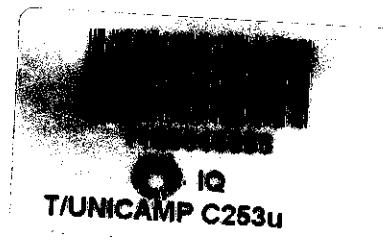


**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**



**UTILIZAÇÃO DE FIBRAS DE CARBONO COMO MATERIAL ELETRÓDICO
NA CONSTRUÇÃO DE SENSORES E BIOSSENSORES**

Tese de Doutorado apresentada à Comissão de Pós-Graduação do Instituto de Química como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aluna: Rosangela M. de Carvalho
Orientador: Prof. Dr. Lauro T. Kubota
Co-Orientador: Prof. Dr. Jarbas J. Rohwedder

Campinas, fevereiro 2001



Origem da sabedoria

*O homem põe a mão no sílex,
derruba as montanhas pela base;
fura galerias nos rochedos
o olho pode ver neles todos os tesouros.
Explora as nascentes dos rios,
expõe a descoberto o que está escondido*

*Mas a sabedoria, de onde sai ela?
Onde o jazigo da inteligência?
O homem ignora o caminho dela,
Ninguém a encontra na terra dos vivos.
O abismo diz: "Ela não está em mim".
"Não está comigo", diz o mar.
Não pode ser adquirida como ouro maciço,
não pode ser comprada a peso de prata.
Não pode ser exposta em balança como ouro de Ofir
como o ônix precioso ou a safira.
Não pode ser comparada nem ao ouro nem ao vidro
ninguém a troca por vaso de ouro fino
Quanto ao coral e ao cristal, nem se fala,
a sabedoria fale mais do que as pérolas.
Não pode ser igualada ao topázio da Etiópia
Não pode ser equiparada ao mais puro ouro.*

*De onde vem, pois a sabedoria?
Onde está o jazigo da Inteligência?*

(Jó – 28:1 –20)

*Ao Roberto, pelo carinho, amor e
compreensão...*

*Aos meus Pais e Irmãos que em todos os
momentos estiveram ao meu
lado...*

...dedico.

Agradecimentos

- *Ao Prof. Dr. Lauro, pela amizade e paciência na orientação deste trabalho;*
- *Aos Profs. Dr. Cesar e Dr. Ronei, pelas discussões e auxílio no tratamento dos dados utilizando métodos quimiomiméticos;*
- *Ao meu querido irmão Eldio pela revisão gramatical;*
- *Ao amigo Renato, pelas discussões, sugestões e sua dedicação na leitura da tese e apoio nos momentos difíceis;*
- *Ao pessoal do laboratório;*
- *Aos amigos: Éric, Érica, Alexandre, Neide, Solange, Ricardo, Joyce, Martha, Anita. e Jane.;*
- *À Diretoria e funcionários do Instituto de Química da Unicamp, que permitiram que esta tese fosse realizada aqui;*
- *Ao CNPq pelas bolsas de iniciação científica, mestrado e doutorado;*

APRESENTAÇÃO

A motivação para o desenvolvimento deste trabalho deu-se pela necessidade de conhecer, estudar e explorar as potencialidades das fibras de carbono, para aplicações em eletroanalítica, com intuito de desenvolver novos sensores e biossensores. Algumas peculiaridades e potencialidades deste material serão abordadas nesta tese, a qual foi dividida em 5 capítulos para melhor compreensão.

No primeiro capítulo, será apresentada uma breve introdução das fibras de carbono, bem como algumas aplicações como material eletródico descritas na literatura.

No segundo capítulo, serão descritos alguns problemas encontrados no uso das fibras de carbono em eletroanalítica, como: a falta de reprodutibilidade, a pobre resposta eletroquímica, bem como algumas soluções propostas na literatura para contornar estes problemas. Além disso uma nova metodologia será proposta, resultando em uma grande melhora na resposta eletroquímica das fibras.

No terceiro capítulo, será mostrada a utilização das fibras de carbono no desenvolvimento de um sensor para determinação de isômeros fenólicos. No quarto capítulo, o desenvolvimento de um biossensor para salicilato. Reservando-se o último capítulo à conclusões gerais obtidas neste trabalho, bem como para a apresentação de perspectivas de novos trabalhos.

RESUMO

Título: "Utilização de fibras de carbono como material eletródico para construção de sensores e biossensores".

Autora: Rosangela Margarete de Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Palavras – chave: *fibras de carbono, biossensores, sensores e material eletródico*

Esta tese descreve o uso de fibras de carbono como material eletródico para construção de sensores e biossensores. Com intuito de melhorar a performance na reposta eletroquímica das fibras de carbono, propôs-se aqui um método simples e rápido para sua ativação, enxertando o óxido de titânio (IV) sobre a superfície das fibras de carbono, reagindo se o tetracloreto de titânio com os grupos superficiais destas fibras. A camada de óxido de titânio dispersa sobre a superfície das fibras de carbono foi estável e proporcionou uma grande melhora na resposta eletroquímica. A resposta eletroquímica para o hexacianoferrato foi similar à observada para sistemas reversíveis. Essas fibras tratadas foram usadas na determinação simultânea de isômeros fenólicos, utilizando calibração multivariada para modelar os picos altamente superpostos obtidos por voltametria de pulso diferencial. A melhor condição para resposta eletroquímica foi obtida com $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão TRIS, pH 6,0. Inicialmente os voltamogramas foram processados usando um filtro de transformada de Fourier e PCA para redução do ruído e compressão dos dados, respectivamente. Os resultados obtidos por rede neural foram melhores em relação à hidroquinona quando comparado para PLS1 e PLS2. Entretanto, erros similares foram obtidos para catecol quando os modelos de PLS ou rede neural foram empregados. Usando rede neural, com apodização, foi possível determinar catecol e hidroquinona em uma faixa de concentração de $1,0 \cdot 10^{-4}$ a $6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com erros padrões de previsão (%RMSEP) de 7,42 e 8,02, respectivamente. Biossensores para salicilato também foram construídos por imobilização de *salicilato hidroxilase* (SH) em diferentes tipos de fibras. As características do microbiossensor preparado com diferentes fibras de carbono foram investigadas. Da fibra de carbono, a Toray-T800, resultou o melhor biossensor amperométrico para detecção de salicilato com um limite de resposta linear entre $0,10 - 1,93 \mu\text{mol L}^{-1}$, e $1,96 - 12,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de $5,57 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e um tempo de resposta de 3,5 segundos. A alta sensibilidade foi atribuída ao processo de amplificação química na superfície do eletrodo. A determinação de salicilato pode ser feita aplicando um potencial maior que 150 mV vs SCE, com boa precisão. O tempo de vida do biossensor teve ao mínimo de 100 determinações contínuas sem mudança significativa na reposta do biossensor. Foram analisadas amostras clínicas e de fármacos; os resultados obtidos foram estatisticamente iguais ao nível de confiança de 95%, quando comparados com o método de Trinder.

ABSTRACT

Title: Carbon fibres utilisation as eletrodic material for sensors and biosensors construction

Author: Rosangela Margarete de Carvalho

Adviser: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Keywords: carbon fibres, sensors, biosensors and electrodic material

This thesis describes the use of carbon fibres as electrodic material for the construction of sensors and biosensors. Although carbon fibres have several advantages as electrodic material, their pre-treatment is necessary in order to enhance reproducibility and electrochemical activity. A simple and fast method for its activation is proposed to improve the electrochemical activity of the carbon fibre electrodes. The carbon fibre surface was coated with a layer of titanium (IV) oxide. The fibre was treated for 1h at room temperature with TiCl_4 , followed by hydrolyzation of the remaining chloride and, finally dried. The titanium oxide layer dispersed onto the carbon fibre surface was very stable and a sharp improvement in the electrochemical response was observed. The electrochemical response for hexacyanoferrate was similar to that observed for reversible systems. The treated fibres were used to construct sensors for simultaneous determination of phenol isomers, using multivariate calibration to model the overlapped peaks obtained by differential pulse voltammetry. The best condition for electrochemical response was obtained with 0.05 mol L^{-1} Tris – HCL buffer, at pH 6.0. Initially the voltammograms were processed using a Fourier transform filter and PCA for noise reduction and data compression, respectively. For hydroquinone, the result obtained with neural network was slightly better than with the PLS1 and PLS2. However, similar errors were obtained for catechol when using either PLS or the neural network models. Using the neural network with pruning, it was possible to determine catechol and hydroquinone in the concentration range of $1.0 \cdot 10^{-4}$ to $6.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, with standard errors of predictions (%PMSEP) of 7.42 and 8.02, for catechol and hydroquinone, respectively. Biosensors for salicylate were constructed by salicylate hydroxylase (SH) immobilisation on different carbon fibres. The characteristics of the microbiosensors prepared with different carbon fibres were investigated. The carbon fibre (Toray-T800) resulted in the best amperometric biosensor for salicylate detection. It showed linear response range between $0.10 - 1.93 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $1.96 - 12.0 \mu\text{mol L}^{-1}$, a detection limit of $5.57 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ and a response time of 3.5 s. The high sensitivity was attributed to the chemical amplification process on the electrode surface. The determination of salicylate can be carried out applying potentials higher than 150 mV, with good precision. The useful lifetime of the biosensor was at least 100 continuous determinations without significant change. The results with clinical and pharmacological samples were statistically equal in 95% of confidence level, when compared with Trinder method.

DADOS CURRICULARES

1. Dados Pessoais

Nome: Rosângela Margarete de Carvalho

Data de Nascimento: 03/06/72

Filiação: Hermirio João de Carvalho

Estado Civil: Solteira

Maria de Carvalho

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Mamborê – PR

2. Formação

2.1. Primeiro Grau – EEPG “Rui Barbosa”, concluído em 1986, Mamborê - PR.

2.2. Segundo Grau – EEPG “Paulino Messias”, concluído em 1989, Mamborê - PR.

2.3. Terceiro Grau :Bacharel em Química – concluído em 1994, na Universidade Estadual de Maringá- Departamento de Química, Maringá – PR.

Licenciatura em Química – concluído em 1994, na Universidade Estadual de Maringá- Departamento de Química, Maringá – PR.

2.4. Pós- Graduação: Curso de a Nível de Mestrado, Área de Concentração : Química Analítica,

Início : 03/ 1995 - Conclusão 18/02/1997 .

Local: Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis – SC.

Título: Determinação Potenciométrica de Cloreto em Argamassas de Paredes Empregando Sistema de Injeção em Fluxo.

Orientador: Prof. Dr. Roldão Roosevelt Urzedo de Queiróz.

Órgão financiador: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

3. PRÊMIOS

“Prêmio Governador do Estado” - XXVI Concurso - Invento Brasileiro, com o invento “Biossensor de Alta Sensibilidade para Salicilato Empregando Fibras de Carbono: Amplificação Química de Sinal”, Resolução SCTDE de 19-10-00, publicada no D.O.E. de 21-10-00.

“Prêmio Conselho Federal de Química de Estímulo e Incentivo a Eletroquímica”, oferecido pelo Conselho Federal de Química. Obtido com o trabalho intitulado: “Determinação simultânea de isômeros de fenóis em mistura binária por DVP com eletrodos de fibra de carbono e calibração multivariada”, no XI Simpósio de Eletroquímica e Eletroanalítica - SIBEE, 1999, Maragogi.

4. TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

1. de Carvalho, R. M.; de Oliveira Neto, G. e Kubota, L. T.; “Influence of different carbon fibre on salicylate microbiosensor performance”, *Electroanalysis*, 2001, 13, 131.
2. de Carvalho, R. M.; Mello, C. e Kubota, L. T.; “Simultaneous determination of phenol isomers in binary mixtures by DPV using carbon fiber electrode and neural network with pruning as a multivariate calibration tool”, *Anal. Chim. Acta* 2000, 420, 109.

3. de Carvalho, R. M.; de Oliveira Neto, G. e Kubota, L. T.; "Microbiosensor for salicylate based on modified carbon fiber", *Anal. Lett.* **2000**, 33, 425.
4. de Carvalho, R. M.; Kubota, L. T. e Rohwedder, J. J.; "Fibras de Carbono: Aplicações em eletroanalítica como material eletródico", *Quím. Nova* **1999**, 22, 591.
5. de Carvalho, R. M.; Kubota, L. T.; Rohwedder, J. J.; Gsöregi, E. e Gorton, L.; "Effect on electrochemistry of hexacyanoferrate at carbon fibres after pretreatment with titanium chloride", *J. Electroanal. Chem.*, **1998**, 457, 83.

4.2. Patente

1. de Carvalho, R. M., de Oliveira Neto, G. e Kubota, L. T.; " Biossensor de alta sensibilidade para salicilato empregando fibras de carbono: Amplificação química de sinal". PI: 0000762-5, 2000.

5. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS.

1. de Carvalho, R. M.; de Oliveira Neto, G. e Kubota, L. T.; "Determinação de salicilato em amostras de interesse clínico através de biossensor a base de fibras de carbono", 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG., livro de resumo SBQ, QA - 158, 2000.
2. de Carvalho, R. M.; de Oliveira Neto, G. e Kubota, L. T.; "Comportamento, de diferentes fibras de carbono na construção de biossensores para salicilato", 10º ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica, Santa Maria - RS, 1999.
3. Kubota, L. T., de Carvalho, R. M. e de Oliveira Neto, G. " Carbon fibre modified with salicylate hydroxylase: A biosensor for salicylate", 50º, Pavia, Itália, 1999.
6. de Carvalho, R. M.; Kubota, L. T., Mello, C.; Poppi, R. J. "Determinação simultânea de isômeros de fenóis em mistura binária por DVP com eletrodos de fibra de carbono e calibração multivariada", XI – SIBEE – Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Maragogi – Al, 1999.
7. de Carvalho, R. M.; Kubota, L. T.; Rohwedder, J.J. R.; Gorton, L. e Csöregi, E.; "Propriedades Eletroquímicas de Fibras de Carbono modificadas com óxido de titânio (IV)", 21ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG., livro de resumo SBQ – EQ 38, 1998.
8. de Carvalho, R. M.; de Queiróz, R. R. U.; "Determinação automatizada de cloreto em argamassas de paredes", 19ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas- MG , livro de resumo SBQ – QA 119, 1996.
9. Higarashi, M. M.; de Carvalho, R. M. e da Costa, W. F.; "Utilização de reator enzimático de glicose- oxidase em sistema de análise por injeção em fluxo com cela tipo "Wall-jet" para determinação de glicose em sangue", 18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Caxambú- MG , livro de resumo SBQ–QA 34, 1995.
10. Higarashi, M. M.; de Carvalho, R. M. e da Costa, W. F.; "Desenvolvimento de métodos para determinação de glicose em sistema de análise por injeção em fluxo com cela tipo "Wall-jet", 17ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Caxambú- MG , Caxambu, 1994.
11. de Carvalho, R. M.; Higarashi, M. M. e da Costa, W. F.; "Desenvolvimento de método para determinação de glicose por "FIA", fazendo uso de glicose-oxidase imobilizada em coluna de sílica", 3º Encontro de Estadual de Iniciação Científica UEPG/UEL/UEM, Ponta Grossa – PR, 1994.

ÍNDICE

	pg.
ÍNDICE DE FIGURAS	xxiii
ÍNDICE DE TABELAS	xxvi
GLOSSÁRIO	xxvii
CAPÍTULO I	lxxix
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Produção das Fibras De Carbono	1
I.2. Estrutura e Composição	3
I.3. Características e Propriedades	5
I.4. Fibras de Carbono como Material Eletródico	8
I.5. Construção de Eletrodos com Fibras de Carbono	9
I.6. Aplicação dos Eletrodos de Fibras de Carbono	11
I.6.1. Determinação de espécies de interesse clínico, biológico e farmacêutico.	13
I.6.2. Determinação de espécies inorgânicas e moléculas de interesse ambiental	17
I.7. Referências	20
 CAPÍTULO II	 31
II. PRÉ – TRATAMENTO DAS FIBRAS DE CARBONO	33
II. 1. INTRODUÇÃO	33
II.1.1. Pré-tratamento eletroquímico e químico	34
II. 2. EXPERIMENTAL	37
II. 2.1. Reagentes e Materiais	37
II. 2.2. Medidas Eletroquímicas	37
II. 2.3. Micrografias de varredura eletrônica	37
II. 2.4. Tratamento das fibras de carbono	37
II. 2.5. Construção dos eletrodos	38
II. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
II. 3.1. Características da superfície	39
II. 3.2. Características eletroquímicas das fibras de carbono tratadas.	40
II. 3.3. Efeito da concentração do $TiCl_4$ usado no tratamento das fibras	42

II. 3.4.	<i>Efeito do pH da solução</i>	43
II. 3.5.	<i>Efeito da concentração da espécie eletroativa (hexacianoferrato)</i>	43
II. 3.6.	<i>Características e estabilidade das fibras pré-tratadas</i>	44
II. 4.	CONCLUSÕES	46
II. 5.	REFERÊNCIAS	47
 CAPÍTULO III		51
III.	UTILIZAÇÃO DE FIBRAS DE CARBONO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS	53
III. 1.	INTRODUÇÃO	53
III. 1.1.	<i>Aspectos Teóricos</i>	55
III. 1.1.1	<i>Rede neural com apodização</i>	58
III. 2.	EXPERIMENTAL	61
III. 2.1.	<i>Reagentes e Materiais</i>	61
III. 2.2.	<i>Preparação dos eletrodos</i>	61
III. 2.3.	<i>Medidas eletroquímicas</i>	61
III. 2.4.	<i>Otimização da concentração do eletrólito de suporte e pH</i>	61
III. 2.5.	<i>Conjunto de dados</i>	62
III. 2.6.	<i>Seleção das Amostras</i>	63
III. 2.7.	<i>Processamento dos dados</i>	64
III. 2.8.	<i>Avaliação da performance do modelo</i>	65
III. 2.9.	<i>Programas</i>	65
III. 2.10	<i>Método dos mínimos quadrados parciais (PLS)</i>	65
III. 3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
III. 3.1.	<i>Otimização das condições operacionais</i>	66
III. 3.2.	<i>Otimização da concentração do eletrólito suporte e pH</i>	66
III. 3.3.	<i>Construção e validação dos modelos</i>	69
III. 3.3.1.	<i>Método dos mínimos quadrados parciais (PLS1)</i>	69
III. 3.3.2.	<i>Método dos mínimos quadrados parciais (PLS2)</i>	70
III. 3.3.3.	<i>Rede Neural com apodização</i>	72
III. 3.4.	<i>Seleção do melhor procedimento.</i>	74

III. 4. CONCLUSÕES	76
III. 5. REFERÊNCIAS	77
CAPÍTULO IV	83
IV. CONSTRUÇÃO DE BIOSENSOR PARA SALICILATO	85
IV. 1. INTRODUÇÃO	85
IV. 1.1. Métodos para determinação de salicilato	86
IV. 2. EXPERIMENTAL	88
IV. 2.1. Reagentes e Materiais	88
IV. 2.2. Medidas eletroquímicas	88
IV. 2.3. Preparação do Biossensor	88
IV. 2.4. Efeito do tipo de tampão e concentração	89
IV. 2.5. Influência do pH da Solução	90
IV. 2.6. Influência da concentração de NADH	90
IV. 2.7. Influência do potencial aplicado na resposta do biossensor	90
IV. 2.8. Estabilidade e curva analítica	90
IV. 2.9. Aplicação em Amostras Reais	90
IV. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
IV. 3.1. Amplificação de sinal	93
IV. 3.2. Efeito do tipo de tampão e concentração	95
IV. 3.3. Influência do pH da solução	96
IV. 3.4. Influência da concentração de NADH	97
IV. 3.5. Influência do potencial aplicado na resposta do biossensor	97
IV. 3.6. Estabilidade	98
IV. 3.7. Limite de resposta linear e limite de detecção	99
IV. 3.8. Sensibilidade	99
IV. 3.9. Tempo de resposta	99
IV. 3.10. Escolha do biossensor que apresentou melhor performance	100
IV. 3.11. Características do biossensor que apresentou melhor performance	101
IV. 3.12. Estudo cinético da enzima imobilizada	102
IV. 3.13. Aplicação em Amostras Reais	103
IV. 4. CONCLUSÕES	105

IV. 5. REFERÊNCIAS	107
V. CAPÍTULO V	113
V. CONCLUSÕES GERAIS	115
V.1. <i>Perspectivas Futuras</i>	117

ÍNDICE DE FIGURAS

	pg.
Capítulo I – INTRODUÇÃO	
<i>Figura I.1- Modelo de estrutura de fibras de carbono proposto por Johnson.</i>	5
<i>Figura I.2- Modelo da estrutura de fibras de carbono proposto por Ruland.</i>	5
<i>Figura I.3- Modelos de estruturas transversais de fibras de materiais tipo PAN e piche.</i>	6
<i>Figura I.4- Representação dos grupos funcionais presentes na superfície das fibras de carbono.</i>	8
<i>Figura I.5- Organograma que reúne as principais propriedades e características e usos das fibras de carbono.</i>	8
<i>Figura I.6- Representação esquemática da preparação de um ultramicroeletrodo cilíndrico.</i>	11
<i>Figura I.7- Representação esquemática de um ultramicroeletrodo de disco.</i>	11
<i>Figura I.8- Representação de um ultramicroeletrodo de fibra de carbono do tipo duplo.</i>	12
<i>Figura I.9- Publicações referentes ao emprego das fibras de carbono, como sensores e biossensores em 25 anos.</i>	13
 Capítulo II - PRÉ - TRATAMENTO DAS FIBRAS DE CARBONO	
<i>Figura II.1- Esquemas propostos para explicar o efeito da oxidação na resposta eletroquímica.</i>	35
<i>Figura II.2- Mecanismo simplificado para oxidação da superfície das fibras de carbono.</i>	36
<i>Figura II.3- Diagrama esquemático da preparação dos microeletrodos.</i>	38
<i>Figura II.4- Voltamogramas cíclicos obtidos com fibras de carbono não-tratadas e fibras tratadas.</i>	39
<i>Figura II.5- Microscopia de varredura eletrônica de uma fibra carbono tipo T-800, não tratada e tratada.</i>	40
<i>Figura II.6- VC obtidos com fibras não tratadas e tratadas com tetracloreto de titânio.</i>	41
<i>Figura II.7- VC obtidos com fibras tratadas.</i>	41
<i>Figura II.8- Dependência da corrente pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.</i>	42
<i>Figura II.9- Dependência da separação pico em função fração molar (F) de $TiCl_4$ usado no pré-tratamento.</i>	42
<i>Figura II.10- (A) - Voltamogramas cíclicos obtidos com fibras tratadas com $TiCl_4$ não diluído por 60 min, com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1}, em solução de $[Fe(CN)_6]^{3-}$ de diferentes concentrações; (B) Valores de corrente em função da concentração.</i>	44
<i>Figura II. 11- VC obtidos com fibras tratadas com diferentes tempos de imersão em água.</i>	45

Capítulo III - UTILIZAÇÃO DE FIBRAS DE CARBONO PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Figura III.1-	<i>Diagrama do planejamento fatorial das mistura de catecol e hidroquinona.</i>	61
Figura III.2-	<i>Gráfico dos scores da PC1 vs. Scores da PC2.</i>	61
Figura III.3-	<i>Potencial de pico vs concentração do tampão para cada isômero e mistura.</i>	65
Figura III.4-	<i>Potencial de pico vs pH.</i>	65
Figura III.5-	<i>Sinais obtidos por DPV para cada isômero e para a mistura em tampão TRIS-HCl 0,05 mol L⁻¹.</i>	66
Figura III.6-	<i>Resultados obtidos para os conjuntos de validação modelados com PLS 1, para catecol e hidroquinona.</i>	67
Figura III.7-	<i>Resultados obtidos para os conjuntos de validação modelados com PLS 2, para catecol e hidroquinona.</i>	68
Figura III.8-	<i>Arquitetura ótima da rede obtida após os procedimentos de treinamento e apodização.</i>	71
Figura III.9-	<i>Resultados obtidos para os conjuntos de validação modelados com rede neural para catecol e hidroquinona.</i>	72

Capítulo IV - CONSTRUÇÃO DE BIOSENSOR PARA SALICILATO

Figura IV.1-	<i>Organograma que reúne as metodologias descritas na literatura para determinação de salicilato.</i>	89
Figura IV.2-	<i>Voltamogramas cíclicos obtidos ante e após a imobilização da enzima SH.</i>	
Figura IV.3-	<i>Voltamogramas cíclicos obtidos em tampão fosfato, na ausência de salicilato, em presença de salicilato.</i>	89
Figura IV.4-	<i>Representação esquemática do mecanismo proposto na literatura para biossensores para salicilato, utilizando carbono como material eletródico.</i>	90
Figura IV.5-	<i>Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos de fibras de carbono em tampão fosfato</i>	90
Figura IV.6-	<i>Representação esquemática do mecanismo proposto neste trabalho para fibras de carbono.</i>	91
Figura IV.7-	<i>Resposta do biossensor obtida para salicilato em diferentes valores de pH.</i>	92
Figura IV.8-	<i>Influência da quantidade de NADH na resposta do biossensor.</i>	93

Figura IV.9-	<i>Estabilidade dos biossensores.</i>	94
Figura IV.10-	<i>Tempo de resposta dos biossensores.</i>	96
Figura IV.11-	<i>Curvas analíticas do biossensor.</i>	98
Figura IV.12-	<i>Gráficos de Lineweaver-Burk e Eadie-Hofste.</i>	99

ÍNDICE DE TABELAS

	pg.
I - INTRODUÇÃO	
Tabela I.1- Tipos de Fibras de Carbono.	7
I - PRÉ - TRAMENTO DAS FIBRAS DE CARBONO	
Tabela II.1- Potencial formal (E^0) obtido para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em solução com diferentes valores de pH usando fibras de carbono pré-tratadas como eletrodo de trabalho.	43
III - UTILIZAÇÃO DE FIBRAS DE CARBONO PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	
Tabela III.1- Resultados obtidos para os conjuntos de validação modelados com PLS1, PLS2 e rede neural, para catecol e hidroquinona.	69
Tabela III.2- Parâmetros empregados na arquitetura da rede inicial e parâmetros de treinamento (antes da apodização).	70
IV - CONSTRUÇÃO DE BLOSSENSOR PARA SALICILATO	
Tabela IV. 1- Características das fibras utilizadas na construção dos biossensores.	85
Tabela IV.2- Sensibilidade obtida para o biossensor em diferentes tampões: fosfato, TRIS _HCl e PIPES.	91
Tabela IV.3- Características dos biossensores construídos.	95
Tabela IV.4- Parâmetros normalizados (desvio padrão, sensibilidade e potencial aplicado) dos biossensores e correlação.	97
Tabela IV.5- Resultados obtidos para o biossensor e método de referência.	100

GLOSSÁRIO

%SEC	- % de erros padrão de calibração – standard errors of calibrations
%SEP	- % de erros padrão de previsão – standard errors of predictions
ΔE	- potencial médio
AM	- alto módulo
BM	- baixo módulo
CC	- catecol
DPV	- voltametria de pulso diferencial – differential pulse voltammetry
E	- potencial
E°	- potencial formal
HQ	- hidroquinona
I	- corrente
MM	- médio módulo
NADH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo
OBD	- optimal brain damage
OBS	- optimal brain surgeon
PAAQ	- poli -aminoantraquinona
PAN	- poliacrilonitrila
PC1	- primeira componente principal
PC2	- segunda componente principal
PCR	- regressão da componente principal – principal component regression
PLS	- mínimos quadrados parciais – partial lest-squares
RMSEP	- raiz média quadrática dos erros de previsão – root mean of standard errors of prediction
RSD	- desvio padrão relativo – relative standard deviation
SCE	- eletrodo saturado de calomelano – saturated calomel electrode
SEM	- microscopia de varredura eletrônica – scanning electron microscoph
TRIS	- tris-hidroximetilaminometano
UME	- ultramicroeletrodos
VC	- voltamograma cíclico

Capítulo I

I - INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a aplicação de novos materiais nas últimas décadas proporcionaram avanços significativos em diversos setores da sociedade moderna. Esses avanços contribuíram para uma melhor qualidade de vida em diversos setores, como: telecomunicações, transportes, medicina, construção civil, entre outros.

