. L.; West, J. K. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 33–72.
- (50) Ebelmen, J. J. In *Ann. Chem. Phys.*; 1846; p. 129.
- (51) Graham, T. F. R. S. *J. Chem. Soc.* **1864**, 318–327.
- (52) Brinker, C. J.; Scherer, G. W. *Sol–gel science: the physics and chemistry of sol–gel processing*; Academic Press: San Diego, 1990.
- (53) Dimitriev, Y.; Ivanova, Y.; Iordanova, R. *J. Univ. Chem. Technol. Metall.* **2008**, *43*, 181–192.
- (54) Zerda, T. W.; Hoang, G. *J. Non. Cryst. Solids* **1989**, *109*, 9–17.
- (55) Schubert, U.; Hüsing, N. *Synthesis of Inorganic Materials*; 1st ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Alemanha, 2001; p. cap. 4.
- (56) Gregg, S. J.; Sing, K. S. W. *Adsorption, Surface Area and Porosity*; 2nd ed.; Academic Press: London, 1982.
- (57) Ojani, R.; Ahmadi, E.; Raoof, J.-B.; Mohamadnia, F. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, *626*, 23–29.
- (58) Sayen, S.; Walcarius, A. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *581*, 70–78.
- (59) Dash, S.; Mishra, S.; Patel, S.; Mishra, B. K. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2008**, *140*, 77–94.

- (60) Kickelbick, G. *Hybrid Materials: Synthesis, Characterization and Applications*; 1st ed.; Wiley-VCH, 2007; p. 498.
- (61) Sanchez, C.; Ribot, F. *Hybrid Materials*; 1994; Vol. 18, p. 1007.
- (62) Sánchez, A.; Morante-Zarcelero, S.; Pérez-Quintanilla, D.; Hierro, I. Del; Sierra, I. J. *Electroanal. Chem.* **2013**, *689*, 76–82.
- (63) Baney, R. H.; Itoh, M.; Sakakibara, A.; Suzuki, T. *Chem Rev* **1995**, *95*, 1409–1430.
- (64) Schubert, U.; Hüsing, N.; Lorenz, A. *Chem. Mater* **2010**, *7*, 2010–2027.
- (65) Markevicius, G.; Chaudhuri, S.; Bajracharya, C.; Rastogi, R.; Xiao, J.; Burnett, C.; Chastek, T. Q. *Prog. Org. Coatings* **2012**, *75*, 319–327.
- (66) Jerman, I.; Orel, B.; Šurca Vuk, A.; Koželj, M.; Kovač, J. *Thin Solid Films* **2010**, *518*, 2710–2721.
- (67) Soh, M. S.; Sellinger, A.; Yap, A. U. J. . *Curr. Nanosci* **2006**, *2*, 373–381.
- (68) Gay, D. S. F.; Fernandes, T. H. M.; Amavisca, C. V.; Cardoso, N. F.; Benvenutti, E. V.; Costa, T. M. H.; Lima, E. C. *Desalination* **2010**, *258*, 128–135.
- (69) Lucho, A. M. S.; Oliveira, É. C.; Pastore, H. O.; Gushikem, Y. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *573*, 55–60.
- (70) Jesus, C. G. De; Lima, D.; Santos, V.; Wohnrath, K.; Pessôa, C. A. *Sensors Actuators B* **2013**, *186*, 44–51.
- (71) Lucho, A. M. S.; Pissetti, F. L.; Gushikem, Y. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *275*, 251–256.
- (72) Shen, X.; Cui, Y.; Pang, Y.; Qian, H. *Electrochim. Acta* **2012**, *59*, 91–99.
- (73) Silva, P. S.; Gasparini, B. C.; Magosso, H. a; Spinelli, A. *J. Hazard. Mater.* **2014**, *273*, 70–77.
- (74) Arenas, L. T.; Aguirre, T. A. S.; Langaro, A.; Gushikem, Y.; Benvenutti, E. V.; Costa, T. M. H. *Polymer (Guildf)*. **2003**, *44*, 5521–5525.
- (75) Arenas, L. T. .; Langaro, A.; Gushikem, Y. .; Moro, C. C.; Benvenutti, E. V.; Costa, T. M. H. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2003**, *28*, 51–56.
- (76) Fujiwara, S. T.; Gushikem, Y.; Alfaya, R. V. S. *Colloids Surf. A.* **2001**, *178*, 135–141.