Entre os materiais estudados atualmente, as fibras de carbono têm merecido uma atenção especial de vários grupos de pesquisa devido às suas características, através das quais pode ser destacada a baixa densidade associada a uma alta resistência mecânica. As fibras de carbono foram utilizadas pela primeira vez nas indústrias aeronáutica e aeroespacial e o sucesso desta aplicação fez crescer o interesse em novas pesquisas e em novas aplicações envolvendo este material, bem como aprimoramento do processo de fabricação ¹.

Atualmente, as fibras de carbono são empregadas nos mais diversos setores da atividade humana, tais como nas indústrias automobilística, de materiais esportivos e médicos. Além disso, nas últimas décadas tem crescido o seu emprego na construção de eletrodos para medidas eletroquímicas².

Um breve relato é mostrado nos parágrafos seguintes; com intuito de apresentar alguns aspectos relacionados à produção, estrutura, composição, características e propriedades das fibras de carbono, bem como às suas aplicações em medidas eletroquímicas.

I.1. Produção das Fibras de Carbono

Os primeiros registros da produção de fibras de carbono são atribuídos a Thomas Edison¹, que empregou este material como filamento em lâmpadas elétricas incandescentes. Embora esta primeira preparação de fibras de carbono tenha ocorrido em 1878, este material só começou a ser produzido comercialmente a partir de 1964². O interesse pela produção das fibras de carbono foi alavancado pelos avanços das indústrias aeronáuticas e bélicas durante a década de 60. Nessa época, a produção comercial deste material

seguir um caminho semelhante ao utilizado por Thomas Edison, onde foi empregado, neste caso, fibras de rayon¹. Atualmente, os principais materiais precursores utilizados na produção de fibras de carbono são: a poliacrilonitrila (PAN) e o piche de petróleo.

A chave do desenvolvimento das fibras de carbono foi a habilidade para preparar filamentos de carbono que possuíssem alta ordenação. A descoberta foi encontrada independentemente por Bacon, Shindo e Watt, os quais usaram um processo de estiramento contínuo do material precursor, durante o tratamento de carbonização³.

O processo de fabricação pode variar segundo o precursor utilizado. Porém, de maneira geral, o método envolve uma primeira etapa de conversão do material precursor carbonáceo em forma de fibra, onde as fibras do material de partida são oxidadas a temperaturas próximas de 200 °C, de maneira lenta e controlada, para evitar uma excessiva volatilização ou fusão do precursor. Posteriormente, a temperatura é elevada a valores próximos de 1000 °C para a carbonização do material em atmosfera inerte. Em alguns casos, o material pode ser ainda aquecido a temperaturas próximas de 2000 °C, sendo que nesta última condição o material resultante possui características semelhantes às encontradas no grafite^{1,2}.

Em alguns processos de fabricação, o material precursor é inicialmente esticado, sendo posteriormente oxidado e carbonizado com a finalidade de evitar a relaxação da cadeia polimérica¹. Quando este processo é realizado a temperaturas superiores a 2200 °C, as fibras de carbono obtidas apresentam um maior ordenamento da cadeia polimérica¹.

Além dos diferentes processos de fabricação, existe também a preparação de fibras reforçadas, as quais são cobertas com diferentes materiais poliméricos, cerâmicos, carbetos e ativadas por gaseificação em vapor de nitrogênio⁴⁻⁷. Estas fibras são geralmente utilizadas na indústria aeroespacial.

Edmonds² também fez um breve relato sobre as diferentes etapas de reação que ocorrem durante a pirólise da PAN na preparação das fibras de carbono. Neste trabalho, além das transformações que este material sofre entre a temperatura de oxidação (próximo de 200 °C) e carbonização (próximo de 1000 °C), são também discutidas as mudanças ocorridas até a temperatura de

grafitização (próximo de 2700 °C). O mecanismo de estabilização, carbonização e pirólise para a produção das fibras de carbono têm sido alvo de muitos estudos. Porém a natureza das reações que ocorrem nestas etapas continua sendo assunto de pesquisa⁴⁻⁸.

1.2. Estrutura e Composição

Desde os primeiros trabalhos envolvendo a preparação de fibras de carbono, vários grupos de pesquisa têm procurado elucidar a estrutura, as propriedades e as características desses materiais. Embora considerável progresso foi realizado ao longo destes 40 anos, a origem e desenvolvimento da estrutura, bem como a relação entre estrutura e propriedades, não são completamente entendidas para as fibras de carbono.

Atualmente, vários estudos são realizados para elucidar a estrutura, empregando-se diferentes técnicas instrumentais, das quais podem ser destacadas a difração de raios-X⁹; a microscopia eletrônica e óptica^{10, 11}, a espectroscopia fotoeletrônica de raios-X e o Raman³.

De maneira geral, os resultados encontrados revelam que as principais propriedades das fibras de carbono como a resistência mecânica, força de tensão, bem como a estrutura e composição, dependem do tipo de material de origem e do processo de fabricação. Alguns trabalhos descrevem o mecanismo de polimerização e mudanças estruturais que ocorrem nas fibras durante a etapa de carbonização³.

Sob o ponto de vista estrutural das fibras de carbono, Donnet¹² discutiu em seu artigo dois modelos que foram propostos, simultaneamente e independentemente, em 1969, por Johnson e Tyson e por Fourdeux e colaboradores.

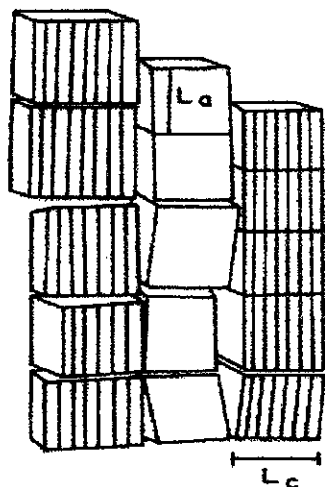


Figura I.1- Modelo de estrutura de fibras de carbono proposto por Johnson e Tyson, L_a – porção relativamente reta dos planos ao longo do comprimento do retículo, L_c – altura do comprimento dos planos do grafeno¹²

O modelo de Johnson e Tyson sugere que as fibras são formadas pelo empilhamento de várias fitas de carbono como mostrado na Figura I.1. Neste caso, o empilhamento está relacionado ao comprimento axial da fibra de carbono, enquanto que as várias colunas colocadas lado a lado determinam a espessura da fibra ou sua seção transversal.

O modelo proposto por Ruland¹² é completamente diferente do discutido anteriormente. Neste modelo, mostrado esquematicamente na Fig. I.2, as fibras são formadas por diversos conjuntos de fitas, sendo que estas possuem aproximadamente 6 nm de espessura e alguns milhares de nanômetros de comprimento. Várias dessas fitas são ordenadas paralelamente formando vários conjuntos de fitas denominados de microfibras, as quais se estendem em direção ao eixo axial da fibra de carbono. As superfícies axiais destas microfibras são formadas por diversos planos basais de grafite^{1, 12}. No esquema mostrado na Figura I.2, podem ser observadas também lacunas entre as microfibras com dimensões de 20 a 30 nm de comprimento e de 1 a 2 nm de largura. Estas falhas aparecem durante a formação da fibra de carbono, devido às dobras das microfibras

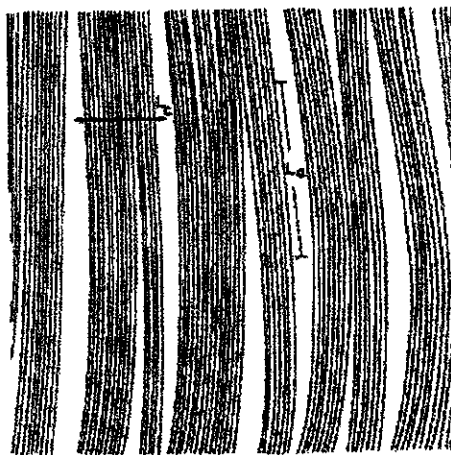


Figura I.2- Modelo da estrutura de fibras de carbono proposto por Ruland, L_a – porção relativamente reta dos planos ao longo do comprimento do retículo, L_c – altura do comprimento dos planos do grafeno¹².

e imperfeições de empacotamento. Outros trabalhos têm demonstrado que diferentes tipos de lacunas podem ainda aparecer devido à volatilização de materiais ocluídos nas fibras durante o aquecimento². Neste caso, estas falhas estruturais possuem dimensões muito maiores que aquelas descritas anteriormente, podendo alcançar comprimentos da ordem de 5 a 10 μm . O resultado deste modelo estrutural revela que as fibras de carbono possuem uma baixa porosidade ao longo do eixo axial, entretanto ao longo da seção transversal a porosidade é bastante elevada.

Alguns modelos estruturais da seção transversal de fibras de carbono do tipo PAN e piche são apresentados na Fig. 1.3. Diversas estruturas podem ser encontradas, sendo mais comuns as do tipo radial, randômica e círculos concêntricos¹. Uma relação entre estrutura e propriedades para estes dois tipos de fibras foi discutida por Edie, bem como uma explanação detalhada do processo de fabricação⁸.



Figura - 1.3 - Modelos de estruturas transversais de fibras de matérias tipo PAN e piche¹.

A composição das fibras de carbono depende do tipo material e da temperatura empregados no processo de fabricação. Basicamente, quando as fibras são preparadas em temperaturas próximas de 1000 °C, elementos como C, H, N e O são normalmente encontrados. À medida que a temperatura aumenta, as porcentagens de H, N e O diminuem, enquanto que a de carbono aumenta. Para valores de temperatura próximos de 2000 °C, a fibra é composta basicamente por átomos de carbono¹.

1.3. Características e Propriedades

Trabalhos recentes classificam as fibras de carbono segundo o grau de orientação preferencial das camadas de grafeno* na direção axial das fibras.

Baseado neste aspecto, as fibras são denominadas de alto módulo (AM), médio módulo (MM) e baixo módulo (BM), sendo classificadas como tipo I,

* Grafeno são as camadas hexagonais reticulares presentes no grafite natural. Quando os planos de camadas hexagonais estão empilhados com ordem tridimensional o material é definido como grafite.

tipo II e tipo III, respectivamente¹. Na Tabela - I.1 estão reunidas algumas das principais características e propriedades destes três tipos de fibras de carbono.

Tabela I.1 - Tipos de Fibras de Carbono.

Fibra	Força de Tensão (GN m ⁻²)	Módulo (GN m ⁻²)	Comentários
tipo I	2,6	340 (alto)	- Alta densidade, baixa porosidade, microfibras lineares e bem ordenadas.
tipo II	2,9	240(médio)	- Alta quantidade de microporos de 0,1 a 5 µm.
tipo III	2,6	160 (baixo)	- Alta quantidade de microporos, extensa área superficial, microfibras distorcidas e pouco ordenadas.

As fibras de alto módulo têm um elevado grau de alinhamento carbono-carbono, ligados paralelamente na direção axial da fibra, resultando em uma estrutura denominada de "árvore de anéis". Este tipo de fibra é preparado por meio de materiais precursores como o piche de mesofase e PAN. Já as fibras de baixo módulo são obtidas a partir de materiais como o rayon e o piche isotrópico. O primeiro tipo de fibra apresenta um custo mais elevado, pois o processo de fabricação é mais complexo, necessitando de uma etapa de estiramento do material precursor e de altas temperaturas^{1,8}.

Quando fibras de carbono são submetidas a tratamento térmico, observa-se uma diminuição da resistência elétrica com o aumento da temperatura. Este fato está associado ao maior grau de perfeição das cadeias de carbono, que são obtidas durante o processo de aquecimento deste material¹³. Além disso, também foi observado que existe uma correlação entre os valores de resistência elétrica e os diferentes grupos funcionais presentes na superfície das fibras. Em relação a estes grupos funcionais, observa-se que eles são basicamente compostos por oxigênio, predominando grupos carboxílicos, hidroxílicos e etílicos. Existe ainda a possibilidade de serem encontrados grupos aromáticos como quinonas, hidroxiquinonas e fenóis. O tipo de grupo, bem como a sua densidade na superfície da fibra, depende do

tratamento térmico e do tipo de oxidação química e/ou eletroquímica ao qual o material é submetido antes da sua utilização^{2, 3}. Na Figura 1.4 é possível visualizar os grupos funcionais em fibras oxidadas, que foram determinados por espectroscopia fotoeletrônica de raio -X (XPS).

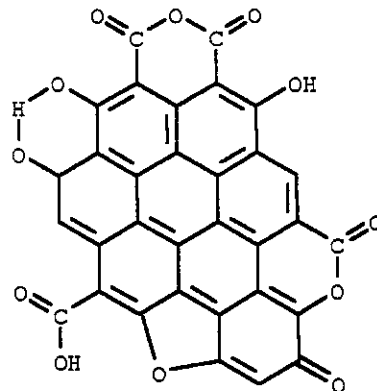


Figura 1.4: Representação dos grupos funcionais presentes na superfície das fibras de carbono¹⁴.

A Figura 1.5 resume as principais características, propriedades e usos dos três principais tipos de fibras, obtidos a partir de diferentes materiais precursores.

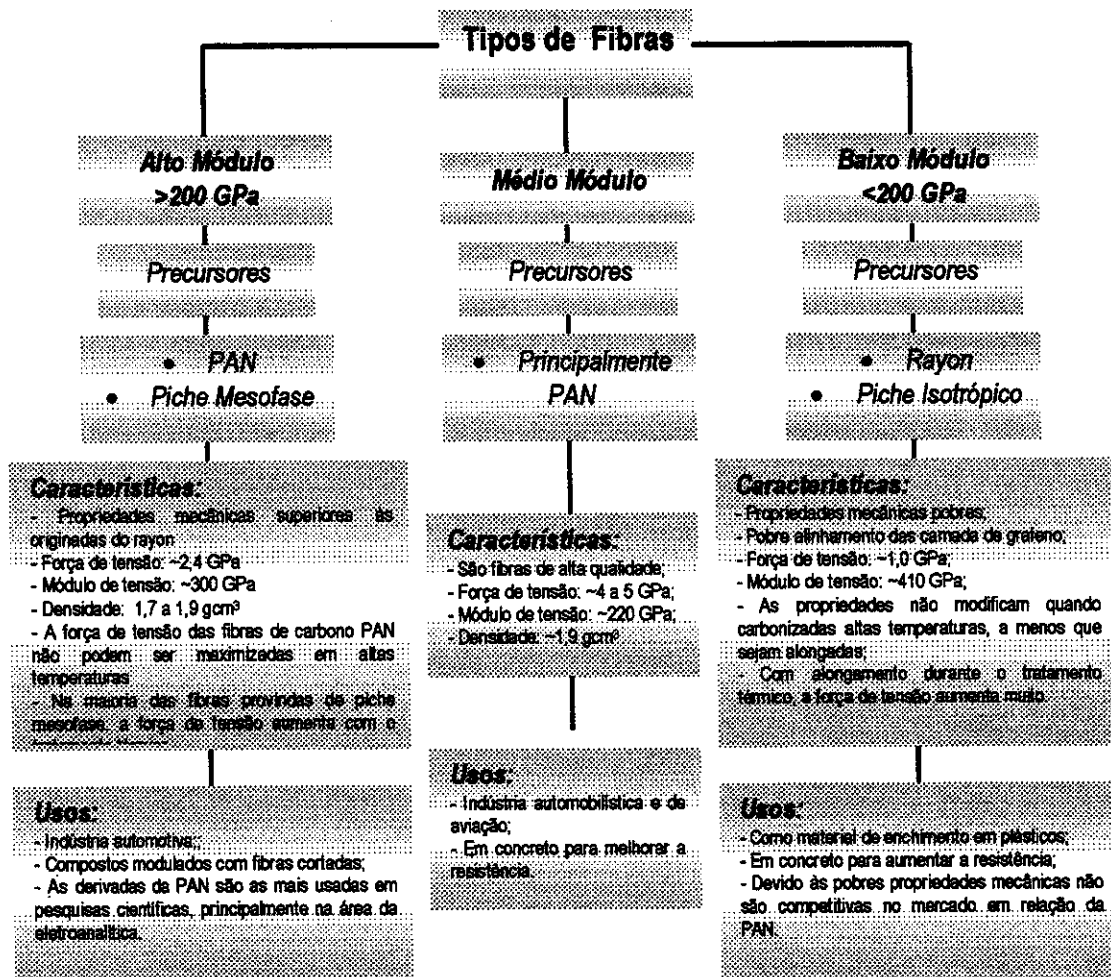


Figura 1.5 - Organograma que reúne as principais propriedades e características e usos das fibras de carbono

1.4. Fibras de carbono como material eletródico

Apesar da primeira aplicação analítica das fibras de carbono ter sido feita, em 1975, por Jennings e colaboradores¹⁵, o seu interesse em medidas eletroquímicas, cresceu após os trabalhos realizados em 1979 por Armstrong-James e Millar¹⁵ e por Ponchon e colaboradores¹⁷. Os resultados encontrados por estes pesquisadores mostraram uma sensível melhora na qualidade dos resultados voltamétricos devido às características peculiares das fibras de carbono. A partir destes trabalhos, cresceu o interesse pelo emprego deste material na construção de sensores e biossensores; e atualmente é possível observar um crescente aumento no número de publicações sobre a utilização de fibras de carbono em medidas eletroquímicas¹⁸⁻²⁰.

Inúmeras características têm sido apontadas como responsáveis pelo uso de fibras de carbono em medidas eletroquímicas. As fibras são compostas basicamente de carbono e, sob este aspecto, o comportamento deste material em medidas eletroquímicas é bem conhecido. Além disso, as fibras podem ser aplicadas em uma ampla faixa de potencial negativo e positivo.

Entretanto, duas características foram, sem dúvida, responsáveis pelo aumento do interesse de vários pesquisadores na aplicação de fibras de carbono em medidas eletroquímicas. A primeira está relacionada às suas pequenas dimensões²¹, com diâmetros variando entre 5 e 50 μm e a segunda diz respeito à presença de grupos funcionais, contendo principalmente oxigênio¹⁸, na superfície.

As pequenas dimensões das fibras possibilitam a construção de eletrodos em escalas de micrômetros, denominados de microeletrodos, os quais apresentam características eletroquímicas muito diferentes daquelas dos eletrodos clássicos, cujas dimensões se situam na ordem de milímetros. Características como baixa queda ôhmica, corrente capacitiva extremamente pequena, facilidade para alcançar o estado estacionário e uma melhor razão sinal/ruído são encontradas quando se reduz as dimensões dos eletrodos. Além disso, medidas eletroquímicas *in vivo*, *in vitro* e na ausência de eletrólito de suporte ou meios apróticos^{19, 20} e voltametrias a velocidades ultra-rápidas passaram a ser uma realidade. Diversas revisões²²⁻²⁹ e artigos de divulgação^{30, 31} sobre UME foram publicados no últimos anos e uma leitura destes trabalhos

mostra ao leitor que este assunto não se esgota apenas nas discussões anteriores.

A presença de grupos funcionais na superfície das fibras de carbono tem proporcionado a construção de eletrodos quimicamente modificados e de biossensores³²⁻³⁷. Diferentes formas de pré-tratamento e imobilização de substâncias têm proporcionado a construção de diversos tipos de eletrodos, muitos dos quais têm merecido destaque principalmente por possibilitarem medidas eletroquímicas *in vivo*³⁸⁻⁴³. Apesar de um número significativo de trabalhos fazerem uso de fibras de carbono como material eletródico, muitos autores relatam o fato de que estas pesquisas estão apenas no início, sendo ainda esperado um aumento significativo de trabalhos relacionados à construção de eletrodos quimicamente modificados e biossensores.

Dos diversos tipos de fibras encontrados comercialmente, as fibras do tipo I (alto módulo) são as mais indicadas para serem aplicadas na construção de eletrodos. Este fato está relacionado ao melhor ordenamento das cadeias de carbono que este tipo de material apresenta, resultando em uma menor resistência elétrica e melhor transporte da corrente. Além disso, este tipo de fibra apresenta uma menor porosidade quando comparado aos demais tipos de fibras existentes^{2, 18}.

I. 5. Construção de eletrodos com fibras de carbono

Diversos modelos são propostos para a construção de eletrodos de fibra de carbono, podendo empregar um conjunto de fibras ou uma única fibra⁴⁴⁻⁴⁹. No modelo mais empregado, as fibras de carbono são seladas em capilares de vidro com resina epoxi após ser feito o contato elétrico entre a fibra e o fio metálico condutor com o uso de cola de prata ou mercúrio metálico⁴⁹. A Figura I.6 apresenta um esquema de um eletrodo assim obtido.

Por mais de 20 anos os ultramicroeletrodos foram usados em estudos de sistemas biológicos *in situ* e também para detectar moléculas pequenas como neurotransmissores. Entretanto, somente a partir dos anos 90 que eles foram empregados também em estudos de uma única célula. O maior problema para este desenvolvimento está na dificuldade da confecção destes ultramicroeletrodos

para uso diário. Para medidas de concentrações locais de moléculas liberadas de uma única célula, a superfície exposta deve ser pequena. Em linhas gerais, usualmente são feitos de uma fina fibra de carbono (5-11 μm) isolada (quando o eletrodo é confeccionado na forma de disco, Figura 1.7) ou colocadas na ponta de capilares de vidro, plástico ou outros materiais não condutores (quando o eletrodo é confeccionado na forma cilíndrica, como na Figura 1.6). Os capilares de vidro, com diâmetros de aproximadamente 10 μm ou mais, são colocados em uma pipeta convencional de vidro. Estas pipetas promovem estabilidade mecânica quando o eletrodo penetra em tecidos biológicos⁴⁵. Para estudos em uma única célula, pesquisadores usam micro tubos de polietileno como material isolante^{46, 46}.

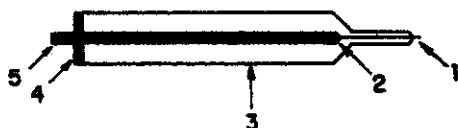


Figura - 1.6: Representação esquemática da preparação de um ultramicroeletrodo cilíndrico, 1- fibra de carbono, 2- junção da fibra com fio condutor, 3-capilar de vidro, 4- resina epoxi, 5-fio condutor.

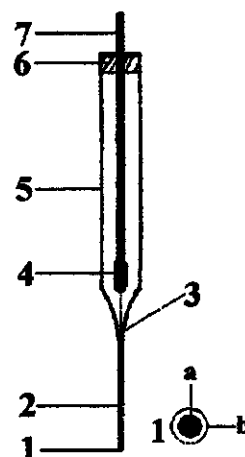


Figura - 1.7: Representação esquemática de um ultramicroeletrodo de disco : (1) - ponta do eletrodo, vista frontal (a) fibra de carbono, (b) material não condutor; (2)- fibra incrustada com material não condutor; (3)- junção capilar de vidro/fibra incrustada; (4)- junção fio de cobre/fibra; (5) - capilar de vidro; (6)- resina epoxi; (7)- fio de cobre.

A construção de eletrodos de fibras de carbono recobertos com plástico envolve três passos básicos: (1) a inserção das fibras de carbono no tubo de plástico; (2) o aquecimento e estiramento do tubo de plástico, recobrindo a fibra; (3) o corte da fibra de carbono que ficou exposta do plástico, obtendo-se, assim, os ultramicroeletrodos de disco, ou ainda o corte para deixar a ponta do eletrodo da forma desejada⁴⁶. Quando os passos 2 e 3 são realizados manualmente, boa reprodutibilidade não é conseguida. Na construção deste tipo de eletrodo geralmente são usadas aparelhagens bem sofisticadas. Koh e Hille⁴⁶ descrevem em um artigo recente um extensor e um cortador semi-automáticos para realizar

as etapas 2 e 3, o que facilita a fabricação dos eletrodos de fibras de carbono, tornando a mesma reproduzível.

Um outro tipo de construção de eletrodos de fibra de carbono é o arranjo de eletrodos, onde duas ou mais fibras de carbono são colocadas em um mesmo corpo, porém estão isoladas entre si. Estas fibras funcionam como eletrodos independentes ou não, dependendo da distância entre as fibras^{51, 52}. Geralmente estes eletrodos são confeccionados na forma de disco. Uma representação é mostrada na Figura 1.8.

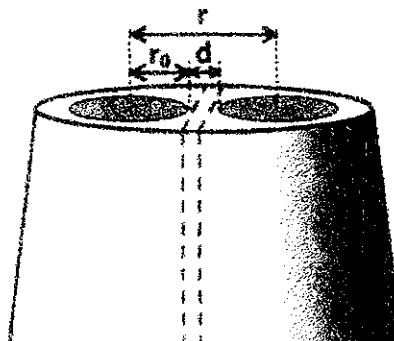


Figura - 1.8: Representação de um ultramicroeletrodo de fibra de carbono do tipo duplo. As linhas pontilhadas indicam a posição do septo de vidro. r_0 o raio do eletrodo ($\cong 5 \mu\text{m}$), r a distância entre os centros dos eletrodos ($\cong 11,5 \mu\text{m}$) e d a espessura do septo ($\cong 1,5 \mu\text{m}$)⁵¹.

1.6. Aplicação dos eletrodos de fibra de carbono

Uma das mais importantes características citadas anteriormente para as fibras de carbono está na possibilidade de modificação de sua superfície, permitindo a construção de eletrodos com maior sensibilidade e seletividade, especialmente no caso de biossensores^{18,53-60}. Diversos métodos de modificação de superfícies de eletrodos são propostos e uma revisão a respeito deste assunto foi feita por Shaw⁶¹. No caso do emprego de fibras de carbono, os métodos mais utilizados são a eletropolimerização^{38, 34}, eletrodeposição^{34, 39}, modificação química^{32, 57} e a adsorção^{33, 62, 63}.

Estudos das superfícies modificadas destas fibras têm sido realizados por microscopia eletrônica e raios-X^{64, 65}, fornecendo informações a respeito da morfologia, porosidade e outras características das superfícies destes filmes. Estas informações têm sido utilizadas na tentativa de estabelecer-se um modelo que possa explicar a seletividade encontrada para estes tipos de eletrodos, com base no tamanho das moléculas ou íons do analito⁶⁴. Estes estudos têm também

demonstrado que a faixa de potencial e o tempo empregado na polimerização eletroquímica têm grande efeito sobre a morfologia do filme suportado na superfície da fibra⁶⁵.

Uma revisão sobre as primeiras aplicações eletroanalíticas das fibras de carbono foi publicada por Edmonds², em 1985. Naquela época, os trabalhos mostravam aplicações de fibras de carbono, empregando-se diferentes metodologias eletroquímicas, pré-tratamentos de suas superfícies por oxidação química ou eletroquímica e os seus primeiros usos em medidas de neurotransmissores.

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento no número de publicações, principalmente empregando as fibras de carbono na construção de eletrodos quimicamente modificados e biossensores. A Figura 1.9 mostra o grande número de trabalhos publicados nos últimos 25 anos. Como pode ser observado (Figura 1.9), o número de trabalhos empregando fibras de carbono tem aumentado bastante, principalmente em sistemas destinados a determinações *in vivo*. A maioria destas determinações são de espécies de interesse farmacêutico e clínico, tais como: dopamina, catecolaminas e óxido nítrico (NO), entre outras. Estes trabalhos representam cerca de 30% dos trabalhos publicados nos últimos 5 anos, fazendo uso de fibras de carbono.

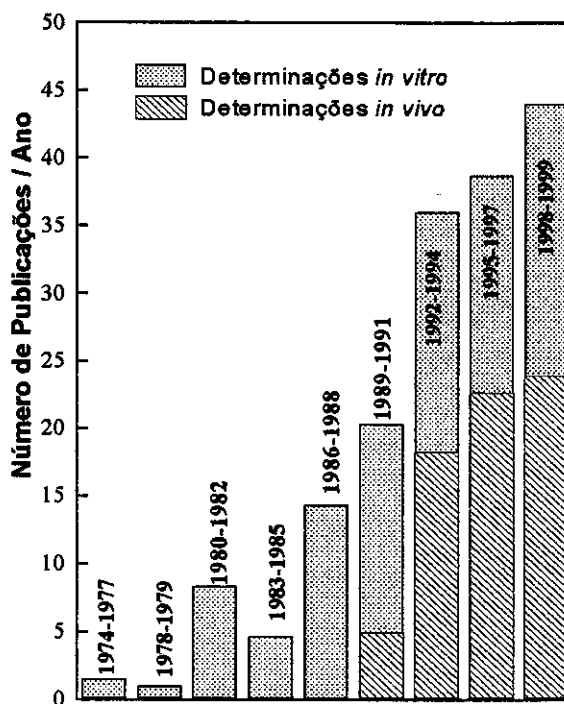


Figura 1.9: Publicações referente ao emprego das fibras de carbono, como sensores e biossensores em 25 anos. Dados obtidos através Institute for Scientific Information® (ISI)®

As metodologias mais relevantes e mais recentes para os compostos de interesse clínico, biológico, bem como para espécies inorgânicas e moléculas de interesses ambiental, estão descritas brevemente à seguir.

I. 6.1. Determinação de espécies de interesse clínico, biológico e farmacêutico

Das espécies de interesse clínico, as que mais tem sido pesquisadas são os neurotransmissores, como dito anteriormente. Os neurotransmissores são compostos que possuem um papel muito importante no cérebro, pois eles são a chave de ligação na comunicação entre neurônios. Quatro dos neurotransmissores conhecidos (dopamina, norepinefrina, epinefrina e serotonina) são facilmente oxidáveis em eletrodos de carbono. Estes quatro neurotransmissores são de especial interesse de pesquisadores em neurociência, pois diversas drogas, como anfetamina, cocaína e vários neurolépticos, possuem seus sítios de ação no cérebro, onde estes neurotransmissores atuam. Destes neurotransmissores, o mais pesquisado é a dopamina. Dos inúmeros sistemas pode-se citar: alguns que realizam medidas *in vitro*^{66, 67, 68} e *in vivo*^{45, 72-75}.

Em relação aos sistemas propostos para determinação de dopamina *in vitro*, destaca-se: sistema proposto por Akiyama e colaboradores⁶⁶, o qual é composto por uma célula eletroquímica com três eletrodos, especialmente desenhada para estudos *in vitro*. A célula emprega como eletrodo de trabalho uma fibra de carbono de 500 μm de comprimento e 7 μm de diâmetro. Outro sistema especialmente montado para a medida de dopamina em volumes extremamente pequenos (10 nL) foi proposto por Zhang e colaboradores⁶⁷. Estes sistemas apresentam boa reprodutibilidade (5,6 % para $n=10$) e limites de detecção que variam entre $1,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ⁶⁷ e $2,0 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ⁶⁶.

Há também eletrodos para determinação de dopamina *in vitro*, modificados, como o proposto por Xu e colaboradores⁶⁸. O eletrodo é constituído por duas camadas de filme composta por poli(3-metiltiofeno) e polipirrol, que foi preparado pela eletropolimerização inicial do 3-metiltiofeno por meio de voltametria cíclica e posteriormente eletropolimerização do pirrol. O eletrodo exibiu uma alta reversibilidade de resposta para a dopamina e ácido ascórbico, com um limite de detecção de $3,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, permitindo a determinação destas espécies em valores de pH fisiológico. Isto foi um grande avanço, pois uma das dificuldades em se determinar neurotransmissores, como a dopamina, em fluidos extra celulares, empregando medidas eletroquímicas, está relacionada a interferências causadas por outras espécies como, por exemplo, o ácido ascórbico. Esta dificuldade está relacionada

às diferenças de concentrações destas espécies existentes no cérebro. Enquanto a faixa de concentração de dopamina varia de $0,1$ a $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, o ácido ascórbico possui concentração pelo menos 1000 vezes maior⁶⁹. Este problema têm sido contornado utilizando-se eletrodos modificados de fibras de carbono^{70,71}. Os eletrodos mostram uma excelente sensibilidade para a dopamina, com pouca ou nenhuma interferência do ácido ascórbico, permitindo até a determinação simultânea das duas espécies.

Para uma melhor compreensão do mecanismo de funcionamento do cérebro, especialmente dos mamíferos, pesquisas têm sido realizadas no intuito de medir a concentração de diversos neurotransmissores *in vivo*^{56, 72-78}. Devido às suas pequenas dimensões, as fibras de carbono têm-se mostrado como uma excelente ferramenta para estes estudos. Determinações voltamétricas de dopamina *in vivo* têm sido realizadas com auxílio de eletrodo de fibras de carbono^{72, 73, 75}, implantando o eletrodo diretamente em cérebros de ratos, sendo o neurotransmissor monitorado ao longo do tempo. Os dados encontrados revelam que existe uma correlação entre a concentração do neurotransmissor e a atividade motora do animal.

Medidas voltamétricas de catecolamina^{79, 80}, outro importante neurotransmissor, em uma única célula bovina, têm sido também realizadas com auxílio de eletrodos de fibra de carbono. As possibilidades de realizar-se medidas voltamétricas no interior de células nervosas, empregando-se fibras de carbono, foram discutidas por Ewing e colaboradores⁸¹.

Por ser uma espécie de interesse biológico, a determinação de ácido ascórbico também tem sido realizada com o uso de eletrodos modificados de fibra de carbono. Janda e colaboradores⁸² utilizaram um filme de tetrametilpiridoporfirazina sobre a superfície da fibra, enquanto Gao e colaboradores⁸³ empregaram filme de heptacianonitrosilferrato de cobre. Neste último caso, o eletrodo apresentou resposta linear em medidas voltamétricas entre $5,0 \cdot 10^{-5}$ e $6,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, sendo que esta faixa pode ser estendida em medidas amperométricas de $8,0 \cdot 10^{-6}$ a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, o eletrodo não apresentou respostas dependentes de valores de pH compreendidos entre 2 e 8.

Outra espécie de interesse biológico bastante estudada nos últimos anos, utilizando principalmente ultramicroeletrodos de fibras de carbono é o óxido nítrico (NO)^{34, 37 - 39, 43, 84}, que foi estabelecido recentemente como um dos mais importantes mensageiros biológicos envolvidos em processos fisiológicos e patofisiológicos no sistema nervoso central. O entendimento do papel biológico requer um estudo detalhado de sua produção, transporte e regulação em várias células e tecidos. Isto requer medidas *in situ* e *in vivo* em tempo real de maneira bastante seletiva e quantitativa. Em linhas gerais, a maior parte dos eletrodos construídos para determinação de óxido nítrico envolve a modificação com filmes de metaloporfirinas eletropolimerizados^{37, 39, 43, 84} e ou recobertos com Nafion®^{37-39, 43}. A membrana de Nafion® atua como uma membrana seletiva para evitar a oxidação de nitritos.

Diversos eletrodos têm sido desenvolvidos para outras espécies de interesse farmacêutico, fitológico, clínico e biológico. Compostos como o ácido pipemídico⁸⁵, utilizado no tratamento de infecções urinárias, a aminopterina⁸⁶, empregada no tratamento do câncer e a zeatina⁸⁷, um fito-hormônio empregado como regulador de crescimento de plantas, têm sido determinados utilizando eletrodos de fibras de carbono por meio de medidas de voltametria adsortiva. Outros estudos mostraram também a possibilidade do emprego das fibras de carbono para a determinação e estudos de ácidos nucleicos⁸⁸, aminoácidos³⁴ e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH)⁸⁹, um importante cofator em muitas reações enzimáticas.

Além dos compostos determinados acima, geralmente determinados em meio aquoso, não se poderia deixar de mencionar os estudos eletroquímicos e determinações realizados em meios apróticos. Compostos como vanilina, usado como agente aromatizante em alimentos, foi determinado por Agui e colaboradores⁹⁰, além de estudos eletroquímicos realizados com β - caroteno¹⁹ e vitamina K₁²⁰, foram recentemente realizados.

A presença de grupos contendo oxigênio, como mencionado anteriormente, na superfície das fibras de carbono tornam estas promissoras no desenvolvimento de eletrodos enzimáticos¹⁸. Devido à dificuldade encontrada por diversas enzimas na transferência de elétrons entre seu sítio ativo e a superfície do eletrodo, muitos sensores para biomoléculas têm empregado compostos que

aceleram este processo. Estas espécies, conhecidas como mediadores eletrônicos, podem ser utilizadas para diminuir o valor do potencial onde ocorre a reação redox de interesse de muitos biossensores⁹¹, permitindo, desta forma, minimizar efeitos de interferência causados por outras espécies eletroativas presentes no meio em estudo⁶⁰. Vários estudos têm sido realizados neste sentido, como, por exemplo, emprego o azul de metileno ou azul de prússia, como mediador de elétrons^{53, 62, 91}.

Biossensores baseados em fibras de carbono modificadas com filme de poli- β -aminoantraquinona (pAAQ)⁶⁵, preparados por eletropolimerização e por reação covalente do azul de o-toluidina, foram desenvolvidos para a determinação de hemoglobina⁹². O primeiro eletrodo apresenta maior estabilidade que o segundo, pois pode ser continuamente utilizado na determinação de hemoglobina por mais de duas semanas. Quando estocado em tampão de pH 7,4 por um mês, a sensibilidade de sua resposta amperométrica diminui apenas 5,7%. Além disso, ele apresenta uma maior sensibilidade que o eletrodo modificado com azul o-toluidina e uma faixa linear de resposta entre $5,0 \cdot 10^{-7}$ e $3,4 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Entre os diversos eletrodos enzimáticos construídos, aqueles destinados à determinação de glicose também receberam uma atenção especial, empregando diferentes métodos para a modificação química da superfície da fibra de carbono^{53, 93, 94}. Furbee e colaboradores⁵³ empregaram a copolimerização da glicose oxidase com pirrol sobre fibras de alto módulo. Eletrodos preparados a partir da imobilização simultânea da enzima "horseradish peroxidase" (peroxidase de raiz forte) e glicose oxidase foram propostos por Csöregi e colaboradores^{59, 60}. A principal característica deste eletrodo é a possibilidade de diferenciar espécies como glicose e peróxido de hidrogênio. Outros exemplos são as preparações de microeletrodos cobertos com glicose oxidase em ambiente saturado com vapor de glutaraldeído⁹³ e microbiossensores preparados por co-imobilização de acetilcolina esterase e colina oxidase⁹⁴, sendo este último empregado na determinação de acetilcolina e glicose. Além dos biossensores para glicose e acetilcolina, cita-se também o biossensores para lactato, que foram desenvolvidos por Shram e colaboradores para detecção de lactato, *in vivo*, em cérebro de ratos⁵⁶.

1. 6.2. Determinação de moléculas de interesse ambiental e espécies inorgânicas

A determinação de compostos de interesse ambiental, principalmente metais pesados, utilizando eletrodos de fibras de carbono parece não ter difundido muito, como a utilização destes eletrodos para determinação de compostos de interesse clínico, nos últimos 5 anos. Porém, há vários trabalhos relevantes.

Compostos fenólicos podem ser determinados usando eletrodos de fibras de carbono⁹⁵⁻⁹⁷. Destes pode se destacar o eletrodo proposto por Agüí e Pingarrón⁹⁷, o qual foi modificado com filme de poli(3-metiltiofeno) para a determinação de compostos fenólicos. Este eletrodo apresentou uma resposta superior àquelas encontradas com o uso de eletrodo convencional de carbono vítreo e uma melhor resolução para as medidas voltamétricas de pulso diferencial em solução aquosa e em emulsão água-óleo, empregando-se misturas como terc-butilhidroxianisol, terc-hidroquinona e propilgalato.

Fung e Mak⁹⁸ utilizaram ultramicroeletrodos de fibras de carbono e voltametria de pulso diferencial como ferramenta para investigar o efeito de alguns pesticidas, como metil paration e etil paration em ovos de rã, tendo como objetivo verificar o impacto destes pesticidas no meio ambiente. As vantagens do uso de ultramicroeletrodos de fibras de carbono é que o sistema biológico estudado é pequeno, e os UME possuem boa resistência mecânica e uma ampla faixa para estudos eletroquímicos, visto que os pesticidas estudados apresentam potenciais redox que variam de -600 a -1300 mV.

Fibras de carbono também são aplicadas na construção de eletrodos para a determinação de espécies inorgânicas. Vários trabalhos são destinados à determinação de metais pesados⁹⁹⁻¹⁰⁴, porém poucos foram desenvolvidos recentemente^{103,104}. De maneira geral, as determinações de metais pesados envolvem técnicas de pré-concentração e a modificação da superfície das fibras de carbono pela formação de um filme de mercúrio, o qual pode ser preparado antes ou simultaneamente à etapa de depósito do metal⁹⁹⁻¹⁰². Os resultados mostram que os limites de detecção são comparáveis àqueles encontrados com o uso de eletrodo clássico de mercúrio de gota pendente, com a vantagem de que as fibras de carbono permitem medidas em volumes extremamente pequenos, na ordem de 5 μL e com altas velocidades de varredura de potencial de 1-100 V/s.

Exemplos do uso de fibras de carbono sem a presença de filmes de mercúrio para a determinação de metais também podem ser encontrados. Edmonds e Guoliang¹⁰⁵ empregaram fibras de carbono para determinação de cobre, utilizando diversos tipos de fibras. Os eletrodos apresentaram uma faixa de resposta linear para a concentração deste metal entre $1,0$ e $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Neste trabalho, foram também realizados estudos sobre o efeito de pré-tratamento eletroquímico sobre as fibras de carbono, mostrando que este processo aumenta a sensibilidade de resposta dos eletrodos. Alames-Varela e Costa-García¹⁰³ mostraram a possibilidade de determinar-se ouro com eletrodos de fibra de carbono empregando voltametria de redissolução anódica. Neste caso, a faixa de resposta linear do eletrodo foi de $1,0 \cdot 10^{-8}$ a $1,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $5,94 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e desvio padrão relativo de 2,78% para 5 medidas em uma solução com concentração de $3,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de ouro (III).

Fibras de carbono têm sido empregadas na construção de eletrodos para a determinação de nitrito. Silva e colaboradores¹⁰⁶ utilizaram fibras de carbono para a determinação de nitrito sem qualquer modificação de sua superfície. Voltametria de varredura linear com velocidades de varredura da ordem de $0,1 \text{ V/s}$ e amostras com baixa condutividade iônica foram utilizadas, possibilitando-se análises rápidas e determinações diretas de nitrito em amostras de águas naturais. Os autores discutiram também a influência de espécies como NO_3^- e oxigênio dissolvido na resposta do eletrodo.

Além das aplicações discutidas anteriormente para as fibras de carbono, pode-se ainda destacar o seu uso como microdetetores acoplados à análise em fluxo^{59,34}, cromatografia líquida¹⁰⁷⁻¹¹⁰ e eletroforese capilar¹¹¹⁻¹¹⁷. A grande vantagem de utilizar-se microsensores como detectores nestes casos está relacionada ao aumento de sensibilidade e resolução que estes detectores proporcionam, além de permitirem o uso de célula de detecção com pequenos volumes e uma melhor razão sinal/ruído.

Em resumo, a primeira vantagem que pode ser destacada para o uso de fibras de carbono é a possibilidade de construção de eletrodos com dimensões da ordem de micrômetros. Estas pequenas dimensões têm proporcionado inúmeras vantagens na utilização destes eletrodos, das quais podem ser destacadas características como baixo valor de queda ôhmica, corrente capacitiva

extremamente pequena e a facilidade em alcançar o estado estacionário. Estes fatos têm permitido a obtenção de dados eletroquímicos os quais não eram possíveis de serem realizados com o uso de eletrodos convencionais, cujas dimensões são da ordem de milímetros. Desta forma, é possível, atualmente, realizar medidas *in vitro* e *in vivo*, na ausência de eletrólito de suporte, voltametria ultra rápida (1MV/s) e em pequenos volumes de amostra (5 μ L). Outra importante característica das fibras de carbono está relacionada com a presença de grupos funcionais na sua superfície, principalmente grupos contendo oxigênio, como carboxílicos e hidroxílicos, podendo também ser encontrados grupos aromáticos como quinonas, hidroquinonas e fenóis. Esta característica das fibras tem sido responsável pelo grande interesse no seu uso como material eletródico para o desenvolvimento de novos eletrodos quimicamente modificados e de biossensores.

As propriedades resumidas no parágrafo acima, que foram brevemente discutidas, motivaram o desenvolvimento deste trabalho, utilizando fibras de carbono como material eletródico na construção de sensores e biossensores. Tendo como objetivo estudar as propriedades das fibras de carbono pré-tratadas com óxido de titânio(IV) e sua aplicação na determinação simultânea de isômeros de fenóis, bem como construção de um biossensor para salicilato e sua determinação em amostras clínicas e de medicamentos.

I.7. REFERÊNCIAS

1. Savage, G.; "Carbon-Carbon Composite", Chapman & Hall, London, 1992.
2. Edmonds, T. E.; "Electroanalytical Applications of Carbon Fibre Electrodes" *Anal. Chim. Acta* **1985**, 175,1.
3. Sherwood, P. M. A.; "Surface Analysis of Carbon and Carbon Fibre for Composites" *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, **1996**, 81, 319.
4. Liedtke, V. e Hüttinger, K. J.; "Mesophase Pitches as Matrix Precursor of Carbon Fibre Reinforced Carbon: I. Mesophase Pitch Preparation and Characterization", *Carbon* **1996**, 34, 1057.
5. Beinborn, K. M.; Müller, M. e Hüttinger, K. J.; "The Significance of the Fibre Coating in the Production of Carbon Fibre-Reinforced Carbons from HT Carbon Fibres I. Poly(dimethylsiloxane) and Poly(methylphenylsiloxane) Coatings", *Carbon* **1995**, 33, 1029.
6. Piquero, T.; Vincent, H.; Vicent, C. e Bouix, J.; "Influence of Carbide Coatings on the Oxidation Behavior of Carbon Fibres", *Carbon* **1995**, 33, 455.
7. Rooke, M. A. e Sherwood, P. M. H.; "X -Ray Photoelectron Spectroscopy Study of the Effect of Ion Etching of Silicon Carbide on a Carbon Fibre", *Carbon* **1995**, 33, 375.
8. Edie, D.; "The Effect of Processing on the Structure and Properties of Carbon Fibre", *Carbon*, **1998**, 36, 345.
9. Huang, Y. e Young, R. J.; "Effect of Fibre Microstructure Upon the Modulus of Pan- and Pitch-Based Carbon Fibre", *Carbon* **1995**, 33, 97.
10. Mochida, I.; Yoon, S.-H.; Takano, N.; Fortin, F.; Korai, Y. e Yokogawa, K.; "Microstructure of Mesophase Pitch-Based Carbon Fibre and its Control", *Carbon* **1996**, 34, 941.
11. Gardner, S. D.; Singanamsetty, C. S. K.; Booth, G. L.; He, G.-R. e Pittman, C. U.; "Surface Characterization of Carbon Fibres Using Angle-Resolved XPS and ISS", *Carbon* **1995**, 33, 587.
12. Donnet, J. B. e Ehrburger, P.; "Carbon Fibre in Polymer Reinforcement", *Carbon* **1977**, 15,143.

13. Biniak, S.; Dzielendziak, B. e Siedlewski, J.; "The Electrochemical Behavior of Carbon Fibre Electrodes in Various Electrolytes. Double-Layer Capacitance", *Carbon* **1995**, 33, 1255.
14. Zielke, U.; Hüttinger, K. J. e Hoffman, W. P.; "Surface-Oxidized Carbon Fibers: I. Surface Structure and Chemistry", *Carbon* **1996**, 34, 983.
15. Jennings, V. J.; Dodson, A. e Eastman, R. J.; "The Use of Vitreous Carbon and Carbon Fibre Electrodes for the Coulometric Generation of Iodine", *Anal. Chim. Acta* **1975**, 76, 143.
16. Armstrong-James, M. e Millar, J.; "Carbon-fiber Micro-electrodes", *J. Neurosci. Meth.* **1979**, 1, 279.
17. Ponchon, J. L.; Cespuglio, R.; Gonon, F.; Jouvet, M. e Pujol, J. F., "Normal Pulse Polarography with Carbon Fibre Electrodes for *in Vitro* and *in Vivo* Determinations of Catecholamines", *Anal. Chem.* **1979**, 51, 1483.
18. Csöregi, E.; Gorton, L. e Marko-Varga, G.; "Carbon Fibres as Electrode Materials for the Construction of Peroxidase-Modified Amperometric Biosensors", *Anal. Chim. Acta* **1993**, 273, 59.
19. Suárez-Fernández, A.; Alames-Varela, G. e Costa-García, A.; "Electrode Kinetic Studies of β -Carotene in Aprotic Solvents with Carbon Fiber Microelectrodes", *Electrochim. Acta* **1999**, 44, 4489.
20. Alames-Varela, G.; Suárez-Fernández, A.; e Costa-Garcia, A.; "Formation of Mercury-Coated Carbon Fiber Microelectrodes in Aprotic Media: Application to the Voltammetric Study of Vitamin K₁", *Electrochim. Acta* **1998**, 44, 763.
21. Wightman, R. M.; "Microvoltammetric Electrodes", *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1125A.
22. Pons, S. e Fleischmann, M.; "The Behavior of Microelectrodes", *Anal. Chem.*, **1987**, 59, 1391A.
23. Wightman, R. M.; "Voltammetry with Microscopic Electrodes in New Domains", *Science* **1988**, 240, 415.
24. Wightman, R. M. e Wipf, D. O.; "Voltammetry at Ultramicroelectrodes", *Electroanal. Chem.* **1989**, 15, 267.
25. Gunasingham, H. e Fleet, B.; "Hydrodynamic Voltammetry in Continuous-flow Analysis", *Electroanal. Chem.* **1990**, 16, 89.