- (77) Alfaya, R. V. S.; Gushikem, Y.; Alfaya, A. A. S. *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 281–285.
- (78) Alfaya, R. V. S.; Gushikem, Y. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *213*, 438–444.
- (79) Arenas, L. T.; Simon, N. M.; Gushikem, Y.; Costa, T. M. H.; Lima, E. C.; Benvenutti, E. *V Eclética Química* **2006**, *31*, 53–58.

- (80) Magosso, H. A.; Luz, R. € . € .; Gushikem, Y. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 216–222.
- (81) Simon, Í. A.; Vacaro, B. B.; Nunes, M. R.; Benvenuti, E. V.; Dias, S. L. P.; Gushikem, Y.; Arguello, J. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 2501–2506.
- (82) Silva, P. S.; Gasparini, B. C.; Magosso, H. A.; Spinelli, A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 695–699.
- (83) Holland, P. T. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1167–1193.
- (84) Frenich, A. .; M, V. J. L.; Sicilia, A. D. C.; Rodriguez, M. J. G.; Bolanos, P. P. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *558*, 42–52.
- (85) Galli, A.; Souza, D. De; Garbellini, G. S.; Coutinho, C. F. B.; Mazo, L. H.; Avaca, L. A.; Machado, S. A. S. *Quim. Nova* **2006**, *29*, 105–112.
- (86) Liu, G.; Lin, Y. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5894–5901.
- (87) Shimazu, M.; Mulchandani, A.; Chen, W. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *76*, 318–324.
- (88) Índice monográfico parationa metflica.
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d68e2100474596eb9f0cdf3fbc4c6735/p03.pdf?>
- (89) Barr, D. B.; Turner, W. E.; Dipietro, E.; McClure, P. C.; Baker, S. E.; Barr, J. R.; Gehle, K.; Jr, R. E. G.; Bravo, R.; Driskell, W. J.; Jr, D. G. P.; Jr, R. H. H.; Needham, L. L.; Pirkle, J. L.; Sampson, E. J. *Environ. Health Perspect.* **2002**, *110*, 1085–1091.
- (90) Módolo, M. L.; Valandro, S. R.; Pessoa, C. A.; Fujiwara, S. T. *Electrochim. Acta* **2013**, *112*, 783–790.
- (91) Rahim, A.; Barros, S. B. A.; Arenas, L. T.; Gushikem, Y. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 1256–1261.
- (92) Tsionsky, M.; Gun, G.; Giezer, V.; Lev, O. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1747–1753.
- (93) Tsionsky, M.; Lev, O. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2409–2414.
- (94) De Lathouder, K. M.; Lozano-Castelló, D.; Linares-Solano, A.; Wallin, S. A.; Kapteijn, F.; Moulijn, J. A. *Microporous Mesoporous Mater.* **2007**, *99*, 216–223.
- (95) Nogala, W.; Celebanska, A.; Szot, K.; Wittstock, G.; Opallo, M. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 5719–5724.
- (96) Tian, F.; Zhu, G. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *451*, 251–258.
- (97) Zhu, L.; Li, Y.; Tian, F.; Xu, B.; Zhu, G. *Sensors Actuators B* **2002**, *84*, 265–270.
- (98) Abbaspour, A.; Shamsipur, M.; Sirouinejad, A.; Kia, R.; Raithby, P. R. *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 2916–2923.

- (99) Salimi, A.; Roushani, M.; Haghighi, B.; Soltanian, S. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 220–226.
- (100) Razmi, H.; Heidari, H. *Anal. Biochem.* **2009**, *388*, 15–22.
- (101) Barros, S. B. a.; Rahim, A.; Tanaka, A. a.; Arenas, L. T.; Landers, R.; Gushikem, Y. *Electrochim. Acta* **2013**, *87*, 140–147.
- (102) Rahim, A.; Santos, L. S. S.; Barros, S. B. A.; Kubota, L. T.; Gushikem, Y. *Sensors Actuators B* **2013**, *177*, 231–238.
- (103) Majidi, M. R.; Asadpour-Zeynali, K.; Hosseini, S. -a. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 364–369.
- (104) Arguello, J.; Magosso, H. a.; Landers, R.; Pimentel, V. L.; Gushikem, Y. *Electrochim. Acta* **2010**, *56*, 340–345.
- (105) Salimi, A.; Mamkhezri, H.; Hallaj, R. *Talanta* **2006**, *70*, 823–832.