26. Bond, A. M.; Oldham, K. B. e Zoski, C. G.; "Steady-State Voltammetry", *Anal. Chim. Acta* **1989**, 216, 177.
27. Stojek, Z.; "New Possibilities in Analytical Chemistry Connected with Voltammetric Applications of Microelectrodes", *Mikrochim. Acta* **1991**, II, 353.
28. Murty, A. S. N.; "Electrochemical Studies at Ultramicroelectrodes" *Ind. J. Chem.* **1992**, 31A, 633.
29. Bond, A. M.; "Past, Present and Future Contributions of Microelectrodes to Analytical Studies Employing Voltammetric Detection", *Analyst*, **1994** 119, R1
30. Correia, A. N.; Mascaro, L. H.; Machado, S. A. S.; Mazo, L. H. e Avaca, L. A.; "Ultramicroeletrodos. Parte I: Revisão Teórica e Perspectivas", *Quim. Nova*, **1995**, 18, 475.
31. Silva, S. M.; Alves, C. R.; Correia, A. N.; Martins, R. M., Nobre, A. L. R.; Machado, S. A. S.; Mazo, L. H. e Avaca, L. A.; "Ultramicroeletrodos. Parte II: Construção e Aplicações", *Quim. Nova*, **1998**, 21, 78.
32. Ju, H. X.; Dong, L. e Chen, H. Y.; "Amperometric Determination of Lactate Dehydrogenase Based on a Carbon Fiber Microelectrode Modified Covalently with Toluidine Blue O by Acylation", *Talanta* **1996**, 43, 1177.
33. Wu, H.M., Olier, R.; Jarffrezic-Renault, N.; Clechet, P., Nyamsi, A. e Martelet, C.; "Covalent Immobilization of Glucose Oxidase onto Graphitic Electrodes", *Electrochim. Acta* **1994**, 39, 327.
34. Pei, J; Yu, N- T. e Li, X-Y.; "Electrocatalytic Detection of Biological Nitric Oxide at an Ultramicroelectrode Modified with an Electrodeposited CuPtCl₆ Film", *Anal. Chim. Acta* **1999**, 402, 145.
35. Agüi, L.; Gonzáles-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P. e Pingarrón, J. M.; "Continuous Monitoring of Amino Acids and Related Compounds with Poly(3-methylthiophene)-Coated Cylindrical Carbon Fiber Microelectrodes", *Anal. Chim. Acta* **1999**, 401, 145.
36. Sun, W.; Xue, J.; Chen, J.; Mao, L.; Jin, L.; Yamamoto, K.; Tao, S. e Jin, J.; "Measurement of Dioxygen by Electrocatalytic Redution on Microelectrodes Modified with Nafion and Methyl Viologen", *Talanta* **1999**, 49, 345.
37. Mitchell, K. M. e Michaelis, E.; "Multimembrane Carbon Fibre Electrodes for Physiological Measurements of Nitric Oxide", *Electroanalysis* **1998**, 10, 81.

38. Park, K.; Tran, P. H.; Chao, J. K. T.; Ghodadra, R.; Rangarajan, R. e Thakor, N.; "In Vivo Nitric Oxide Sensor Using Non-Conducting Polymer –Modified Carbon Fiber", *Biosens. Bioelectron* **1998**, 13, 1187.
39. Villeneuve, N.; Bedioui, F.; Voituriez, K.; Avaro, S. e Vilaine, J. P.; "Electrochemical Detection of Nitric Oxide Production in Perfused Pig Coronary Artery: Comparison of the Performances of Two Electrochemical Sensors", *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **1998**, 40, 95.
40. Fabre, B.; Bulet, S.; Cespuglio, R. e Bidan, G.; "Voltammetric Detection of NO in Rat Brain with an Electronic Conducting Polymer and Nafion® Bilayer – Coated Carbon Fibre Electrode", *J. Electroanal. Chem* **1997**, 426,75.
41. Zhang, X; Ogoverc, B.; Rupnik, M.; Kreft, M. e Zorec, R.; "Cathophoresis Paint Insulated Carbon Fibre Ultramicro Disc Electrode and its Application to In Vivo Amperometric Monitoring of Quantal Secretion from Single Rat Melanotrophs", *Anal. Chim. Acta* **1999**, 378, 135.
42. Mao, L.; Jin, J.; Song, L.; Yamamoto, K e Jin, L; "Electrochemical Microsensor for In Vivo Measurements of Oxygen Based on Nafion and Methylviologen Modified Carbon Fiber Microelectrode", *Electroanalysis* **1999**, 11, 499.
43. Rivot, J.-P.; Sousa, A.; Montagne-Clavel, J. e Bessen, J. –M.; "Nitric Oxide (NO) Release by Glutamate and NMDA in the Dorsal Horn of the Spinal Cord: an In Vivo Electrochemical Approach in the Rat", *Brain Res.* **1999**, 821,101.
44. Stamford, J. A. e Justice Jr., J. B.; "Probing Brain Chemistry", *Anal. Chem.* **1996**, 359A.
45. Gerhardt, G.; Ksir, C.; Pivik, C; Dickinson, S. D.; Sabeti, J e Zahniser, N. R.; "Methodology for Coupling Local Application of Dopamine and Other Chemicals with Rapid In Vivo Electrochemical Recordings in Freely-Moving Rats", *J. Neurosci. Meth.* **1999**, 87, 67.
46. Koh, D-S. e Hille, B.; "Rapid Fabrication of Plastic-Insulated Carbon –Fiber Electrodes for Micro-Amperometry", *J. Neurosci. Meth.* **1999**, 88, 83.
47. Zhou, Z e Misler, S.; "Amperometric Detection of Quantal Secretion from Patch-Clamped Rat Pancreatic β -Cells", *J. Biol. Chem.* **1996**, 270, 270.
48. Edmonds, T. E.; Palshis, E. M. e Rushton, P.; "Practical Application of Carbon Fibre Electrodes", *Analyst* **1988**, 113, 705.

49. Schulte, A. e Chow, R. H., "Cylindrically Etched Carbon-Fiber Microelectrodes for Low -Noise Amperometric Recording of Cellular Secretion", *Anal. Chem.* **1998**, 70, 985.
50. Jagner, D.; Renman, L e Wang, Y.; "A Novel Batch Electrode Design for Use in Stripping Potentiometry Facilitating Medium Exchange", *Electroanalysis* **1992**, 4, 267
51. Baur, J. E., Miller, H. M. e Ritchason, M. A.; "Diffusional Interaction Between Closely Spaced Dual Microelectrodes", *Anal. Chim. Acta* **1999**, 397, 123.
52. Fungaro, D. A. e Brett, C. M. A.; "Microelectrode Arrays: Application in Batch-Injection Analysis", *Anal. Chim. Acta.* **1999**, 385, 257.
53. Zhang X. J.; Wang, J.; Ogorevc, B. e Spichiger U. E., "Glucose Nanosensor Based on Prussian-Blue Modified Carbon-Fiber Cone Nanoelectrode and an Integrated Reference Electrode", *Electroanalysis* **1999**, 11, 945.
54. Furbee, Jr., J. W. e Kuwana, T. e Kelly, R. S.; "Fractured Carbon Fiber-Based Biosensor for Glucose", *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1575.
55. Tamiya, E.; Sugiura, Y.; Navera, E. N.; Mizoshita, S.; Nakajima, K.; Akiyama, A. e Karube, I.; "Ultramicro Acetylcholine Sensor Based on an Enzyme-Modified Carbon-Fiber Electrode", *Anal. Chim. Acta* **1991**, 251, 129.
56. Shram, N. F.; Netchiporouk, L. I.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N.; Bonnet, C. e Cespuglio, R. ; "In Vivo Voltammetric Detection of Rat Brain with Carbon Fiber Microelectrode Coated with Lactate Oxidase", *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2618.
57. Pariente, F.; Hernández, L.; Abruña, H. D. e Lorenzo, E.; "Alkaline Phosphate-Modified Carbon Fibre Disc Microelectrode for Determination of 4-Aminophenyl Phosphate", *Anal. Chim. Acta* **1993**, 273, 187.
58. Pantano, P. e Kuhr, W. G.; "Dehydrogenase-Modified Carbon-fiber Microelectrodes for the Measurement of Neurotransmitter Dynamics. 2. Covalent Modification Utilizing Avidin-biotin Technology", *Anal. Chem.* **1993**, 65, 623.
59. Csörgi, E.; Gorton, L; Marko-Varga, G; Tüdös A. J. e Kok, W. T.; "Peroxidase-Modified Carbon Fiber Microelectrodes in Flow-Through Detection of Peroxide and Organic Peroxides", *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3604.

60. Csöregi, E.; Gorton, L e Marko-Varga, G; "Amperometric Microbiosensors for Detection of Hydrogen Peroxide and Glucose Based on Peroxidase-Modified Carbon Fibers", *Electroanalysis* **1994**, 6, 925.
61. Shaw, B. R.; "Electrochemistry Past And Present", ACS, London, 1988.
62. Ju, H.; Xun, Y. e Chen, H.; "Heterogeneous Catalytic at a Methylene Blue/Nafion[®] Modified Carbon Fiber Microcylinder Electrode", *J. Electroanal. Chem.* **1995**, 380, 283.
63. Chen, H.-Y.; Ju, H.-X. e Xun, Y.-G.; "Methylene Blue/Perfluorosulfonated Ionomer Modified Microcylinder Carbon Fiber Electrode and Its Application for the Determination of Hemoglobin", *Anal. Chem.* **1994**, 66, 4538.
64. Karabinas, P.; "Inert Film on Electrodes. Electrochemical Properties of Carbon Fibre Electrodes Modified by α - and β -naphthol Electropolymerization", *Can. J. Chem.* **1990**, 68, 302.
65. Ju, H; Sun, H. e Chen, H.; "Properties of Poly- β -aminoanthraquinone Modified Carbon Fiber Electrode as a Basis of Hemoglobin Biosensors", *Anal. Chim. Acta.* **1996**, 327, 125.
66. Akiyama, A.; Kato, T.; Ishii, K. e Yasuda, E.; "In Vitro Measurement of Dopamine Concentration with Carbon Fiber Electrode", *Anal. Chem.* **1985**, 57, 1518.
67. Zhang, X.; Ogorevc, B.; Tavcar, G. e Svegl, I. G.; "Over-oxidized Polypyrrole-modified Carbon Fibre Ultramicroelectrode with an Integrated Silver/Silver Chloride Reference Electrode for Selective Voltammetric Measurement of Dopamine in Extremely Small Sample Volumes", *Analyst* **1996**, 121, 1817.
68. Xu, H. -T.; Kitamura, F.; Ohsaka, T. e Tokuda, K.; "Simultaneous Determination of Dopamine and Ascorbic Acid with Poly(3-methylthiophene)/Polypyrrole Bilayer-Coated Carbon Fiber Electrodes", *Anal. Sci.* **1994**, 10, 399.
69. Zen, J.-M. e Chen, I.-L.; "Voltammetric Determination of Dopamine in the Presence of Ascorbic Acid at a Chemically Modified Electrode", *Electroanalysis* **1997**, 9, 537.
70. Chen, H.-Y.; Yu, A.-M. e Zhang, H.-L.; "Electrocatalytic Oxidation of Dopamine at the Polyglycine Chemically Modified Carbon Fiber Bundle Electrode and Its

- Voltammetric Resolution with Uric Acid", *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, 358, 863.
71. Downard, A. J.; Roddick, A. D. e Bond, A. M.; "Covalent Modification of Carbon Electrodes for Voltammetric Differentiation of Dopamine and Ascorbic Acid"; *Anal. Chim. Acta* **1995**, 317, 303.
72. Nakzato, T. e Akiyama, A.; "High-speed Voltammetry: Dual Measurement of Dopamine and Sertonin", *J. Neurosci. Meth.* **1999**, 89, 105.
73. Bergstrom, B. P. e Garis, P. A.; "Utility of a Tripolar Stimulating Electrode for Eliciting Dopamine Release in the Rat Striatum", *J. Neurosci. Meth.* **1999**, 87, 201.
74. Yavich, L.; "A New Technique for Measuring the Temporal Characteristics of the Carbon Fibre Microelectrodes in *In Vivo* Voltammetry at Millisecond time Intervals", *J. Neurosci. Meth.* **1999**, 84, 29.
75. Tuzhi, P.; Guoshun, W.; Huiping, L.; Baoen, S.; Guoqing, L. e Yuping, C.; "*In Vivo* Voltammetric Determination of Neurotransmitters with Simply Activated and Modified Carbon Fibre Electrodes", *Anal. Lett.* **1995**, 28, 395.
76. Daws, L.C.; Toney, G. M., Davis, D. J.; Gerhardt, G. A. e Frazer, A.; "*In Vivo* Chronoamperometric Measurements of the Clearance of Exogenously Applied Serotonin in the Rat Dentate Gyrus", *J. Neurosci. Meth.* **1997**, 78, 139.
77. Kruk, Z. L; Cheeta, S. e Milla, J.; "Real Time Measurement of Stimulated Dopamine Release in the Conscious Rat Using Fast Cyclic Voltammetry: Dopamine Release is not Observed During Intracranial Self Stimulation", *J. Neurosci. Meth.* **1998**, 79, 9.
78. Hernández P.; Sánchez, I.; Patón, F. e Hernández, L.; "Cyclic Voltammetry Determination of Epinephrine with a Carbon Fiber Ultramicroelectrode", *Talanta* **1998**, 46, 985.
79. Xin, Q. e Wightman, R. M.; "Simultaneous Detection of Catecholamine Exocytosis and Ca^{2+} Release from Single Bovine Chromaffin Cells Using a Dual Microsensor", *Anal. Chem.* **1998**, 70, 1677.
80. Cahill, P. S. e Wightman, R. M.; "Simultaneous Amperometric Measurement of Ascorbate and Catecholamine Secretion from Individual Bovine Adrenal Medullary Cells", *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2599.

81. Ewing, A. G.; Strein, T. G. e Lau, Y. Y.; "Analytical Chemistry in Microenvironments: Single Nerve Cells", *Acc. Chem. Res.* **1992**, 25, 440.
82. Janda, P.; Weber, J.; Dunsch, L. e Lever, A. B. P.; "Detection of Ascorbic Acid Using a Carbon Fiber Microelectrode Coated with Cobalt Tetramethylpyridoporphyrzine", *Anal. Chem.* **1996**, 68, 960.
83. Gao, Z.; Ivaska, A.; Zha, T.; Wang, G; Li. P e Zhao, Z; "Voltametric and Amperometric Determination of Ascorbic Acid at a Chemically Modified Carbon Fibre Microelectrode", *Talanta* **1993**, 40, 399.
84. Pontie, M.; Lecture, H. e Bedioui, F.; "Improvement in the Performance of a Nickel Complex- Based Electrochemical Sensor for the Detection of Nitric Oxide in Solution", *Sens. Actuators B* **1999**, 56, 1.
85. He, Y.-N. e Chen, H.-Y.; "Differential Pulse Adsorptive Anodic Stripping Voltametric Determination of Pipemidic Acid in Tablets at a Carbon Fiber Microdisk Electrode", *Electroanalysis* **1997**, 9, 1426.
86. Malone, M. A.; García, A. C.; Blanco, P. T. e Smyth, M. R.; "Phase-Selective Alternating Current Adsorptive Stripping Voltammetry of Aminopterin on a Mercury Thin Film Carbon Fibre Ultramicroelectrode", *Analyst* **1993**, 118, 649.
87. Hernández, P.; Paton, F.; Ballesteros, Y. e Hernández, L.; "Voltammetry Study of Zeatin in a Carbon Fiber Ultramicroelectrode. Determination by Adsorptive Stripping", *Electroanalysis* **1997**, 9, 235.
88. Wang, J. Cai, X.; Fernandes, R. J.; Grant, D. H. e Ozsoz, M. "Carbon Fiber Microelectrodes for Adsorptive Stripping Analysis of Trace Nucleic Acids", *J. Electroanal. Chem.* **1998**, 441, 167.
89. Hayes, M. A.; Kristensen, E. W. e Kuhr, W. G.; Background-Subtraction of Fast-Scan Cyclic Staircase Voltammetry at Protein-Modified Carbon-Fiber Electrodes", *Biosens. Bioelectron.* **1998**, 13, 1297.
90. Agüí, L.; López-Guzmán, J. E.; Gonzáles-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P. e Pingarrón, J. M.; "Analytical Performance of Cylindrical Carbon Fiber Microelectrodes in Low-Permittivity Organic Solvents: Determination of Vanillin in Ethyl Acetate", *Anal. Chim. Acta* **1999**, 385, 241.
91. Ju, H.; Zhou, J.; Cai, C. e Chen, H.; "The Electrochemical Behavior of Methylene Blue at a Microcylinder Carbon Fiber Electrode", *Electroanalysis* **1995**, 7, 1165.

92. Ju, H.; Dong, L. e Chen, H.; "Electrochemical Behavior of Toluidine Blue o Covalently Modified Microcylinder Carbon Fiber Electrode and Amperometric Determination of Hemoglobin in Whole Blood", *Anal. Lett.* **1996**, 29, 587
93. Netchiporouk, L. I.; Shulga, A. A.; Jaffrezic-Renalut, N.; Martelet, C.; Olier, R. e Cespuglio, R.; "Properties of Carbon-fiber Microelectrodes as a Basis for Enzyme Biosensors", *Anal. Chim. Acta* **1995**, 303, 275.
94. Karube, I.; Yokoyama, K. e Tamiya, E.; "Microbiosensors for Acetylcholine and Glucose", *Biosens. Bioelectron.* **1993**, 8, 219.
95. Agüí, M. L.; Reviejo, A. J.; Yáñez-Sedeño, P. e Pigarrón, J. M.; "Analytical Applications of Cylindrical Carbon Fiber Microelectrodes. Simultaneous Voltammetric Determination of Phenolic Antioxidants in Food", *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2195.
96. Ceballos, C. e Fernández, H.; "The Electroanalytical Determination of Antioxidants in Corn Oil Using Ultramicroelectrodes", *J. Braz. Chem. Soc.* **1995**, 6, 1.
97. Agüí, L.; Yáñez-Sedeño, Y. e Pingarrón, J.M.; "Analytical Applications of Poly(3-methylthiophene)-Coated Cylindrical Carbon Fiber Microelectrodes", *Electroanalysis* **1997**, 9, 468.
98. Fung, Y. S. e Mak, J. L. L.; "Application of Carbon Fibre Microelectrode for Studying the Impact of Pesticides on a Frog's Egg", *Electrochim. Acta* **1999**, 44, 3855.
99. Denisova, A. E. e Kalanova, O. L.; "Constant-Potential Coulometric Determination of Cadmium Using a Carbon Fiber Electrode", *Anal. Chem.* **1994**, 49, 553.
100. Nyholm, L. e Wikmark G.; "Microelectrodes for Anodic Stripping Voltammetry Prepared by Heat Sealing Thin Fibres or Wires in a Polypropylene Matrix", *Anal. Chim. Acta* **1992**, 257, 7
101. Nyholm, L. e Wikmark G.; "Anodic Stripping Voltammetry of Copper at ex Situ-Formed Mercury-Coated Carbon Fibre Microelectrodes in the Presence of Low Concentrations of Supporting Electrode", *Anal. Chim. Acta* **1993**, 273, 41
102. Feldman, B. J.; Osterloh, J. D.; Hata, B. H. e D'Alessandro, A.; "Determination of Lead in Blood by Square Wave Anodic Stripping Voltammetry at a Carbon Disk Ultramicroelectrodes", *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1983

103. Alarnes-Varela, G. e Costa-García, A.; "Determination of Gold by Anodic Stripping Voltammetry with Carbon Fiber Ultramicroelectrodes", *Electroanalysis* **1997**, *9*, 1262.
104. Díaz-Cruz, M.S.; Grabaric, B. S.; Grabaric, Z.; Esteban, M. e Casassas, E.; "Optimisation of Resolution Function in Signals Ratio Method and Deconvolution by Polynomial Division –Quantitation of Cd (II) and In (II) from Their Global Signal Obtained at Carbon Fibre Disk Ultramicroelectrode", *Anal. Chim. Acta*, **1999**, *382*, 105.
105. Edmonds, T. E. e Guoliang, J.; "Carbon Fibre Micro-Electrodes in the Differential Pulse Voltammetry of Copper Ions", *Anal. Chim. Acta* **1983**, *151*, 99.
106. Silva, S. M.; Alves, C. R.; Machado, S. A. S.; Mazo, L. H. e Avaca, L. A.; "Electrochemical Determination of Nitrites in Natural Waters with Ultramicroelectrodes", *Electroanalysis* **1996**, *8*, 1055.
107. Whited, B. L.; Motsegood, P. N. e Baur, J. E.; "Separation of Cyclic Nitroxide Free Radicals and Their Redox Forms with Dual Microelectrochemical Detection", *J. Chromatogr.A* **1997**, *771*, 89.
108. Hagen, J. J.; Washco, K. A. e Monnig, C. A., "Determination of Retinoids by Reversed-Phase Capillary Liquid Chromatograph with Amperometric Electrochemical Detection"; *J. Chromatogr.B* **1996**, *677*, 225.
109. Siddiqui, A. e Shelly, D. C.; "Amperostatic-Potentiometric Detection for Micro High-Performance Liquid Chromatography"; *J. Chromatogr. A* **1995**, *691*, 55.
110. Shen, H.; Lada, M. W. e Kennedy, R. T. "Monitoring of Met-enkephalin *In Vivo* with 5-min Temporal Resolution Using Microdialysis Sampling and Capillary Liquid Chromatography with Electrochemical Detection"; *J. Chromatogr. B* **1997**, *704*, 43.
111. Jin, W.; Weng, Q. e Wu, J.; "Determination of Bovine Serum Albumin by Capillary Zone Electrophoresis with End-column Amperometric Detection at the Carbon Fiber Microdisk Array Electrode", *Anal. Chim. Acta* **1997**, *342*, 67.
112. You, T.; Wang, X.; Yang, X. e Wang E.; "End-Column Amperometric Detection of 5-Fluorouracil by Capillary Zone Electrophoresis with a Carbon Fiber Microelectrode", *Anal. Lett.* **1999**, *32*, 1109.

113. You, T.; Yang, X. e Wang E.; "End-Column Amperometric Detection of Aesculin and Aesculetin by Capillary Electrophoresis", *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 401, 29.
114. You, T.; Yang, X. e Wang E.; "Applications of Microelectrodes in Capillary Electrophoresis/Electrochemical Detection", *Electroanalysis* **1999**, 11, 459.
115. Chen, M.-C. e Huang, H.-J.; "An Electrochemical Cell for End-Column Amperometric Detection in Capillary Electrophoresis", *Anal. Chem.* **1995**, 67, 4010.
116. You, T.; Wu, M. e Wang, E.; "Determination of Hydroxylamine by Capillary Electrophoresis-Electrochemical Detection with a Palladium-Particle Modified Carbon Microdisk Array Electrode", *Anal. Lett.* **1997**, 30, 1025.
117. Jin, W.; Wei, H. e Zhao, X.; "Determination of Adenine and Guanine by Capillary Zone Electrophoresis with End-Column Amperometric Detection at a Carbon Fiber Microdisk Array Electrode", *Electroanalysis* **1997**, 9, 770.

Capítulo II

II. PRÉ-TRATAMENTO DAS SUPERFÍCIES DAS FIBRAS DE CARBONO

II. 1. INTRODUÇÃO

Em aplicações eletroquímicas o comportamento eletroquímico do material usado é de suma importância, pois muitas das características do sensor ou biossensor desenvolvido estão fortemente dependentes das características do material eletródico usado.

Assim como nos outros tipos de materiais de carbono, a reversibilidade dos processos eletroquímicos das fibras de carbono depende muito das características de sua superfície. Neste aspecto as fibras de carbono possuem a desvantagem de possuir comportamento eletroquímico pouco reversível. Na tentativa de solucionar este problema, ou seja, melhorar a velocidade de transferência de elétrons e desta forma suas características de resposta, vários tipos de pré-tratamentos já foram propostos para preparar as fibras ou eletrodos já confeccionados antes de sua utilização. Estes tratamentos incluem mudanças nos grupos funcionais contidos na superfície, na estrutura cristalográfica da superfície e na rugosidade da superfície, os quais podem envolver procedimentos químicos e/ou eletroquímicos^{1- 9}, térmicos^{10, 11}, plasma¹³, e de polimento, entre outros tipos. Estes procedimentos podem ser denominados de pré-tratamentos de ativação de superfície.

É válido mencionar que estes procedimentos de pré-tratamento também são utilizados quando se deseja utilizar as fibras de carbono na fabricação de compósitos. Um exemplo é o pré-tratamento através de anodização em solução, utilizado para obter uma adesão adequada de resinas epoxi¹². A melhor adesão é obtida porque a oxidação eletroquímica cria superfícies nas fibras de carbono que poderiam ser derivatizadas por aminas polifuncionais ou polímeros. No caso dos eletrodos de fibras de carbono, os mais usados são os procedimentos eletroquímicos e químicos, ou ainda a mistura destes.

II. 1.1. Pré tratamento eletroquímico e químico

De maneira geral os tratamentos eletroquímicos são realizados a um potencial constante^{1, 2, 14, 15}, ou por voltametria cíclica¹⁶. Com relação aos potenciais constantes, estes podem ser positivos ou negativos, os quais resultam em um aumento da área superficial da fibra¹⁶.

Dos procedimentos descritos na literatura que fazem uso das ferramentas eletroquímicas, cita-se: o uso de soluções de KH_2PO_4 e NaOH , aplicando um potencial de 2,0 V vs SCE (eletrodo de calomelano saturado), por 60 s¹⁴; ou ainda em KNO_3 1% peso, aplicando correntes na ordem de 0,1 a 1,0 A entre 60 e 90 min¹⁵.

Os pré-tratamentos químicos geralmente são realizados através da imersão das fibras de carbono em meios fortemente ácidos e/ou oxidantes. Os agentes oxidantes mais usados são: ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico e peróxido de hidrogênio. Várias densidades de grupos funcionais são produzidas em função do tempo de reação. O tratamento oxidativo além de produzir sítios ativos pela formação de grupos funcionais, também aumenta a rugosidade da superfície e a área superficial⁴.

Os tratamentos químicos às vezes são realizados apenas para minimizar problemas resultantes de compostos que são usados para que os fios das fibras permaneçam juntos e promova resistência à abrasão durante o enovelamento no processo de fabricação. O pré tratamento é feito através de refluxo em solventes como, por exemplo, metanol⁵.

De maneira geral os pré-tratamentos químicos ou eletroquímicos tendem a aumentar os grupos funcionais contendo oxigênio sobre a superfície das fibras de carbono, ou seja, possuem efeito oxidativo. Logo, é válido mencionar os estudos feitos por Frysz e colaboradores¹⁰ com objetivo de explicar os efeitos da oxidação no comportamento eletroquímico das fibras de carbono, embora estes estudos foram feitos com fibras oxidadas termicamente. A Figura II.1 mostra 4 possíveis caminhos que podem explicar a melhora na resposta eletroquímica das fibras de carbono. Caminho (1) implica que a melhora do comportamento eletroquímico é devida somente ao aumento da exposição dos planos de borda e sítios

defeituosos; no caminho (2) o aumento dos planos de borda e sítios defeituosos resulta em um aumento da quantidade do oxigênio quimicamente adsorvido na superfície. O simples aumento do oxigênio quimicamente adsorvido pode melhorar a performance eletroquímica diretamente (2), ou resultar no caminho (3), no qual o aumento do oxigênio quimicamente adsorvido induz uma redução na tensão superficial do eletrólito e então resulta em melhora da atividade eletroquímica. No Caminho (4), o aumento dos planos de borda e sítios defeituosos resulta em uma tensão superficial reduzida, o qual então produz uma melhora na resposta eletroquímica.

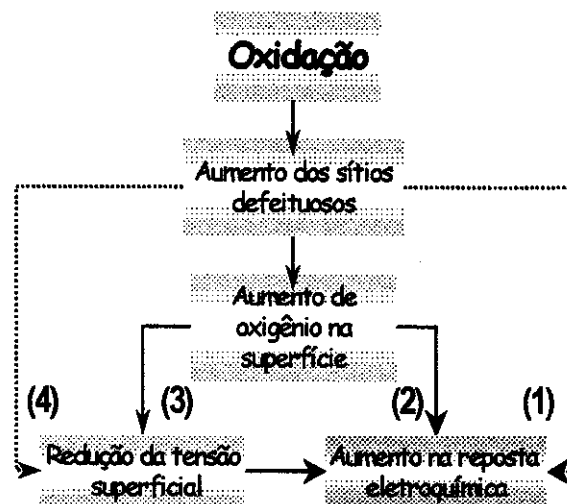


Figura - II.1: Esquema proposto para explicar o efeito da oxidação na resposta eletroquímica.

Yue e colaboradores¹ também realizaram alguns estudos para mostrar as mudanças que ocorrem nas superfícies das fibras de carbono. Neste caso, a oxidação das fibras de carbono foi realizada eletroquimicamente, e estes estudos foram realizados através de medidas de área superficial e por espectroscopia fotoeletrônica de raio-X (XPS). Por meio destes estudos, Yue e colaboradores mostraram que; a oxidação eletroquímica aumenta a atividade da superfície por gerar maior área superficial *via* formação de poros e por introdução de grupos polares contendo oxigênio sobre os poros formados na superfície das fibras. Os poros formados na oxidação eletroquímica são extremamente pequenos (ultramicroporos). Os estudos de XPS confirmaram que o grupo mais produzido na oxidação da superfície é COOH. Os grupos contendo C-OH e carbonila não aumentam com oxidação eletroquímica, mais exibem um pequeno decréscimo.

Uma super oxidação das fibras por uma intensa oxidação eletroquímica causa uma perda de peso; esta perda é aproximadamente proporcional à carga

aplicada na fibra. Uma progressiva perda de peso ocorre com a evolução de CO_2 . Os átomos dos sítios ativos na superfície da fibra são oxidados para formar grupos na superfície contendo oxigênio com C-OH , C=O , COOH e finalmente CO_2 . Estes grupos, bem como um simplificado mecanismo de progressão para oxidação da superfície, podem ser visualizados na Figura II.2:

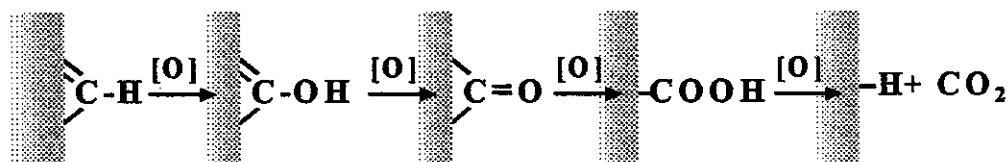


Figura - II.2 – Mecanismo simplificado de oxidação da superfície de fibras de carbono

A descarboxilação parcial com resultante perda de peso conduz ao aumento da área superficial e da rugosidade. A estrutura morfológica muda continuamente durante a oxidação e evolução de CO_2 , o que produz um aumento da área superficial devida ao contínuo desenvolvimento dos ultramicroporos.

Finalizando, pode-se observar que, dos estudos realizados por Yue e colaboradores¹ e Frysz e colaboradores¹⁰, a melhora na resposta eletroquímica através da oxidação (eletroquímica ou não) está sempre relacionada ao aumento do número de grupos funcionais contendo oxigênio e aumento dos poros. O que muda é o mecanismo com que ocorrem os processos.

Muitos dos métodos citados acima requerem etapas complexas, longo tempo de preparação e geralmente não são eficazes, e dependendo do processo de fabricação das fibras de carbono, os problemas de reprodutibilidade são ainda mais críticos. Este é o motivo pelo qual se tem interesse no desenvolvimento de novas alternativas que possam ser aplicadas no pré-tratamento das fibras de carbono, motivo este que levou ao desenvolvimento de uma nova metodologia rápida, simples e eficaz para o pré-tratamento de fibras de carbono, cujo desenvolvimento é descrito a seguir.

II. 2. EXPERIMENTAL

II.2.1. Reagentes e Materiais

Fibras de carbono tipo PAN T- 800 "sized" com 8 μm de diâmetro foram adquiridas das Indústrias Toray INC, Tóquio-Japão. Tetracloreto de titânio (99,9 % Aldrich, Milwaukee, - WI- USA), tetracloreto de carbono, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Merck-Darmstadt-Alemanha) e KNO_3 (Nuclear – São Paulo – Brasil). Todos os reagentes foram de grau analítico.

II.2.2. Medidas Eletroquímicas

O sistema utilizado nas medidas eletroquímicas constituiu-se de 3 eletrodos: eletrodo saturado de calomelano (SCE), como referência; fio de platina como auxiliar; eletrodo de fibra de carbono como trabalho. Este sistema foi conectado a um potenciostato modelo MQPG da Microquímica (Florianópolis – Brasil), acoplado a um microcomputador para aquisição dos dados e controle de potencial. As soluções foram desoxigenadas com borbulhamento de nitrogênio por 10 min antes das medidas. O hexacianoferrato foi utilizado como espécie eletroativa.

II.2.3. Micrografia de varredura eletrônica

As microscopias de varredura eletrônica (SEM) das fibras de carbono tratadas e não tratadas foram obtidas, usando um microscópio eletrônico ISI Modelo 100 A (Santa Clara, CA).

II.2.4. Tratamento das fibras de carbono

Um bulbo de fibras de carbono (Toray – T800) foi imerso em água destilada durante 10 min e então mergulhado em uma solução de tetracloreto de titânio (diluída em tetracloreto de carbono) por 60 min, nas concentrações de 1:20, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1 e 1:0 (v:v). No passo seguinte, as fibras de carbono foram secas a 70

°C por 1 h, logo após lavadas, cuidadosamente, com grande quantidade água destilada. Finalmente as fibras foram secas a 70 °C por 1 h.

II.2.5. Construção dos eletrodos

Após o tratamento das fibras, os eletrodos foram confeccionados conforme apresentado na Figura II.3. Cerca de 50 fibras foram inseridas em um tubo de polietileno de 1 mm de diâmetro e 20 mm de comprimento, deixando aproximadamente 5 mm de fibras expostas e selando a junção por aquecimento. O Contato elétrico foi feito com fio de cobre e pasta de carbono condutora (Leit-C condutive carbon cement, Neubauer Chemikalien), sendo este lado selado com resina epoxi (Araldite®, Brascola LTDA).

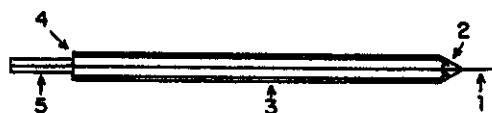


Figura - II.3 - Diagrama esquemático da preparação dos microeletrodos: 1- fibra de carbono, 2- junção da fibra de carbono com o fio condutor, 3- tubo de polietileno, preenchido com pasta de carbono condutora, 4- resina epoxi., 5- fio de cobre.

II. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com intuito de avaliar o comportamento eletroquímico das fibras de carbono pré-tratadas com TiCl_4 , realizou-se uma série de estudos, utilizando hexacianoferrato como espécie eletroativa.

II. 3. 1. Características da superfície

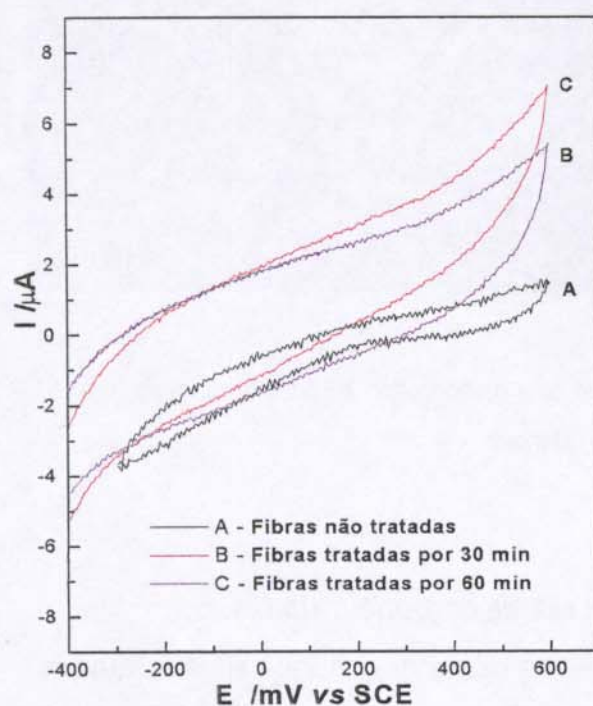


Figura II.4 - Voltamogramas cíclicos obtidos com fibras de carbono não tratadas (A) e fibras tratada 30 min (B), 60 min (C) com TiCl_4 concentrado em uma velocidade de

varredura de 100 mV s^{-1} , em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A varredura foi iniciada em -400 mV vs SCE .

A Figura II.4 mostra os voltamogramas cíclicos (VC) obtidos em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para fibras não tratadas (A), fibras tratadas por 30 min (B) e para aquelas tratadas por 60 min (C), com tetracloreto de titânio. O voltamograma obtido com fibras não tratadas apresenta uma baixa corrente capacitiva, indicando que a área superficial é pequena, porém quando a fibra de carbono é tratada a corrente capacitiva aumenta, sugerindo um aumento na área superficial.

Depois de tratadas as fibras de carbono, nenhuma mudança visual é observada. Entretanto, as micrografias (Figura II.5) obtidas com fibras não tratadas (II.5A) e tratadas com tetracloreto de titânio concentrado por 60 min (II.5B) mostram um aumento na área superficial após o tratamento. As fibras não tratadas apresentam uma superfície não rugosa, enquanto que as tratadas

apresentam alguns flocos, os quais devem ser agregados de dióxido de titânio dispersos sobre as fibras, aumentando assim a área superficial. O diâmetro da fibra aumenta cerca de 5 a 10 %, indicando que quantidade significativa de dióxido de titânio é depositada na superfície da fibra de carbono como uma camada dispersa.

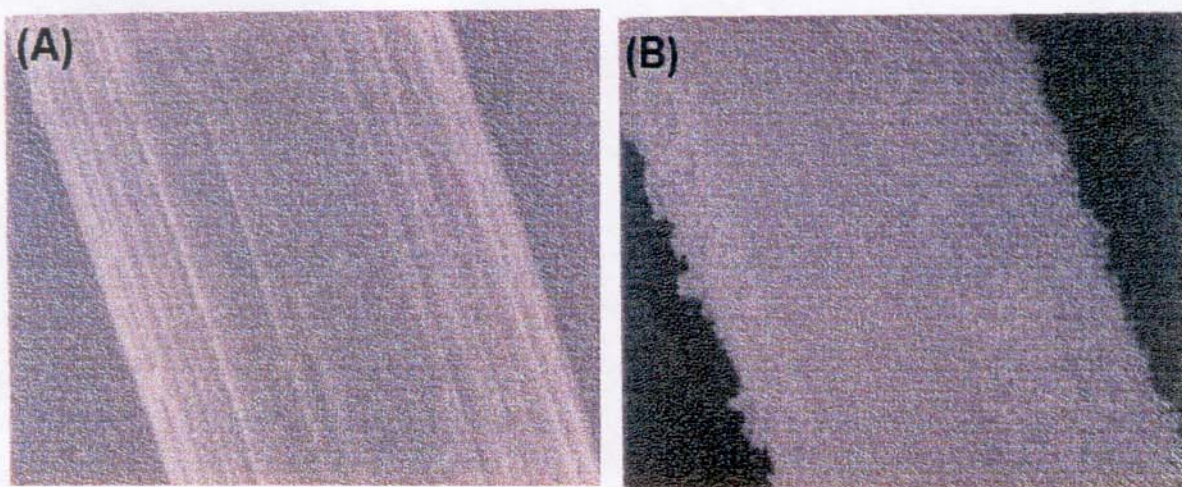


Figura II.5 - Microscopia de varredura eletrônica de uma fibra carbono tipo T-800. (A) não tratada e (B) tratada por 60 min (com TiCl_4 concentrado). Ampliação 15.000 vezes.

II. 3. 2. Características eletroquímicas das fibras de carbono tratadas.

Uma grande diferença eletroquímica entre as fibras tratadas e não tratadas pode ser verificada através voltamogramas cíclicos mostrados na Figura II.6, refletindo o comportamento do sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, obtidos com uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para fibras de carbono não tratadas, uma baixa corrente é observada, indicando uma eletroatividade baixa. Em contraste, quando foram usadas fibras tratadas com soluções de TiCl_4 com concentrações maiores que 1:5 (v:v), um aumento de corrente foi observado para a eletroquímica do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Um potencial formal (média dos potenciais dos picos anódico e catódico) de 182 mV vs SCE foi encontrado; este potencial é muito similar se comparado com aqueles observados quando eletrodos de platina ou carbono vítreo foram usados¹⁸. A razão de corrente, do pico anódico e

catódico, foi de aproximadamente 1,0 e a separação dos potenciais de pico foi de 62 mV para uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Isto indica que o processo redox na superfície das fibras de carbono tratadas é similar àquele observado para sistemas reversíveis¹⁸; este comportamento também foi observado quando o sistema foi avaliado com KNO_3 .

Embora uma maior corrente capacitiva é observada para fibras tratadas por 60 min (Figura II.4(C)) em relação às fibras tratadas por 30 min (Figura II.4(B)); na presença de espécies eletroativas uma melhor resposta é observada, como mostrado na Figura II.7. Isto sugere que a camada de óxido de titânio formada na superfície após 60 min de tratamento melhora as características eletroquímicas se comparadas com aquelas obtidas quando a fibras foram tratadas por 30 min.

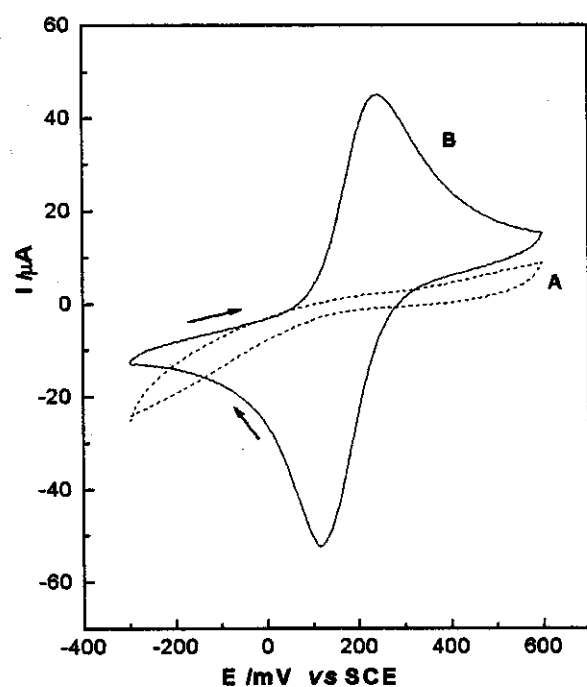


Figura- II.6 - VC obtidos com eletrodos de fibras de carbono não tratadas (A) e tratada (60 min (B)) com tetracloreto de titânio, com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito

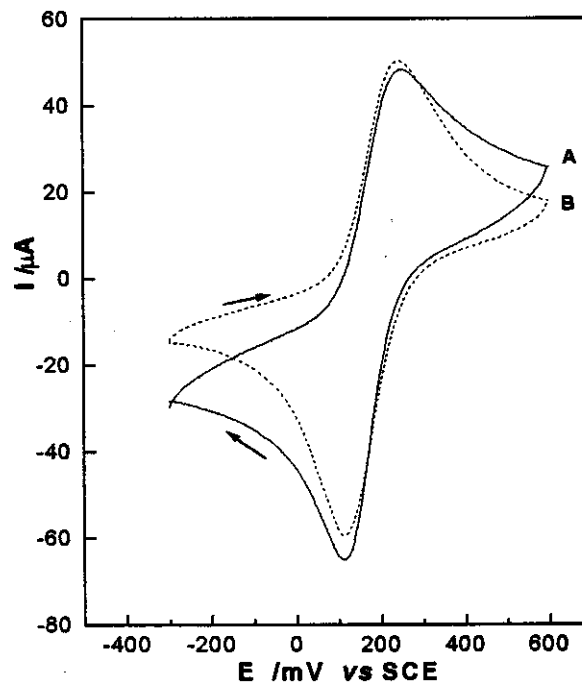


Figura – II.7 - VC obtidos com eletrodos de fibras de carbono tratadas (30 min (A)) e (60 min (B)), com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte.

A corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura possui uma dependência linear, Figura II.8. Os potenciais de pico anódico e catódico não variam entre as velocidades de varredura de 5 e 150 mV s^{-1} . Estes

dois fatos sugerem que o processo é controlado por difusão de forma similar àqueles observados por sistemas reversíveis¹⁹.

II. 3. 3. Efeito da concentração do TiCl_4 usado no tratamento das fibras

O uso de uma solução mais diluída de TiCl_4 para evitar um tratamento drástico das fibras de carbono foi investigado e o efeito é mostrado na Figura II.9. A separação dos picos nos voltamogramas cíclicos obtidos para o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em 50 mV s^{-1} aumenta exponencialmente quando a concentração da solução é inferior a 1:5 (v:v) de TiCl_4 e CCl_4 . Este comportamento sugere que a eletroatividade das fibras de carbono é melhorada pelo tratamento com soluções mais concentradas de tetracloreto de titânio.

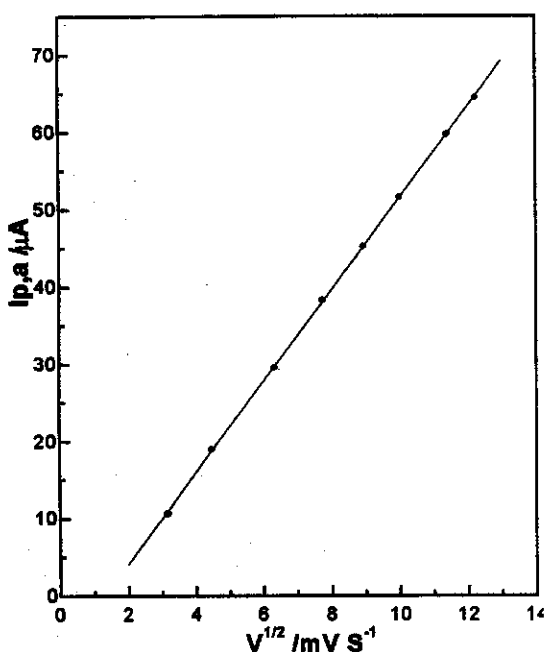


Figura - II.8 - Dependência da corrente pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura obtida em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte.

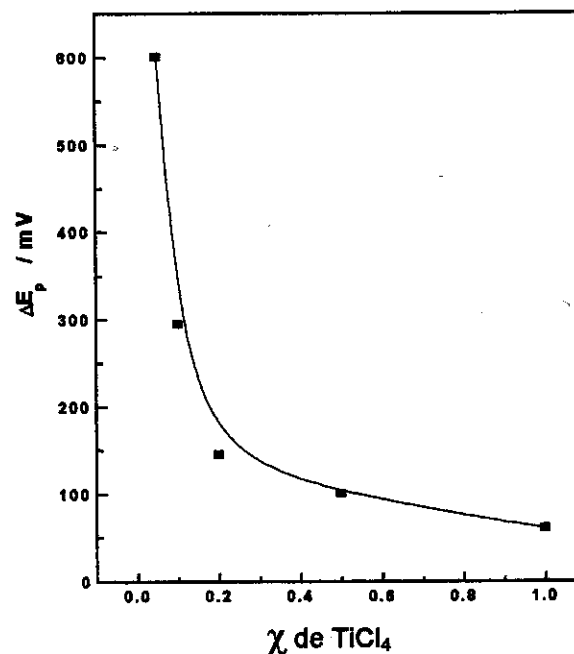


Figura - II.9 - Dependência da separação de pico em função da fração molar (χ) de TiCl_4 usado no pré-tratamento das fibras de carbono por 60 min. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , $\text{pH}=6$ e solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

II. 3.4. Efeito do pH da solução

O eletrodo mostrou um interessante comportamento em função da variação de pH, Tabela II.1. O potencial formal depende do pH da solução, apresentando menor valor em pH de aproximadamente 5,0 e 6,0 aumentando em valores de pH superiores e inferiores a 5,0. É muito interessante comparar este fato com a carga da superfície do óxido de titânio hidratado, o qual apresenta um ponto isoelétrico em pH de aproximadamente 5.6²⁰.

O aumento no potencial formal em pH básicos pode ser explicado pela carga da superfície do óxido de titânio, o qual se torna negativa, e a interação de espécies carregadas negativamente com a superfície do eletrodo é prejudicada. Em valores de pH abaixo de 5,0 o potencial formal é aumentado, provavelmente devido à protonação das espécies na forma reduzida, normalmente observado para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em solução^{21,22}.

Tabela II.1 – Potencial formal (E°) obtido para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em solução com diferentes valores de pH, usando fibras de carbono pré-tratadas como eletrodo de trabalho, com velocidade de varredura de 20 mV^{-1}

pH	$E^\circ \text{ mV versus SCE}$
2,2	229
3,0	194
4,3	188
5,1	181
6,0	182
7,2	190
8,2	204

II. 3. 5. Efeito da concentração da espécie eletroativa (hexacianoferrato)

A Figura II.10 (A) mostra os voltamogramas cíclicos obtidos com fibras de carbono tratadas com TiCl_4 não diluído durante 60 min, na presença de diferentes concentrações de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. A relação linear obtida entre a corrente de pico e a concentração (Figura II.10 (B)) mostra boa atividade para resposta eletroquímica. O potencial de pico é constante mesmo para soluções de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ mais concentradas, indicando que não há forte interação ou adsorção das espécies eletroativas na superfície da fibra.