- (106) George, J. .; Menonu, C. S. *Surf. Coatings Technol.* **2000**, *132*, 45–48.
- (107) UPDIKE, S. J.; HICKS, G. P. *Nature* **1967**, *214*, 986–988.
- (108) Sassolas, A.; Blum, L. J.; Leca-Bouvier, B. D. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 489–511.
- (109) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*; 5th ed.; Artmed, 2011; p. 1304.
- (110) Cardoso, C. L.; De Moraes, M. C.; Cass, Q. B. *Quim. Nova* **2009**, *32*, 175–187.
- (111) Treccani, L.; Yvonne Klein, T.; Meder, F.; Pardun, K.; Rezwani, K. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 7115–50.
- (112) Worsfold, P. J. *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 597–600.
- (113) Luca, G. C.; Reis, B. F. *Quim. Nova* **2001**, *24*, 191.
- (114) Brena, B. M.; Batista-Viera, F. In *Immobilization of Enzymes*; Guisan, J. M., Ed.; Human Press: Totowa, New Jersey, 2006; pp. 15–31.
- (115) Sheldon, R. A. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289–1307.
- (116) Freire, R. S.; Pessoa, C. A.; Mello, L. D.; Kubota, L. T. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 230–243.
- (117) Higson, S. P. J. *Química Analítica*; McGraw Hill: São Paulo, 2009; p. 442.
- (118) Wang, J. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 814 – 825.
- (119) Sotomayor, M. D. P. T.; Kubota, L. T. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 123–128.

- (120) Song, Y.; Liu, H.; Wang, Y.; Wang, L. *Electrochim. Acta* **2013**, *93*, 17–24.
- (121) Cui, M.; Xu, B.; Hu, C.; Shao, H. B.; Qu, L. *Electrochim. Acta* **2013**, *98*, 48–53.
- (122) Wu, W.; Huang, J.; Tsai, Y. *Mater. Sci. Eng. C* **2012**, *32*, 983–987.
- (123) Wilson, R.; Turner, A. P. F. *Biosens. Bioelectron.* **1992**, *7*, 165–185.
- (124) EC-PDB http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/GetPage.pl?ec_number=1.1.3.4 (accessed Aug 16, 2014).
- (125) Cui, H.-F.; Zhang, K.; Zhang, Y.-F.; Sun, Y.-L.; Wang, J.; Zhang, W.-D.; Luong, J. H. T. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *46*, 113–118.
- (126) Qiu, C.; Wang, X.; Liu, X.; Hou, S.; Ma, H. *Electrochim. Acta* **2012**, *67*, 140–146.
- (127) Wang, Y.; Liu, L.; Li, M.; Xu, S.; Gao, F. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *30*, 107–111.
- (128) Li, Y.; Wang, F.; Huang, F.; Li, Y.; Feng, S. *J. Electroanal. Chem.* **2012**, *685*, 86–90.
- (129) Dung, N. Q.; Patil, D.; Duong, T.; Jung, H.; Kim, D.; Yoon, S.-G. *Sensors Actuators B Chem.* **2012**, *166-167*, 103–109.
- (130) Zhang, H.; Meng, Z.; Wang, Q.; Zheng, J. *Sensors Actuators B Chem.* **2011**, *158*, 23–27.
- (131) Unnikrishnan, B.; Palanisamy, S.; Chen, S. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *39*, 70–75.
- (132) Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *254*, 248–254.
- (133) Zaia, D. A. M.; Zaia, C. T. B. V.; Lichtig, J. *Quim. Nova* **1998**, *21*, 787–793.
- (134) Ying, J.; Benziger, J.; Navrotsky, A. *J Am Ceram Soc* **1993**, *76*, 2571–2582.
- (135) Pavan, F.; Franken, L.; Moreira, C.; Costa, T.; Benvenuti, E.; Yoshitaka, G. *J Colloid Interface Sci* **2001**, *241*, 413–416.
- (136) Sanghavi, B. J.; Hirsch, G.; Karna, S. P.; Srivastava, A. K. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *735*, 37–45.
- (137) Zeng, Y.; Yu, D.; Yu, Y.; Zhou, T.; Shi, G. *J Hazard Mater* **2012**, *218*, 315–322.
- (138) Yang, S.; Luo, S.; Liu, C.; Wei, W. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2012**, *96*, 75–79.