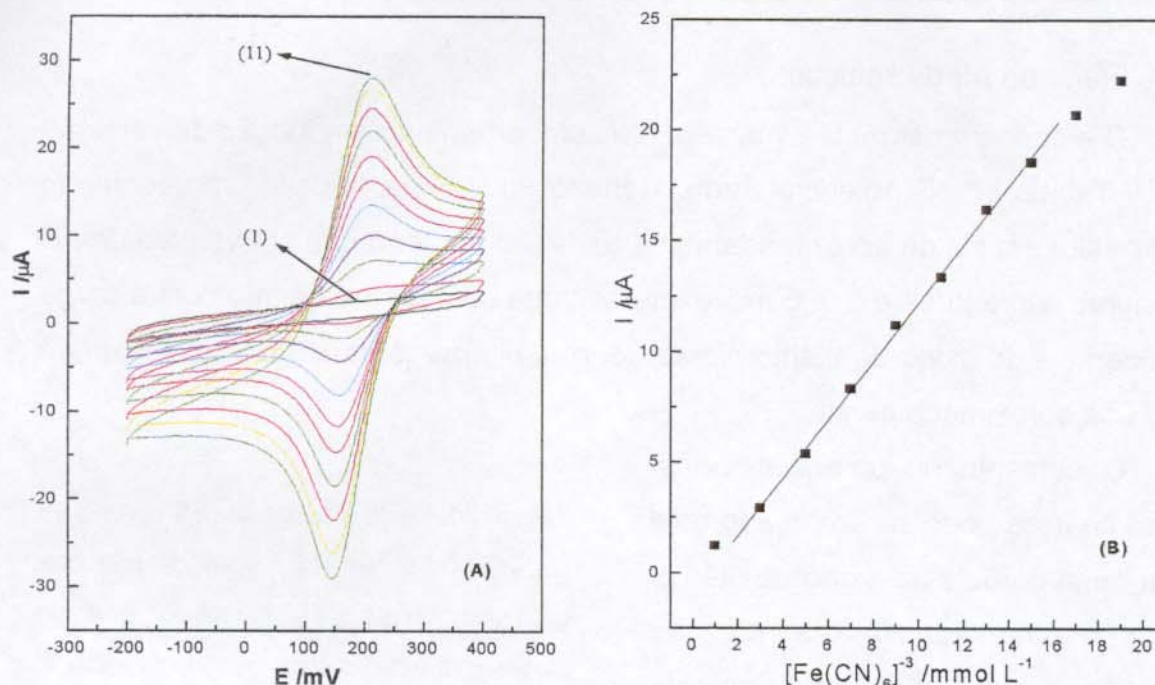


Figura - II.10 – (A) - Voltamogramas cíclicos obtidos com fibras tratadas com $TiCl_4$ não diluído por 60 min, com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} , em solução de $[Fe(CN)_6]^{3-}$ de diferentes concentrações e $KCl\ 0,1\text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte. - (1) branco, (2) 0,1; (3) 0,3; (4) 0,5; (5) 0,7; (6) 0,9; (7) 1,1; (8) 1,3; (9) 1,5; (10) 1,7 e (11) 1,9 mmol L⁻¹ de $[Fe(CN)_6]^{3-}$. **(B)** – Valores de corrente obtidos do gráfico (A) em função da concentração.

II. 3.6. Características e estabilidade das fibras pré-tratadas

As características do filme formado na superfície da fibra de carbono modificada com $TiCl_4$, bem como a atividade eletroquímica, foram estáveis por um longo período, aproximadamente 3 meses, mesmo em solução ácida ou neutra; porém, em soluções alcalinas ($pH > 9$), elas mostraram rápidas mudanças, provavelmente devido à solubilização da camada de óxido de titânio²³.

A estabilidade do eletrodo modificado foi testada com um mínimo de 500 ciclos. Em três meses, nenhuma mudança significativa foi observada. Uma pequena diferença na forma do pico foi observada quando o eletrodo foi estocado em solução aquosa por um dia, Figura II.11. Porém, quando o eletrodo foi seco

novamente, a resposta original retornou, mostrando grande estabilidade do filme de óxido de titânio disperso sobre a superfície da fibra de carbono.

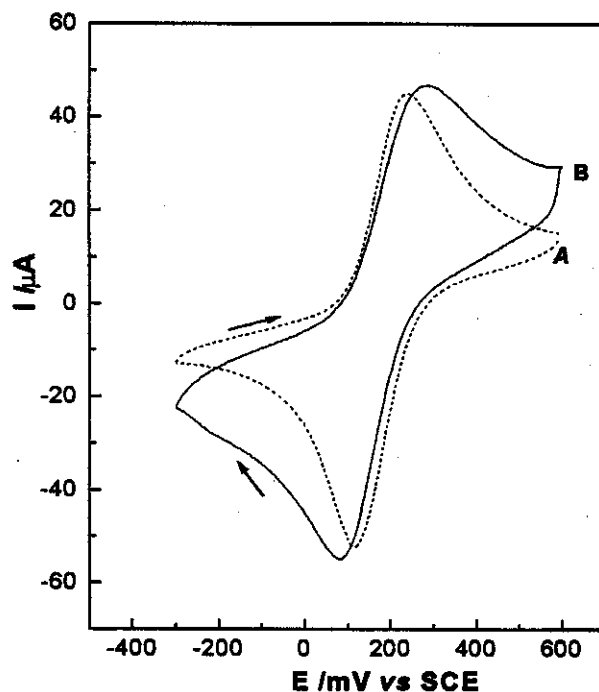


Figura II.11 - VC obtidos com fibras tratadas com diferentes tempos de imersão em água: (A) inicialmente e (B) após 25 h, com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito.

II. 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho mostraram um novo procedimento de pré-tratamento que torna as fibras de carbono mais eletroativas e com boa reprodutibilidade. A grande eficiência e sensibilidade obtida com este procedimento mostram um excelente potencial para preparação de eletrodos de fibra de carbono em uma forma reprodutível.

Aspectos como estabilidade, facilidade e simplicidade deste procedimento, além da possibilidade de imobilização de novos compostos sobre a superfície pré-tratada do eletrodo, tornam o procedimento descrito muito atrativo para uso em rotina.

A sensibilidade para outros analitos de interesse após o pré-tratamento é assunto de correntes investigações como também o uso destas fibras de carbono tratadas com TiCl_4 para desenvolvimento de novos sensores. Exemplo de aplicação destas fibras tratadas é descrito na parte seguinte deste trabalho.

II. 5. REFERÊNCIAS

1. Yue, Z. R.; Jiang, W.; Wang, L.; Gardner, S. D. e Pittman Jr., C. U.; "Surface Characterization of Electrochemical Oxidized Carbon Fibers"; *Carbon* **1999**, 37, 1785.
2. Pittman Jr, C. U.; Jiang, W.; Yue, Z. R.; Gardner, S. D.; Wang, L.; Roghiani, H. e Leon y Leon, C. A.; "Surface Properties of Electrochemically Oxidized Carbon Fibers "; *Carbon* **1999**, 37, 1797.
3. Pittman Jr.; He, G. R; Wu, B. e Gardner, S. D.; "Chemical Modification of Carbon Fiber Surfaces by Nitric Acid Oxidation Followed by Reaction with Tetraethylenepentamine", *Carbon* **1997**, 35, 317.
4. Wu, Z.; Pittman Jr., C. U. e Gardner, S. D.; "Nitric Acid Oxidation of Carbon Fibers and the Effects of Subsequent Treatment in Refluxing Aqueous NaOH", *Carbon* **1995**, 33, 597.
5. Andonoglou, P.P.; Jannakoudakis, A. D.; Jannakoudakis, P. D. e Theodoridou, E.; "Preparation and Electrocatalytic Activity of Rhodium Modified Pitch-Based Carbon Fiber Electrodes", *Electrochim. Acta* **1998**, 44, 1455.
6. Gardner, S. D.; Singamsetty, C. S. K.; Booth, G. L.; He, G. R.; Pittman Jr., C. U.; "Surface Characterization of Carbon Fibers Using Angle-Resolved XPS and ISS", *Carbon* **1995**, 33, 587.
7. Alexander, M. R. e Jones, F. R.; "Effect of Electrolytic Oxidation Upon the Surface Chemistry of Type a Carbon Fibres: III. Chemical State, Source and Location of Surface Nitrogen"; *Carbon* **1996**, 34, 1093.
8. OShea, T. J.; Garcia, A. C.; Blanco, P. T. e Smyth, M. R.; "Electrochemical Pretreatment of Carbon Fibre Microelectrodes for the Determination of Folic Acid"; *J. Electroanal. Chem.* **1991**, 307, 63.
9. Muntyanu, G. G.; "Effect of the Electrochemical Activation of a Cylindrical Carbon-Fiber Microelectrode on Its Electroanalytical Properties: Direct Voltammetry of Iron (III)"; *J. Anal. Chem.* **1998**, 53, 277.
10. Frysz, C. A.; Shui, X. P. e Chung, D. D. L.; "Effect of Chemisorbed Oxygen on the Electrochemical-Behavior of Graphite Fibers", *Carbon* **1994**, 32, 1499.

11. Muntyanu, G. G.; "Effect of the Electrochemical Activation of a Cylindrical Carbon-Fiber Microelectrode on Its Electroanalytical Properties: Stripping Voltammetry of Silver at Carbon Fibers Obtained at Different Temperatures"; *J. Anal. Chem.* **1998**, 53, 931.
12. Fukunaga, A.; Ueda, s. e Nagumo, M.; "Air-Oxidation and Anodization of Pitch-Based Carbon Fibers"; *Carbon* **1999**, 37, 1081.
13. Pittman Jr., C. U.; Jiang, W.; He, G. R. e Gardner, S. D.; "Oxygen Plasma and Isobutylene Plasma Treatments of Carbon Fibers: Determination of Surface Functionality and Effects on Composite Properties"; *Carbon*, **1998**, 36, 25.
14. Jin, W. R.; Weng, Q. F. e Wu, J. R.; "Determination of Bovine Serum Albumin by Capillary Zone Electrophoresis with End-column Amperometric Detection at the Carbon Fiber Microdisk Array Electrode", *Anal. Chim. Acta* **1997**, 342, 67.
15. Pittman Jr., C. U.; Jiang, W.; Yue, Z. R. e Leon y Leon, C. A.; "Surface Area and Pore Size Distribution of Microporous Carbon Fibers Prepared by Electrochemical Oxidation"; *Carbon* **1999**, 37, 85.
16. Gonon, F. G., Fombarlet, C. M.; Buda, M. J. e Pujol, J. F.; "Electrochemical Treatment of Pyrolytic Carbon Fiber Electrodes"; *Anal. Chem* **1981**, 53, 1386.
17. Furbee, Jr., J. W. e Kuwana, T. e Kelly, R. S.; "Fractured Carbon Fiber-Based Biosensor for Glicose", *Anal Chem.* **1994**, 66, 1575.
18. Kolthoff, J. M. e Tomsicek, W.J., "The Oxidation Potential of The System Potassium Ferrocyanide-Potassium Ferricyanide at Various Ionic Strengths"; *J. Phys. Chem.* **1935**, 39, 945.
19. Bard, A. J., Faulkner, L. R., "*Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*", John Wiley and Sons, New York, 1980, pp. 44-127.
20. Strelko, V.V., Khainakov, S.A., Kvashenko, A.P., Belyakov, V.N. e Bortun, A.I., "Sorption of Chromium (VI) Ions by Hydrated Titanium and Zirconium Dioxides"; *J. Appl. Chem. USSR* **1988**, 66, 1922.
21. Davidson, D., "Oxidation-Reduction Potentials of the Pentacyano-Ferroates"; *J. Am. Chem. Soc.*, **1928**, 50, 2622.

22. Hanania, G.I.H., Irvine, D. H., Eaton, W.A. e George, P., "Thermodynamic Aspects of the Potassium Hexacyanoferrate (III) –(II), System. II. Reduction Potential"; *J. Phys. Chem.* **1967**, 71, 2022.
23. Kubota, L. T., Gushiken, Y., Castro, S. e Morreira, J. C., "Preparation and Characterization of Ti (IV) Oxide Grafted Onto Silica on a Silica Gel Surface"; *Colloids Surf.* **1991**, 57,11.

Capítulo III

III. UTILIZAÇÃO DE FIBRAS DE CARBONO PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.

III. 1. INTRODUÇÃO

A determinação de compostos fenólicos é de interesse em diversos campos, como: controle ambiental¹, neuroquímico²⁻⁵, farmacêutico⁶ e clínico⁷.

Na maior parte dos trabalhos descritos na literatura a determinação de catecol e hidroquinona⁸ é realizada fazendo uma separação, química e ou física, prévia. Esta estratégia é muito importante, porém o tempo e os reagentes consumidos, bem como os rejeitos produzidos são geralmente altos nestas análises. Então, o desenvolvimento de novas metodologias que possibilitam a determinação sem a necessidade de uma separação prévia destes compostos é um assunto de extrema relevância.

Compostos fenólicos, como hidroquinona (1,4 di-hidroxi-benzeno) e catecol (1,2 di-hidroxi-benzeno), tem como estrutura básica OH ligados a anel benzênico, que são eletroquimicamente ativos em eletrodos de platina ou carbono⁸. O uso das fibras de carbono mostra vantagens, devido às suas pequenas dimensões (5 - 15 μm), que possibilitam a construção de ultramicroeletrodos, que possuem características bastantes peculiares, como já descrito nos parágrafos anteriores. A resposta destes eletrodos são extremamente rápidas (menos de 1 s), permitindo varreduras rápidas⁹⁻¹¹. Problemas de queda ôhmica associados com o uso destes eletrodos em meio resistente a passagem de corrente são mínimos¹². Estes fatos são de grande importância prática porque possibilita o uso de ultramicroeletrodos cilíndricos em medidas eletroquímicas em meios resistivos e de volumes pequenos, como por exemplo: a monitoração e quantificação de neurotransmissores em vesículas localizadas nos neurônios¹²⁻¹⁷, e outros experimentos *in vivo*¹⁸⁻²⁰, etc.

Uma razoável metodologia experimental para determinação simultânea destes isômeros fenólicos em uma mistura binária, sem separações prévias, pode ser feita principalmente por voltametria de pulso diferencial (DPV), usando eletrodo de carbono ou eletrodos de fibras de carbono²¹.

O princípio químico do método proposto é a redução eletroquímica das estruturas quinonas presentes no catecol (1,2 di-hidroxi-benzeno) e hidroquinona (1,4 di-hidroxi-benzeno)⁶, quando oxidados, na superfície do eletrodo de fibra de carbono modificado com TiCl_4 . A determinação destes compostos pode ser feita sem uma modificação complexa da superfície das fibras de carbono, somente um simples pré-tratamento para aumentar a repetibilidade e a sensibilidade. O pré-tratamento é necessário para aumentar a sensibilidade devido à melhora na transferência de elétrons²² e provavelmente minimizar a passivação do eletrodo causada por produtos da oxidação de compostos fenólicos oxidados.

Os picos voltamétricos (obtidos com eletrodos de carbono ou eletrodos de fibras de carbono), que correspondem a oxidação e redução destes isômeros (catecol e hidroquinona) são, em muitos casos, sobrepostos. Além disso, a competição dos isômeros fenólicos pela superfície do eletrodo torna a relação entre a resposta voltamétrica e a concentração dos isômeros, em uma mistura, não-linear. Estes dois aspectos atuando simultaneamente tomam muito difícil ou impossível modelar este sistema por métodos de calibração univariada. Uma alternativa para resolver estes problemas é a aplicação de métodos de calibração multivariada, em que todo o voltamograma é considerado, mas não somente a corrente de pico característica nos potenciais de oxidação ou redução de cada isômero na mistura²³. Entre os métodos de calibração multivariada que são possíveis aplicar nestes casos, pode-se citar: PLS²⁴, redes neurais²⁵ e, mais recentemente, rede neural com apodização²⁶.

Os aspectos citados acima e a necessidade do desenvolvimento de métodos que possibilitam a determinação simultânea de compostos fenólicos, de maneira simples, econômica e rápida, motivaram a utilização de eletrodos de fibras de carbono pré-tratadas com TiCl_4 , utilizando voltametria de pulso diferencial (DPV), através da aplicação de PLS e redes neurais.

III. 1. 1. Aspectos Teóricos

Nos últimos anos, o número de aplicações de redes neurais para modelar dados correlacionados à química analítica tem mostrado um considerável aumento e diversificação^{26, 28}. Estes dados podem ser modelados em curvas de calibração não linear^{28, 30}, em reconhecimento de modelos³¹, em análise de multicomponentes³² e em processos on-line controlados em tempo real^{32, 34}. Este fato é possível devido à habilidade das redes neurais artificiais em modelar dados, em relações lineares e não lineares, entre variáveis dependentes e independentes.

Redes neurais são compostas por unidades básicas, chamadas de neurônios, que processam as informações, os quais são arranjados em linhas ou camadas²⁵. Uma rede neural artificial tem sempre uma camada de entrada (input) e uma camada de saída (output); e entre elas pode haver um número variável de camadas escondidas (internas). A disposição e o número de neurônios por camada são chamados de arquitetura da rede neural. A entrada pode ser qualquer sinal multivariado como: medida de corrente em diferentes potenciais, absorvâncias em diferentes comprimentos de onda, etc. As saídas ou respostas da rede neural são variáveis independentes como concentrações, as quais a rede neural será treinada, em um processo típico de calibração.

A resposta ou saída, $\hat{Y}$, de uma rede neural, na qual n_i são os neurônios de entrada, ou uma camada escondida com n_h neurônios e um neurônio de saída, para um vetor x , de entrada, pode ser escrita como:

$$\hat{Y} = \sum_{j=1}^{n_h} W_j f \left(\sum_{i=1}^{n_i} w_{ji} x_i + b_j \right) + B \quad (\text{Eq.1})$$

onde f é uma função de transferência linear, sigmoidal ou uma tangente hiperbólica; b_j e B são "bias" do modelo e w_{ji} e W_j são os pesos das camadas escondidas e de saída, respectivamente. Neste estudo, os vetores de entrada são os "scores" dos voltamogramas e as saídas são as concentrações de catecol e hidroquinona na mistura binária.

Uma vez estimado os valores pela rede neural, que é a saída da rede neural, o erro de calibração (E), definido como a soma dos quadrados

resultante da diferença entre o valor estimado pela rede e o valor esperado, pode ser calculado, usando a equação 2:

$$E(W) = \sum_{i=1}^m (Y - \hat{Y})^2 \quad (\text{eq.2})$$

onde Y é o valor real, $\hat{Y}$ é o valor da saída da rede neural e m o número de usadas para treinar a rede neural artificial. Após obtido o valor da saída da rede neural, o próximo passo é corrigir os pesos das camada até o erro (E) ser minimizado, o qual pode ser feito através da retropropagação de erros³⁵ ou por meio do método de Marquardt-Levenberg^{36, 37}.

No método da retropropagação, o processo de correção dos pesos é iniciado na última camada e segue em direção a primeira camada, por isso é chamado de método da retropropagação. A equação para os pesos pode ser escrita como:

$$\Delta W_{ji}^l = \eta \cdot \delta_j^l \cdot out^{l-1} + \mu \cdot \Delta W_{ji}^{previo} \quad (\text{eq.3})$$

De acordo com a equação, a correção do peso (ΔW_{ji}^l) é composta pela soma de dois termos que atuam em conjunto para minimizar os erros de previsão. O primeiro termo ($\eta \cdot \delta_j^l \cdot out^{l-1}$) é basicamente o método do gradiente descendente, quando ele é aplicado para redes. A essência deste método é fazer correções em direções opostas àquelas indicadas pelo gradiente (δ_j^l) da superfície de erros. O parâmetro η , chamado de velocidade de treinamento é introduzido para corrigir os pesos, uma maneira de evitar a correção excessiva principalmente no fim do processo iterativo, quando as partes principais dos pesos já foram corrigidas e uma correção excessiva pode afetar as correções já feitas. O parâmetro out^{l-1} é a camada de saída anterior. No segundo termo ($\mu \cdot \Delta W_{ji}^{previo}$), a constante μ , camada de momento, substitui o peso "ótimo" obtido no primeiro termo, forçando que o erro seja avaliado neste novo peso. Este termo minimiza a possibilidade da convergência para um mínimo local, porque um alto erro indica que o mínimo obtido no primeiro termo foi realmente global; em caso positivo, o mínimo foi local e a procura pelo mínimo continua.

Resumindo, o segundo termo atua como artifício de segurança para o primeiro termo, evitando o mínimo local.

No segundo método de treinamento, os pesos são otimizados através de uma variável do método de Gauss-Newton^{36,37}, conhecido como método de Marquardt-Levenberg. O ajuste do peso neste caso é feito através da Eq. 4.

$$\Delta W = (J^T J + \lambda I)^{-1} \nabla E \quad (\text{Eq.4})$$

onde J é a matriz Jacobiana de erros para cada um dos pesos, λ é um escalar não negativo, I é a matriz identidade e E é o vetor de erros dado pela equação 2. O método de Marquardt-Levenberg pode ser visto como um procedimento intermediário entre o método de Gauss-Newton e o método do gradiente descendente. Quando λ assume valores elevados ($\lambda \rightarrow \infty$) o método do gradiente descendente é obtido e quando λ assume valores pequenos ($\lambda \rightarrow 0$), obtém-se o método de Gauss-Newton. Neste trabalho foi usado o método de Marquardt-Levenberg que é mais rápido na convergência e mais robusto.

O objetivo do procedimento de treinamento é encontrar um conjunto ótimo de pesos possíveis e "bias" que a rede produzirá previsões ($\hat{Y}$) tanto quanto possível similar à saída (outputs) conhecida (Y), minimizando a função erro $E(W, w)$. A correção dos pesos finais é feita quando o erro (E) atinge um critério de convergência estabelecido. Neste ponto, a rede neural artificial é completamente treinada e é possível avaliar as propriedades de generalização da rede neural se adotar outro grupo, um conjunto de validação de dados diferentes daqueles usado na calibração. Entretanto, em alguns casos, a rede neural artificial, após treinamento, poderá demonstrar baixos erros em um conjunto de calibração e altos erros para o conjunto de validação. Isto ocorre devido uma quantidade excessiva de neurônios aplicados na camada escondida, o que é chamado de ajuste excessivo (overfitting).

O número de neurônios da camada interna é similar ao número de componentes principais usado na regressão de componentes principais³⁸ (PCR) ou o número de componentes de ordem polinomial usado na regressão polinomial³⁹. Contudo, para evitar um ajuste excessivo é fundamental otimizar

a quantidade de neurônios da camada interna. O número apropriado de neurônios na camada interna pode ser determinado pelo treinamento da rede neural com diferentes números de neurônios na camada interna, calculando o % SEC (% dos erros quadráticos de calibração) e % SEP (% dos erros quadráticos de previsão). Então, a configuração que apresentar baixos erros de previsão e calibração poderá ser escolhida. Um outro método muito usado para otimização é a rede com apodização.

III. 1. 1. 1. Rede neural com apodização

A idéia básica deste método é iniciar a rede neural com um excessivo número de neurônios na camada interna e durante o passo de treinamento cortar todos os pesos (W) que tem influência desprezível no erro E . Os neurônios com todas suas conexões cortadas são apagados da rede. Então somente aqueles usados no modelo serão considerados. A técnica de apodização⁴⁰ realmente reduz a complexidade da rede neural, melhora sua habilidade de previsão porque evita o uso de modelos com excessivo número de neurônios

Há dois métodos de Redes Neurais com Apodização, o "Optimal Brain Damage"⁴¹ (OBD) e o "Optimal Brain Surgeon"⁴² (OBS). Em ambos os métodos, as conexões (ou pesos) são cortadas e a variação correspondente no erro E , chamada de saliência⁴³, é avaliada. No primeiro método, os cortes nas conexões ocorrem durante o passo de treinamento e a rede neural é treinada novamente. Já no método de OBS, as conexões são treinadas após cada corte, permitindo que novos cortes sejam feitos. Conseqüentemente, no método OBS, a rede neural é retreinada, ajustando-se os erros treinados por uma função quadrática para certificar um mínimo possível. Em outras palavras, no método de OBS, um termo de regularização⁴⁴ é adicionado na função erro, que é dada pela equação 2, com respeito a função custo ($C(W)$), a qual pode ser escrita na forma genérica como:

$$C(w) = E(w) + Dw^2 \quad (\text{Eq.5})$$

O termo de regularização induz o processo de apodização e assegura a estabilidade numérica do método, simplesmente punindo os pesos com baixos valores através da matriz regularização D . O próximo passo é expandir a função custo em série de Taylor até o segundo termo, ao redor de um possível valor de peso mínimo W_0 , como se segue:

$$c(w) \cong c(w_0) + (\nabla^2 E(w) + 2Dw)(w - w_0) + \frac{1}{2}(\nabla^2 E(w) + D)(w - w_0)^2 \quad \text{Eq.6}$$

já que a expansão foi quadrática em torno de um possível mínimo, o segundo termo da eq.4 torna-se nulo, então a função custo pode ser escrita como:

$$c(w) = c(w_0) + \frac{1}{2}(\nabla^2 E(w) + D)(w - w_0)^2 \quad \text{Eq.7}$$

ou de forma equivalente:

$$C(w) = c(w_0) + \frac{1}{2} \delta w^T H \delta w \quad \text{Eq.8}$$

onde $\delta W = W - W_0$ e $H = (A + D)$, é a matriz Hessiana⁴⁶ com o termo de regularização. A é a matriz derivada segunda do erro de treinamento $(\partial^2 E / \partial w^2)$ contendo todas as derivadas de segunda ordem. Após esta fase, os pesos devem ser eliminados e a função custo minimizada. A eliminação do peso j^{th} pode ser expresso como:

$$\delta W^T e_j = -W_0^T e_j \quad \text{Eq.9}$$

onde e_j é o vetor unitário j^{th} . A eliminação do peso e simultânea minimização da função custo pode ser obtida aplicando método do multiplicador de Lagrange⁴⁶

$$\tilde{C}_j(W) = C(W) + \lambda (\delta W + W_0)^T e_j \quad \text{Eq.10}$$

onde λ é o multiplicador de Lagrange. Resolvendo a equação acima, pode se obter as variações nos pesos os quais minimizam simultaneamente.

$$\delta W = -\lambda H^{-1} e_j \quad \text{Eq.11}$$

Neste passo é possível retomar a equação 5, para explicitar $E(W)$ e obter a variação do erro na função peso, como mostrado na equação 12:

$$\delta E(w) = A \delta w^2 - Dw_0 \delta w \quad \text{Eq.12}$$

Neste ponto substitui-se o δW pelo valor obtido na equação 7 e obtém-se a seguinte equação para saliência:

$$\delta E_j(W) = \lambda W_0 D H^{-1} e_j + \frac{1}{2} \lambda^2 e_j^T H^{-1} (\nabla^2 E + D) H^{-1} e_j \quad \text{Eq.13}$$

Quando D é zero, a equação 13 reduz a equação obtida por Hassib-Stork para o cálculo da saliência. A equação de saliência (Eq. 13) fornecerá um critério matemático para os cortes de conexão que poderão ocorrer com simultânea minimização de erros.

Utilizando métodos de calibração multivariada, juntamente com a voltametria de pulso diferencial, propõe-se uma nova metodologia que tem como objetivo a determinação de isômeros fenólicos (catecol e hidroquinona). Para tanto faz-se uso de um eletrodo de fibras de carbono pré-tratadas com óxido de titânio, como sensor.

III. 2. EXPERIMENTAL

III.2.1. Reagentes e Materiais

1,4 di-hidroxi-benzeno (hidroquinona - HQ), 1,2 di-hidroxi-benzeno (catecol - CC) e tris(hidroximetil)aminometano (TRIS-HCL) foram obtidos da Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Araldite® adquirido da Brascola LTDA (Brasil); pasta de carbono condutiva (Leit-C) adquirida da Neubauer Chemikalien; fibras de carbono tipo T800, com 8 µm de diâmetro adquiridas das Indústrias Toray INC. (Tóquio – Japão) e tubos de polietileno. Todos os reagentes foram de grau analítico.

III.2.2. Preparação dos eletrodos

Para o preparo dos eletrodos utilizou-se fibras de carbono pré-tratadas com tetracloreto de titânio, seguindo o procedimento descrito na primeira parte deste trabalho²², bem como a construção dos eletrodos.

III.2.3. Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas também foram realizadas usando um sistema clássico de 3 eletrodos, e um potenciostato Autolab (modelo PGSTAT20 - Netherlands), conectados a um microcomputador para controle de potencial e aquisição de dados.

As medidas foram realizadas utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial, utilizando 5 mL de uma solução contendo catecol (CC) ou hidroquinona (HQ), ou a mistura CC/HQ. Os parâmetros utilizados na varredura voltamétrica foram os seguintes:

- potencial aplicado: 500 a -300 mV;
- amplitude de pulso: 25 mV
- velocidade de varredura: 10 mV s⁻¹;

III.2.4. Otimização da concentração do eletrólito de suporte e pH

Para assegurar a melhor resolução dos picos, foram investigados: a influência da concentração do eletrólito de suporte (TRIS-HCL) e pH. A

influência da concentração foi estudada no intervalo de 0,005 a 0,25 mol L⁻¹ e a influência do pH entre 5,0 e 8,0.

III.2.5. Conjunto de dados

As amostras utilizadas na determinação simultânea de catecol e hidroquinona foram sintéticas, resultante de um planejamento fatorial⁴⁷. O conjunto de amostra foi preparado no limite de concentração de $1,0 \cdot 10^{-4}$ – $6,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, resultando em um total de 121 amostras. Porém, as misturas com altas concentrações de catecol e hidroquinona saturavam o eletrodo, ou seja, não apresentaram diferenças significativas em seus respectivos voltamogramas. Logo estas amostras foram removidas, restando um total de 81 amostras.

É valido ressaltar que, para estipular o intervalo de concentração que foi usado no planejamento fatorial, foi considerado a faixa de concentração linear em que o eletrodo responde para cada analito ($1,0 \cdot 10^{-4}$ – $6,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹). Porém, quando se tem a mistura, há um “somatório” nas concentrações que muda até mesmo o limite de saturação.

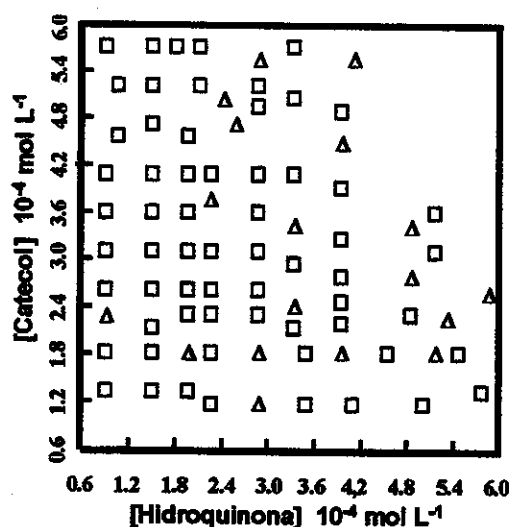


Figura III.1- Diagrama do planejamento fatorial das misturas de catecol e hidroquinona

□ - amostras usadas na calibração
 ▽ - amostras usadas na validação

As amostras foram preparadas a partir de alíquotas de soluções estoques de catecol e hidroquinona, as quais foram adicionadas em 5 mL solução de TRIS-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 6,0, sendo as diluições consideradas e então corrigidos para os valores das concentrações, Figura III.1.

III.2.6. Seleção das Amostras

O conjunto de dados foi dividido em 2 subconjuntos, um para calibração e outro para validação do modelo, com 63 e 18 amostras, respectivamente. A seleção das amostras para os subconjuntos (calibração e validação) foi feita através da análise das componentes principais (PCA), graficando os "scores" da primeira componente principal (PC1) *versus* a segunda componente principal (PC2), que representa 93% da variância dos dados, como mostrado na Figura III.2. A separação dos conjuntos de calibração e validação foi realizada através da seleção homogeneia das amostras, de cada um dos quadrantes da Figura III.2.

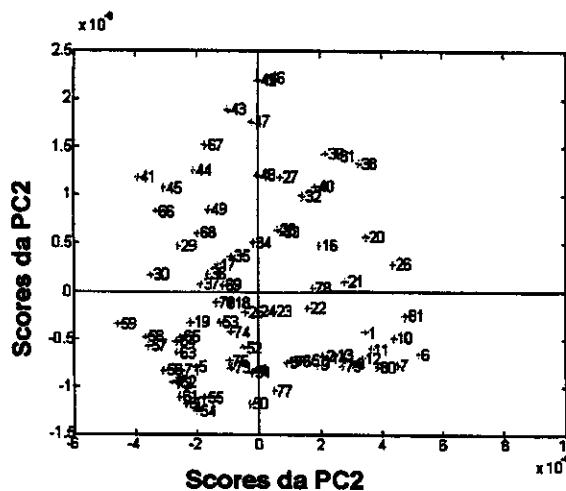


Figura- III.2- Gráfico dos scores da PC1 vs. Scores da PC2.

III.2.7. Processamento dos dados

Antes do passo de calibração os dados foram comprimidos através da análise das componentes principais (PCA) e o ruído foi reduzido por um filtro de transformada de Fourier^{48, 49}.

No modelo construído com rede neural com apodização 15 das componentes principais foram empregadas, as quais explicaram 95 % da variância dos dados. O número extra de PC terá seus pesos cortados, sem variação significativa no erro de calibração.

A minimização do ruído nos voltamogramas foi realizada antes da aplicação dos métodos de modelagem, empregando uma transformada de Fourier⁵⁰⁻⁵², dada pela equação 14. Para obter os voltamogramas representados no domínio de frequências (w), a transformada de Fourier direta foi aplicada para obter o espectro de frequências $F(w)$ dos voltamogramas.

$$F(w) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(E) e^{iEw} dE \quad \text{Eq. 14}$$

Na equação 14, E representa o potencial elétrico e $f(E)$ o voltamograma.

Após obtido o espectro de frequência do sinal analítico, as frequências altas são eliminadas pois, na maioria dos casos, as frequências altas estão associadas com o ruído instrumental.

Finalmente, a transformada de Fourier inversa é aplicada, dada pela equação 15, e o sinal original (voltamogramas) é recuperado com o ruído minimizado.

$$f(E) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} F(w) e^{-iEw} dw \quad \text{Eq. 15}$$

III.2.8. Avaliação da performance do modelo

O desempenho relativo dos diferentes modelos, para cada isômero, foi avaliado em termos da raiz média quadrática dos erros de previsão (% RMSEP), em relação ao desvio padrão das concentrações do conjunto de previsão, definido como:

$$\%RMSEP = \frac{1}{S_p} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_p} (y_i - \hat{y}_i)^2}{n_p}} \times 100 \quad \text{Eq.16}$$

onde S_p é o desvio padrão das concentrações e n_p é o número de amostras usadas no conjunto de calibração. O valor conhecido é y_i e $\hat{y}_i$ é o valor previsto para os diferentes modelos empregados.

III.2.9. Programas

Os programas usados para rede neural com apodização foram obtidos da "Network based System Identification Toolbox"⁵⁰ para uso com MatLab®. Os cálculos de PLS e PCA foram através das ferramentas do PLS (Toolbox)⁵¹ para uso com MatLab®. O programa para redução de ruído através da transformada de Fourier foi implementado utilizando sub-rotinas do MatLab® 4.0.

III.2.10. Método dos mínimos quadrados parciais (PLS)

Ao lado dos procedimentos com rede neural e rede neural com apodização, outro método de calibração foi utilizado, o método dos mínimos quadrados parciais (PLS)⁵².

Utilizando o método dos mínimos quadrados parciais (PLS1e PLS2)* os modelos foram construídos baseado no conjunto de treinamento. As previsões foram realizadas com o conjunto de validação. Os dados foram primeiramente centrados na média e a validação cruzada foi usada para determinar o número ótimo de fatores (variáveis latentes).

* PLS1 – quando construí-se dois modelos de previsão, um para CC e outro para HQ. PLS2 – quando foi construído somente um modelo para previsão dos dois isômeros.

III. 3. – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação de derivados de hidroquinona com eletrodos de carbono vítreo e eletrodos de pasta de carbono usualmente é realizada com varredura anódica. Neste trabalho, a redução eletroquímica foi usada para minimizar a passivação da superfície do eletrodo. Embora há uma pequena perda de sensibilidade, foi obtida uma melhora na resolução dos picos e estabilidade do sinal.

O uso das fibras de carbono tratadas com TiCl_4 mostra vantagens, quando comparado aos eletrodos convencionais. Um exemplo que pode ser comparado é o uso de eletrodos ativados de carbono vítreo. Nestes eletrodos catecol e hidroquina são fortemente adsorvidos⁵³. Já os eletrodos de fibras de carbono pré-tratados com TiCl_4 são reprodutíveis e a curva corrente/potencial não apresenta mudanças com sucessivas varreduras. Também, não é necessário realizar as medidas em atmosfera controlada (ex.: nitrogênio) para obter resultados experimentais satisfatórios, como no caso dos eletrodos de carbono vítreo ativado^{53, 54}.

III. 3. 1. – Otimização das condições operacionais

O primeiro passo realizado foi a otimização das condições operacionais, ou seja, estabelecer os parâmetros necessários para que a técnica de voltametria de pulso diferencial possa ser aplicada com eficiência, os quais são: a amplitude de pulso e velocidade de varredura, sendo os valores ótimos encontrados de 25 mV e 10 mV s⁻¹, respectivamente.

III. 3. 2. – Otimização da concentração do eletrólito suporte e pH

A variação na concentração do eletrólito suporte (TRIS- HCL) resultou em uma mudança nos potenciais de picos catódicos das espécies estudadas (catecol e hidroquinona) bem como a variação da intensidade do sinal.

Na Figura III.3, as concentrações do eletrólito de suporte *versus* os potenciais de pico catódico estão apresentados. A maior separação dos picos

de catecol e hidroquinona é obtida na concentração de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de TRIS-HCl, sem perda de sinal. Para concentrações abaixo de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ um decréscimo na razão sinal/ruído foi obtida. Então a concentração de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ foi escolhida para os experimentos posteriores.

Nos estudos de pH, a performance de cada analito mostrou que, para valores de $\text{pH} > 8,0$, não há relação linear entre a corrente de pico e a concentração, para ambos analitos, provavelmente devido a baixa estabilidade destes analitos em meio alcalino. Para valores de pH menores de 7,0 uma boa relação foi observada para ambos isômeros: catecol e hidroquinona.

O potencial redox é dependente do pH como pode ser visto na Figura III.4. Porém, não há nenhum valor de pH onde os potenciais de pico possuam uma grande diferença entre os seus valores. Em toda extensão de pH estudada as diferenças dos valores de potencial entre as curvas a e b mantêm-se praticamente a mesma.

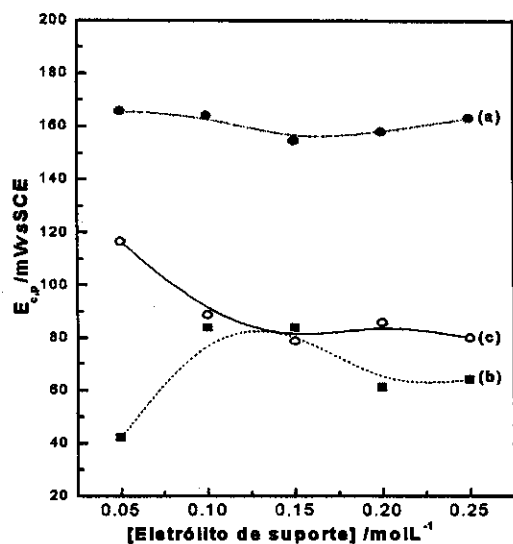


Figura- III.3- Potencial de pico vs concentração do tampão para cada isômero e mistura; (a) catecol $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (b) hidroquinona $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (c) mistura (1:1 CC:HQ) $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em TRIS pH 6,0. Os dados foram obtidos por DPV com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} , amplitude de pulso de 25 mV em uma faixa de potencial $500 \text{ a } -300 \text{ mV}$.

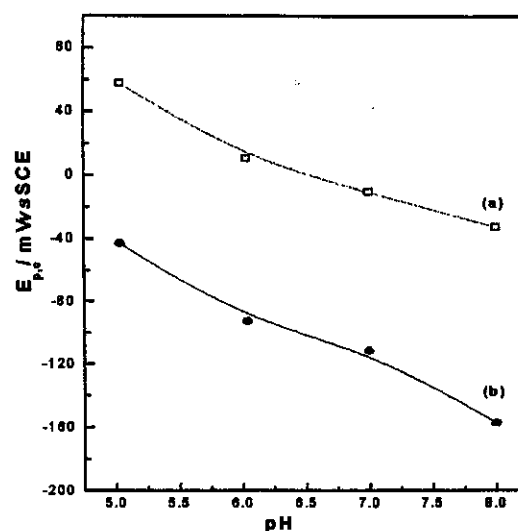


Figura- III. 4 – Potencial de pico vs pH (a) catecol $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (b) hidroquinona $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em TRIS-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Os dados foram obtidos por DPV com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} , amplitude de pulso de 25 mV em uma faixa de potencial de $500 \text{ a } -300 \text{ mV}$.

Baseado nestes estudos a melhor condição foi definida como: concentração do eletrólito de suporte $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 6.0.

Mesmo com todos os esforços para melhorar a resolução dos picos, uma considerável superposição entre eles continua presente, como mostrado na Figura III.5. Um outro fato relevante que deve ser considerado é que o sinal resultante da superposição, ou seja, o sinal da mistura, não é uma simples adição dos sinais individuais de cada isômero. Este comportamento sugere que a determinação destes compostos em uma mistura não é trivial.

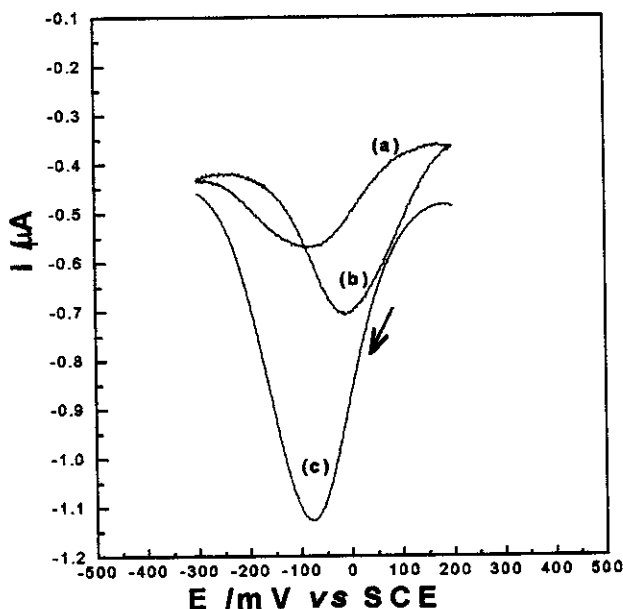


Figura - III.5 – Sinais obtidos por DPV para cada isômero e para a mistura em TRIS-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$; (a) hidroquinona $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (b) catecol $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (C) mistura hidroquinona $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ / catecol $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} e amplitude de pulso de 25 mV .

Para obtenção dos voltamogramas das amostras, os seguintes parâmetros foram usados:

- potencial aplicado: $500 \text{ a } -300 \text{ mV}$;
- amplitude de pulso: 25 mV ;
- velocidade de varredura: 10 mV s^{-1} ;
- pH: 6,0;
- concentração do eletrólito suporte: $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

Após a obtenção dos voltamogramas das amostras o passo seguinte então foi a construção e validação dos modelos para determinação dos isômeros, como demonstrado a seguir.

III. 3. 3. – Construção e validação dos modelos .

III. 3. 3. 1. Método dos mínimos quadrados parciais (PLS1)

No PLS1 dois modelos foram elaborados separadamente: um para catecol e outro para hidroquinona. Inicialmente os dados foram centrados na média e o número ótimo de fatores (variáveis latentes) para catecol e hidroquinona, utilizados nos modelos PLS1, foram obtidos por validação cruzada. O número ótimo de fatores para catecol foi 8 e para hidroquinona foi 9. Este grande número de fatores foi necessário, possivelmente, devido à complexidade do sistema causada pela superposição dos picos, e a não linearidade devido à competição entre catecol e hidroquinona pela superfície do eletrodo; além disso, os potenciais de pico de redução mudam com a concentração.

Os resultados obtidos com este método estão apresentados na Figura III.6 (A) e (B) e na Tabela III.1. A raiz média quadrática dos erros de previsão (%RMSEP) foi 8,04 para catecol e 12,33 para hidroquinona.

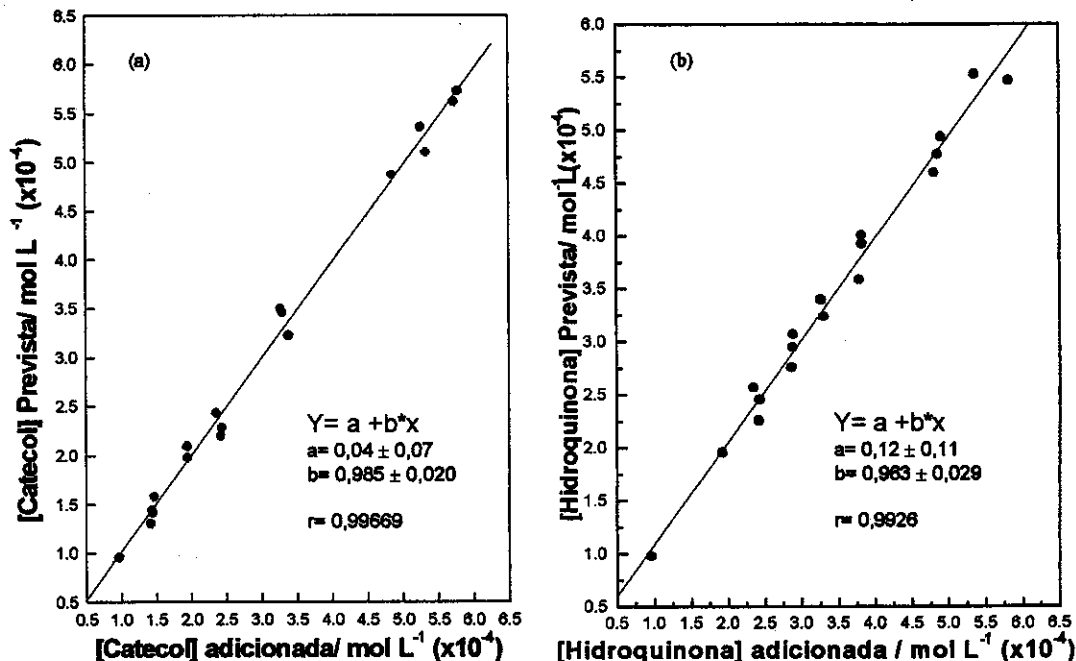


Figura III.6 - Resultados obtidos para os conjuntos de validação modelados com PLS 1, para (a) catecol e (b) para hidroquinona, na faixa de concentração de $1,0 \cdot 10^{-4}$ a $6,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ em TRIS-HCl, pH 6,0.

III. 3. 3. 2. Método dos mínimos quadrados parciais (PLS2)

Neste método, ambos os analitos foram modelados simultaneamente. O número ótimo de fatores obtidos usando validação cruzada foi 9. Este número é similar aqueles obtidos para PLS1, ou seja, igual o número de fatores obtidos no modelo para hidroquinona. Isto indica a complexidade do sistema.

Os resultados obtidos com o conjunto de previsão estão apresentados na Figura III.7 (A) e (B) e na Tabela III.1. A raiz média quadrática dos erros de previsão (%RMSEP) foi 9,08 para catecol e 13,94 para hidroquinona neste modelo, indicando que não há muita diferença entre os resultados obtidos quando os dois analitos foram modelados separadamente (PLS1). Isto não justificaria o uso do PLS1 que é bem mais trabalhoso, pois deve-se construir um modelo para cada um dos analitos, tornando a quantificação bastante laboriosa.

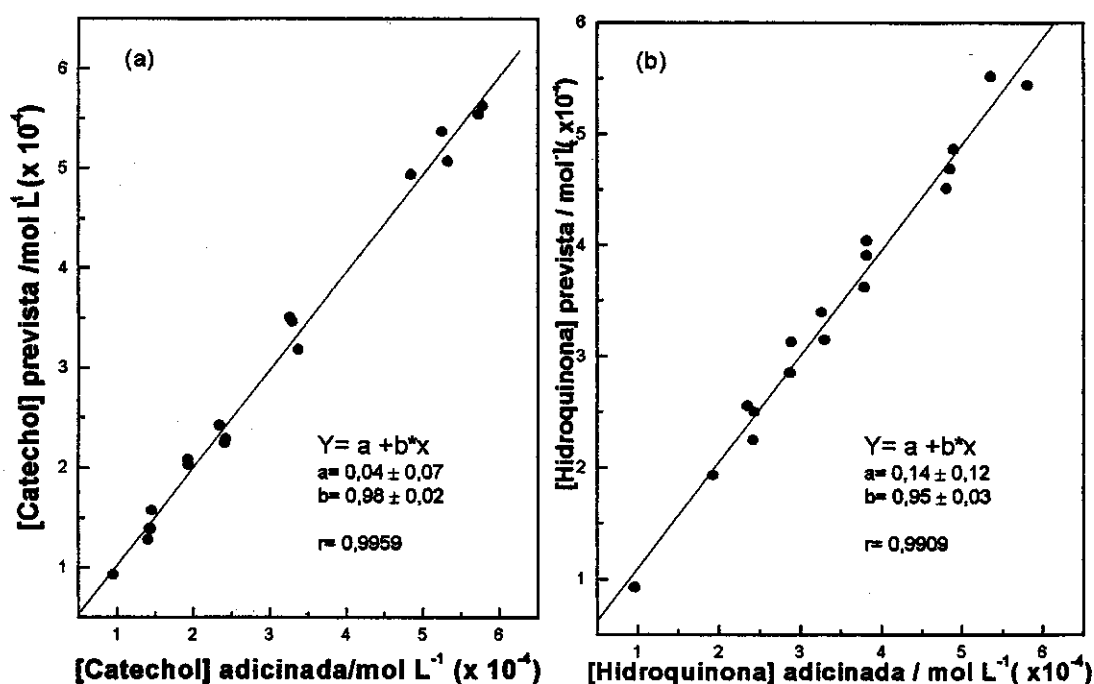


Figura - III.7 - Resultados obtidos para os conjuntos de validação modelados com PLS 2, para (a) catecol e (b) para hidroquinona, na faixa de concentração de $1,0 \cdot 10^{-4}$ a $6,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ em tampão TRIS-HCl, pH 6,0.

Tabela 1 - Resultados obtidos para os conjuntos de validação modelados com PLS1, PLS2 e rede neural, para catecol e hidroquinona, na faixa de concentração de 1.0×10^{-4} - 6.0×10^{-4} mol L⁻¹ em 0.05 mol L⁻¹ TRIS/HCl, pH 6.0, com seus respectivos erros relativos.