- (139) Arenas, L. T.; Villis, P. C. M.; Arguello, J.; Landers, R.; Benvenuti, E. V.; Gushikem, Y. *Talanta* **2010**, *83*, 241–248.
- (140) Kumaravel, A.; Chandrasekaran, M. *J Electroanal Chem* **2010**, *638*, 231–235.
- (141) Tcheumi, H.; Tonle, I.; Ngameni, E.; Walcarius, A. *Talanta* **2010**, *81*, 972–979.

- (142) Liu, G.; Lin, Y. *Electrochem. commun.* **2005**, *7*, 339–343.
- (143) Yazhen, W.; Hongwin, Q.; Siqian, H.; Junhui, X. *Sensors Actuators B* **2010**, *147*, 587–592.
- (144) Zhao, L.; Zhao, F.; Zeng, B. *Sensors Actuators B Chem.* **2013**, *176*, 818–824.
- (145) Dong, J.; Wang, X.; Qiao, F.; Liu, P.; Ai, S. *Sensors Actuators B Chem.* **2013**, *186*, 774–780.
- (146) Li, C.; Wang, Z.; Zhan, G. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2011**, *82*, 40–45.
- (147) Xue, R.; Kang, T.; Lu, L.; Cheng, S. *Appl. Surf. Sci.* **2012**, *258*, 6040–6045.
- (148) Dahlin, A.; Dielacher, B.; Rajendran, P.; Sugihara, K.; Sannomiya, T.; Zenobi-Wong, M.; Voros, J. *Anal Bioanal Chem* **2012**, *402*, 1773–1784.
- (149) Vidotti, C.; Carvalhal, R.; Mendes, R.; Ferreira, D.; Kubota, L. *J Braz Chem* **2011**, *22*, 3–20.
- (150) Stamov, D. R.; Nguyen, T. A. K.; Evans, H. M.; Pfohl, T.; Werner, C.; Pompe, T. *Biomaterials* **2011**, *32*, 7444–7453.
- (151) Klein, M. P.; Nunes, M. R.; Rodrigues, R. C.; Benvenutti, E. V; Costa, T. M. H.; Hertz, P. F.; Ninow, J. L. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2456–2464.
- (152) George, R.; Sugunan, S. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *106*, 81–89.
- (153) Pavan, F. A.; Gobbi, S. A.; Moro, C. C.; Costa, T. M. H.; Benvenutti, E. V *J. Porous Mater.* **2003**, *9*, 307–311.
- (154) Pavan, F. A.; Gushikem, Y.; Moro, C. C.; Costa, T. M. H.; Benvenutti, E. V. *Colloid Polym Sci* **2003**, *281*, 173–177.
- (155) Pure, U. O. F. **1982**, *54*.
- (156) Zhao, S.; Zhang, K.; Bai, Y.; Yang, W.; Sun, C. **2006**, *69*, 158–163.
- (157) Xu, X.; Chen, J.; Li, W.; Nie, Z.; Yao, S. *Electrochem. commun.* **2008**, *10*, 1459–1462.
- (158) Shangguan, X.; Zhang, H.; Zheng, J. *Electrochem. commun.* **2008**, *10*, 1140–1143.
- (159) Zhou, Y.; Yang, H.; Chen, H. *Talanta* **2008**, *76*, 419–423.
- (160) Cai, C.; Chen, J. *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 75–83.
- (161) Liu, Q.; Lu, X.; Li, J.; Yao, X.; Li, J. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 3203–3209.
- (162) Li, M.; Xu, S.; Tang, M.; Liu, L.; Gao, F.; Wang, Y. **2011**, *56*, 1144–1149.
- (163) Hu, F.; Chen, S.; Wang, C.; Yuan, R.; Chai, Y.; Xiang, Y.; Wang, C. **2011**, *72*, 298–304.

- (164) E. Laviron *J. Electroanal. Chem* **1979**, *101*, 19–28.
- (165) Şenel, M.; Nergiz, C. *Curr. Appl. Phys.* **2012**, *12*, 1118–1124.
- (166) Martinello, F.; Edson Luiz da Silva *J. Bras. Med. e Patol. Lab.* **2003**, *39*, 323 – 334.
- (167) Teófilo, R. F.; Ceragioli, H. J.; Peterlevitz, A. C.; Baranauskas, V.; Ferreira, M. M. C.; Kubota, L. T. 9–11.
- (168) Rahim, A.; Barros, S. B. a.; Kubota, L. T.; Gushikem, Y. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 10116–10121.