Catecol ($\times 10^{-4}$ mol L ⁻¹)						Hidroquinona ($\times 10^{-4}$ mol L ⁻¹)					
PLS-1			PLS-2			PLS-1			PLS-2		
Valor adicionado	Valor previsto	Erro (%)	Valor previsto	Erro (%)	Rede Neural	Valor adicionado	Valor previsto	Erro (%)	Valor previsto	Erro (%)	Rede Neural
					Valor previsto						Valor previsto
					Erro (%)						Erro (%)
5,26	5,37	-2,16	5,37	-2,15	5,09	3,83	3,93	-2,72	3,91	-2,23	3,68
5,34	5,11	4,87	5,08	4,87	5,25	2,43	2,26	6,84	2,25	725	2,35
5,74	5,63	3,31	5,55	3,31	5,45	3,82	4,01	-4,86	4,04	-5,71	3,91
3,27	3,50	-7,27	3,51	-7,27	3,44	3,27	3,40	-3,94	3,39	-3,88	3,15
2,36	2,44	-2,74	2,42	-2,74	2,49	3,31	3,24	2,06	3,15	4,70	3,16
2,42	2,21	7,17	2,25	7,17	2,49	5,82	5,47	6,01	5,44	6,50	5,88
1,95	1,98	-4,19	2,03	-4,19	2,02	5,36	5,53	-3,11	5,52	-2,97	5,52
0,962	0,967	3,03	0,932	3,07	0,988	2,88	2,95	-2,28	2,85	1,03	2,87
3,38	3,23	5,89	3,19	5,89	3,40	4,81	4,60	4,32	4,51	6,13	4,78
2,44	2,29	6,13	2,29	6,13	2,41	4,85	4,77	1,74	4,69	3,46	4,98
1,42	1,31	9,81	1,28	9,81	1,33	3,79	3,59	5,31	3,62	4,41	3,62
1,47	1,59	-7,19	1,58	-7,19	1,57	4,90	4,94	-0,78	4,86	0,78	5,03
1,44	1,45	2,98	1,39	2,98	1,38	2,87	2,76	3,86	2,85	0,59	2,90
1,45	1,42	3,98	1,39	3,98	1,48	1,93	1,96	-1,43	1,99	-0,06	2,07
1,94	2,10	-7,45	2,09	-7,45	2,09	0,971	0,980	-0,948	0,926	4,67	0,920
3,30	3,47	-5,09	3,47	-5,09	3,21	2,36	2,57	-8,97	2,56	-8,43	2,24
4,85	4,88	-1,82	4,94	-1,82	4,75	2,43	2,46	-0,86	2,50	-2,59	2,33
5,79	5,74	2,73	5,63	2,73	5,65	2,89	3,07	-6,02	3,13	-8,03	2,96

III. 3. 3. 3. - Rede neural com apodização

As entradas empregadas para o treinamento da rede neural foram 15 componentes principais, as quais explicam 97 % da variância dos dados, escaladas em um limite de -1 a 1. A arquitetura da rede inicial (antes da apodização) e os parâmetros de treinamento estão listados na Tabela III.2.

Na Tabela III.2, "L" indica a função de transferência linear e "H" a função de transferência hiperbólica. Por exemplo, a notação LHLHLH significa que são seis neurônios na camada interna, um com uma função de transferência linear e outro com uma função de transferência hiperbólica e assim sucessivamente. Este procedimento é muito interessante porque, em princípio, é possível modelar sistemas lineares ou sistemas não lineares. Além disso, este procedimento pode ser considerado como um diagnóstico para a não linearidade, pois se no final do procedimento de apodização alguns neurônios não lineares estiverem presentes, o sistema será não linear.

Tabela III.2- Parâmetros empregados na arquitetura da rede inicial e parâmetros de treinamento (antes da apodização)

Arquitetura	Valor
Nº de neurônios da camada de entrada	15
Função de transferência da camada de entrada	L
Nº de neurônios da camada interna	6
Função de transferência da camada interna	LHLHLH
Nº de neurônios da camada de saída	2
Função de transferência da camada de saída	LL
Parâmetro	Valor
Número máximos de interações	500
Critério de parada	1,0 10 ⁻²
Peso de decaimento para camada interna (D)	0,01

A rede neural inicial foi treinada usando o método de Marquardt-Levenberg. O critério de convergência (CC') é baseado na medida de aproximação nos termos do erro médio quadrático. O treinamento foi parado quando a função CC' alcançou o valor previamente estabelecido:

$$CC' = \frac{1}{2N} \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y})^2 \quad \text{Eq. 17}$$

onde y_i é o valor conhecido e $\hat{y}_i$ é o valor previsto pela rede neural com apodização e N é o número de amostras usadas no conjunto de calibração.

A otimização da rede neural foi realizada usando um "brain surgeon algorithm (OBS)". A arquitetura ótima obtida, após o procedimento de apodização, é mostrada na Figura III.8.

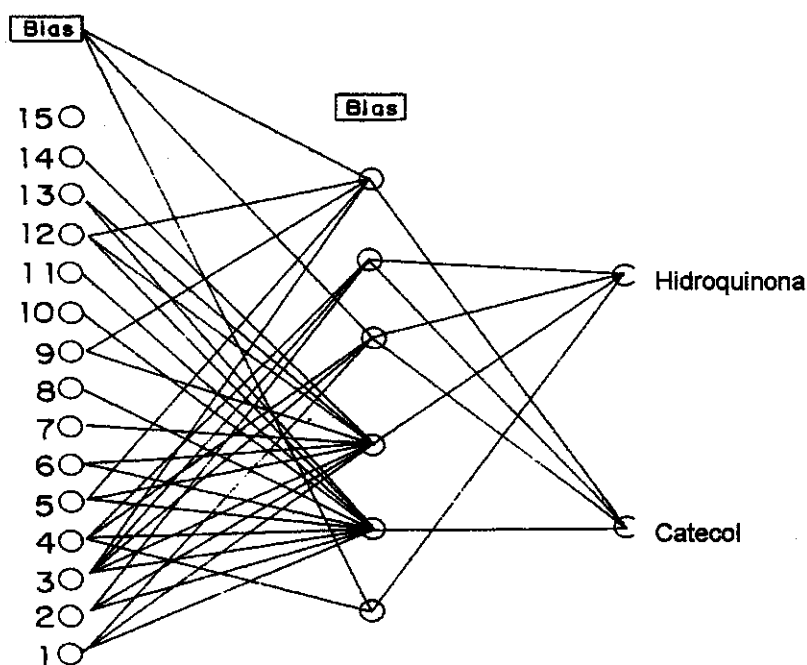


Figura III.8: Arquitetura ótima da rede obtida após os procedimentos de treinamento e apodização.

Os resultados obtidos para o conjunto de validação estão apresentados na Figura III.9 (A) e (B), e na Tabela 1. A %RMSEP obtidas para este modelo foi de 7,42 para catecol e de 8,02 para hidroquinona. Estes resultados indicam que a rede neural com apodização é um procedimento que parece ser ligeiramente melhor para modelar ao sistema quando comparado ao PLS1 e PLS2. Porém, é necessário realizar testes estatísticos para poder-se fazer qualquer afirmação.

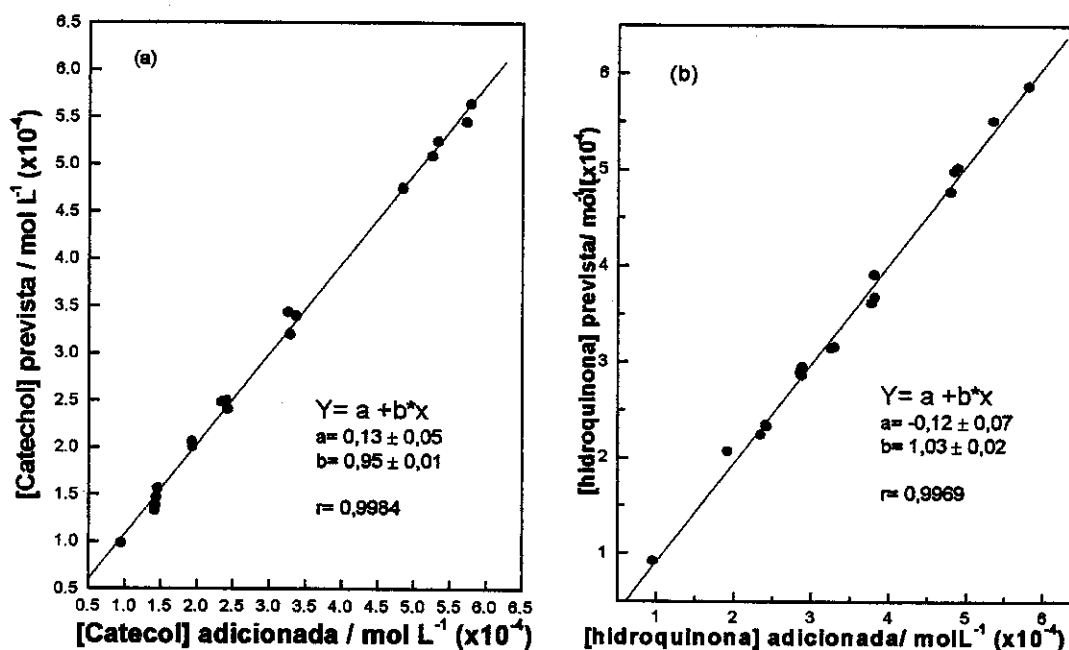


Figura III.9 - Resultados obtidos para os conjuntos de validação modelados com rede neural, para (a) catecol e (b) para hidroquinona, na faixa de concentração de $1,0 \cdot 10^{-4}$ a $6,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ em tampão TRIS-HCl, pH 6,0.

III. 3. 4. – Seleção do melhor procedimento.

A escolha do melhor procedimento para modelar este sistema foi realizado com a aplicação do teste F, no nível de confiança de 95%, para comparar o %RMSEP para os métodos testados (PLS1, PLS2 e rede neural com apodização) de acordo com a equação 18.

$$F(p_i, p_j) = \left(\frac{RMSEP_{PLS1 \text{ or } PLS2}}{RMSEP_{rede}} \right)^2 \quad \text{Eq.18}$$

onde p é o número de graus de liberdade do modelo. Para o PLS os graus de liberdades podem ser considerados iguais ao número de amostras de validação menos o número de variáveis latentes mais dois. A soma de 2 é para cada média que é subtraída dos blocos de dados. Para rede neural não há um método para decidir o número correto de perda dos graus de liberdade, entretanto o número de neurônios da camada interna podem ser estimados. Os valores críticos do teste F são:

$F_{\text{crítico,PLS1}} = 2,53$ para catecol e 2,57 para hidroquinona;

$F_{\text{crítico,PLS2}} = 2,57$ para catecol e hidroquinona

Usando esta aproximação, os resultados obtidos para hidroquinona com rede neural com apodização foram levemente melhores que para PLS2 ($F_{\text{PLS1(hidroquinona)}} = 2,36$ e $F_{\text{PLS2(hidroquinona)}} = 3,02$) e estatisticamente iguais para PLS1, em um nível de confiança de 95%. Para catecol, os valores de %RMSEP obtidos com rede neural com apodização foram menores que os obtidos por PLS1 e PLS2, mas a diferença nos valores de %RMSEP não são significantes em um nível de 95% de confiança ($F_{\text{PLS1(catecol)}} = 1,17$ e $F_{\text{PLS2(catecol)}} = 1,49$). Entretanto, uma análise dos coeficientes e as inclinações das Figuras 6, 7, e 9, o método de PLS apresenta um desempenho um pouco melhor. Baseado nestas observações é difícil afirmar, qual procedimento é melhor para o sistema. Porém, devido à menor complexidade do método dos mínimos quadrados parciais (PLS), poder-se-ia considerar um melhor método neste caso.

III. 4. – CONCLUSÕES

Várias conclusões podem ser obtidas dos resultados deste estudo:

- 1 - Devido à sobreposição dos picos e à resposta não linear do sistema, é impossível modelar o sistema com métodos univariados.
- 2 - O apodização com OBS forneceu resultados um pouco melhores que os obtidos com PLS1 e PLS2, para hidroquinona, mostrando que o número extra de fatores usados nos modelos com PLS não foram suficientes para modelar o comportamento não linear do sistema. Entretanto, a comparação entre os modelos feitos para catecol mostrou que os resultados são estatisticamente iguais.
- 3 - A aplicação de procedimentos de calibração multivariada para modelar respostas não lineares de picos voltamétricos altamente sobrepostos, obtidos com eletrodos de fibras de carbono para misturas de isômeros fenólicos é um método alternativo para determinação simultânea de catecol e hidroquinona, sem a necessidade de separação química prévia.
- 4 - O eletrodo mostrou grande estabilidade indicando que o óxido de titânio e a varredura catódica contribuíram para minimizar a passivação do eletrodo.
- 5 - Uma faixa de concentração de $1,0 \cdot 10^{-4}$ – $6,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, para catecol e hidroquinona foi empregado, pois misturas com altas concentrações de ambos isômeros saturam o eletrodo.
- 6- Os resultados obtidos possibilitam a utilização desta metodologia para outras misturas de compostos fenólicos em amostras reais.

III. 5. – REFERÊNCIAS

1. Rella, R., Ferrara, D., Barison, G., Doretto, L. e Lora, S., "High-Temperature Operating Biosensor for the Determination of Phenol and Related Compounds"; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1996**, 24, 83.
2. Pryor, W. A., Stone, K., Zang, L. Y. e Bermudez, E.; "Fractionation of Aqueous Cigarette Tar Extracts: Fractions that Contain the Tar Radical Cause DNA Damage"; *Chem. Res. Toxicol.* **1998** 11, 441.
3. Amatore, C., Bouret, Y. e Midrier, L.; "Time-Resolved Dynamics of the Visible Membrane During Individual Exocytotic Secretion Events, as Extracted from Amperometric Monitoring of Adrenaline Exocytosis from Chromaffin Cells"; *Chem. A - Eur. J.* **1999**, 5, 2151.
4. Anderson, B. B., Chen, G. Y., Gutman, D. A. e Ewing, A. G., "Demonstration of Two Distributions of Vesicle Radius in the Dopamine Neuron of Planorbis Corneus from Electrochemical Data"; *J. Neurosci. Meth.* **1999**, 88, 153.
5. Anderson, B. B. e Ewing, A. G., "Chemical Profiles and Monitoring Dynamics at an Individual Nerve Cell in Planorbis Corneus with Electrochemical Detection"; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 19, 15.
6. Svitel, J. e Miertus, S.; "Development of Tyrosinase-Based Biosensor and Its Application for Monitoring of Bioremediation of Phenol and Phenolic Compounds"; *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32, 828.
7. Powley, M. W. e Carlson G. P., "Species Comparison of Hepatic and Pulmonary Metabolism of Benzene"; *Toxicology* **1999**, 139, 207.
8. Cui, H. He, C. e Zhao, G., "Determination of Polyphenols by High-Performance Liquid Chromatography with Inhibited Chemiluminescence Detection"; *J. Chromatogr. A* **1999**, 855, 171.
9. McCreey, R. L., "Electroanalytical Chemistry: A series of advances", V.17, Ed. Bard, A. J., Marcel Dekker, New York, 1991, pp. 293-295.
10. Bunin, M. A. e Wightman, R. M., "Quantitative Evaluation of 5-Hydroxytryptamine (Serotonin) Neural Release and Uptake: An Investigation of Extrasynaptic Transmission"; *J. Neurosci.* **1998**, 18, 4854.

11. Meyerhoff, J. B., Ewing, M. A. e Ewing, A. G., "Ultrasml Enzyme Electrodes with Response Time Less than 100 Milliseconds", *Electroanalysis* **1999**, 11, 308.
12. Bunin, M. A., Prioleau, C., Mailman, R. B. e Wightman, R. M., "Release and Uptake Rates of 5-Hydroxytryptamine in the Dorsal Raphe and Substantia Nigra Reticulata of the Rat Brain"; *J. Neurochem.* **1998**, 70, 1077
13. Agüi, L.; López-Guzmán, J. E.; Gonzáles-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P. e Pingarrón, J. M.; "Analytical Performance of Cylindrical Carbon Fiber Microelectrodes in Low-Permittivity Organic Solvents: Determination of Vanillin in Ethyl Acetate", *Anal. Chim. Acta* **1999**, 385, 241.
14. Rivot, J. P.; Sousa, A.; Montagne-Clavel, J. e Bessen, J. M.; "Nitric Oxide (NO) Release by Glutamate and NMDA in the Dorsal Horn of the Spinal Cord: an *In Vivo* Electrochemical Approach in the Rat", *Brain Res.* **1999**, 821,101.
15. Anderson, B.B., Chen, G., Gutman, D. A. e Ewing, A.G.; "Dopamine Levels of Two Classes of Vesicles are Differentially Depleted by Amphetamine", *Brain Res.* **1998**, 788, 294.
16. Clark, R. A., Zerby, S. E. e Ewing, A. G.; "Electrochemistry in Neuronal Microenvironments", *J. Electroanal. Chem.* **1998**, 20, 227.
17. Kumar, G. K., Overholt, J. L., Bright, G. R., Hui, K. Y., Lu, H. W., Gratzl, M. e Prabhakar, N. R.; "Release of Dopamine and Norepinephrine by Hypoxia from PC-12 Cells", *Am. J. Physiol- Cell Physiol.* **1998**, 43, C1592.
18. Sheu, Y.H. e Young, M. S.; "A Combined Long-Term Recording System for Single-Unit Activity and Neurotransmitter Efflux of a Brain Slice", *Rev. Sci. Instrum.* **1998**, 69, 1860.
19. Yang, L. J., Yang, C. F., Peng, T. Z., Yang, H. S., Gao, C. e Liu, G. Q.; "Electrochemical Behavior and In Vivo Determination of the Neurotransmitter Dopamine Using Sodium Montmorillonite Modified Electrodes", *Electroanalysis* **1999**, 11, 438.
20. Kulagina, N. V., Skankar, L., e Michael, A. C., "Monitoring Glutamate and Ascorbate in the Extracellular Space of Grain Tissue with Electrochemical Microsensors", *Anal. Chem.* **1999**, 71, 5093.

21. Wang, L-H; "Simultaneous Determination of Hydroquinone Ethers in Cosmetics After Preconcentration at a Carbon Paste Electrode", *Analyst*, **1995**, 120, 2241.
22. Carvalho, R. M.; Kubota, L. T.; Rohwedder, J. J. R.; Csöregi, E.; e Gorton, L.; "Effect on Electrochemistry of Hexacyanoferrate at Carbon Fibers After Pretreatment with Titanium Chloride", *J. Electroanal. Chem.* **1998**, 457, 83.
23. Martens, H. e Naes, T., "*Multivariate Calibration*", John Wiley & Sons, Chichester, 1989.
24. Beebe, K. R. e Kowalski, B. R. "An Introduction to Multivariate Calibration and Analysis", *Anal. Chem.* **1987**, 59, 1007A
25. Zupan, J. e Gasteiger, J., "*Neural Networks for Chemists: An Introduction*", VCH, Weinheim, 1992, p.5.
26. Hassibi, B. e Stork, D. G., "*Advances in Neural Information Processing Systems*", ed. Hanson, S. J., Cowan, J. D. and Giles, C. L., Morgan Kaufmann, San Mateo, 1993, p. 164.
27. Chan, H.; Butler, A.; Falck, M. D. e Freund, M. S., "Artificial Neural Network Processing of Stripping Analysis Responses for Identifying and Quantifying Heavy Metals in the Presence of Intermetallic Compound Formation", *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2373.
28. Cladera, A.; Alpízar, J.; Estela, J. M.; Cerdà, V.; Catasús, M.; Lastres, E. e García, L; "Reslution of Highly Overlapping Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetric Signals Using Multicomponent Analysis and Neural networks", *Anal. Chim. Acta* **1997**, 350, 163.
29. Facchin, I; Mello, C; Bueno, M. I. M. S. e Poppi, R. J. "Simultaneous Determination of Lead and Sulfur by Energy-Dispersive X-ray Spectrometry. Comparison Between Artificial Neural Networks and Other Multivariate Calibration Methods, *X-Ray Spectrom.* **1999**, 28, 173.
30. Bhandare, P.; Mendelson, Y.; Perua, R. A.; Janatsch, G.; Kruse-Jarres, J. D.; Marbach, R. e Heise, H. M.; "Multivariate Determination of Glucose in Whole Blood Using Partial Least-Square and Artificial Neural Networks Based on Mid-Infrared Spectroscopy", *Appl. Spectrosc.* **1993**, 47, 1214.

31. Wienke, D e Kateman, G.; "Adaptive Resonance Theory Based Artificial Neural Networks for Treatment of Open-Category Problems in Chemical Pattern Recognition – Application to UV – Vis and IR Spectroscopy", *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1994**, 23, 309.
32. Gemperline, P. J.; Long, J. R. e Gregoriou, V. G.; "Nonlinear Multivariate Calibration Using Principal Components Regression and Artificial Neural Networks", *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2313.
33. Bhat, N. e McAvoy, T. J.; "Use of Neural Nets for Dynamic Modeling and Control of Chemical Process Systems", *Comput. Chem. Eng.*, **1990**, 14, 573.
34. Venkatasubramanian, V.; Vaidyanathan, R. and Yamamoto, Y.; "Process Fault-Detection and Diagnosis Using Neural Networks. 1.Steady-State Processes", *Comput. Chem. Eng.*, **1990**, 14, 699.
35. Tusar, M. e Zupan, J., "Neural networks, In *Software Development in Chemistry 4*", Gasteiger, J., ed.Springer Verlag, Berlin, 1990, p. 367.
36. Jang, J. R. S.; Sun, C. T. e Mizutani, E., "Neuro Fuzzy and Soft Computing", Prentice Hall, Upper Saddle River, 1970, p.165.
37. Acton, F. S., "Numerical Methods that Works", Harper and Row, New York, 1970.
38. Thomas, E. V. e Haaland, D. M.; "Comparison of Multivariate Calibration Methods for Quantitative Spectral Analysis", *Anal. Chem.* **1990**, 62, 1091.
39. Draper, N. R. e Smith, H.; "Applied Regression Analysis", 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, 1981, p. 219.
40. Heitz, J.; Krogh, A. e Palmer, R. G., "Introduction to the Theory of Neural Computation", Addison-Wesley, New York, 1991, p.120.
41. Le Cun, Y., Boser, B., Denker, J. S., Henderson, D., Howard, R. E., Hubbard, W. e Jakel, L. D., "Advances in Neural Information Processing System", vol. 2, Morgan Kaufmann, San Mateo, p. 396
42. Le Cun, Y.; Denker, J. S. e Solla, S. A.; "Proceedings of the Neural Information Processing Systems", Touretzky, D.S, Ed., vol. 2, Morgan-Kaufmann, San Mateo, 1990, p. 598

43. Poppi, R. J. e Massart, D. L.; "The Optimal Brain Surgeon for Pruning Neural Network Architecture Applied to Multivariate Calibration", *Anal. Chim. Acta* **1998**, 375, 187.
44. Haykin, S.; "*Neural Networks: A Comprehensive Foundation*", MacMillan College Publishing, New York, 1994.
45. Fahlman, S. E., Libiere, C., in: Touretzsky, D. S. (Ed.), "*Advances in Neural Information Processing Systems*", vol. 2, Morgan Kaufmann, San Mateo, 1990, p. 524.
46. Arfken, G. B. e Weber, H. J., "*Mathematical Methods for Physicists*", 4th ed., Academic Press, New York, 1995.
47. Box, P. E. G., Hunter, G. W. e Hunter, J. S., "*Statistics for Experimenters*", John Wiley & Sons, New York, 1985, p. 291.
48. Gollub, J. P. e Baker, G. L.; "*Chaotic Dynamics*", Cambridge University Press, Cambridge, 1990, p.28.
49. Press, W. H.; Teukolsky, S. A.; Vetterling, W. T. e Flannery, B. P.; "*Numerical Recipes in Fortran: The Art of Scientific Computing*", 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1992, p. 490.
50. Norgaard, N.; "*Neural Network Based System Identification Toolbox*", Tech. Report 95-E-773, Institute of Automation, Technical University of Denmark, 1995.
51. Wise, B. M. e Gallagher, N. B.; "*PLS_Toolbox for Use with MATLAB*", version 1.5.1, 1995.
52. Wold, S; Kettaneh-Wold, N. e Skagerberg, B.; "Nonlinear PLS Modeling", *Chemom. Intell. Lab Syst.*, **1989**, 7, 53.
53. Aihara, M. e Fukata, M.; "Electrochemical Study of Catechol and Hydroquinone Using Activated Glassy Carbon Electrodes", *Anal. Lett.* **1987**, 20, 669.
54. Zak, J. e Kuwana, T., "Chemically Modified Electrodes and Electrocatalysis", *J. Electroanal. Chem.* **1983**, 150, 645.

Capítulo IV

IV. CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES PARA SALICILATO

IV. 1. INTRODUÇÃO

Uma das características responsáveis pelo aumento do interesse de vários pesquisadores na aplicação de fibras de carbono em medidas eletroquímicas diz respeito à presença de grupos funcionais¹, contendo principalmente oxigênio na superfície, como citado anteriormente.

A presença de grupos funcionais na superfície das fibras de carbono têm proporcionado a construção de eletrodos quimicamente modificados e de biossensores¹⁻⁶. Esta e as demais características nos parágrafos anteriores, juntamente com a necessidade de desenvolvimento de novos biossensores, levaram a construção de um biossensor para determinação de salicilato.

A principal aplicação dos salicilatos dá-se na forma de ácido acetil salicílico (AAS), em fármacos. Devido sua ação antimicrobiana também é empregado em formulações de sabonetes, cremes dérmicos, xampus, etc.

O metabolismo do AAS ocorre através de sua hidrólise para ácido salicílico e ácido acético. Em um tempo de meia vida de 15 a 20 min, cerca de 20% de hidrólise ocorre no sangue e 80% no fígado e rins. AAS é excretado pelos rins na forma de ácido salicílico e seus principais metabólitos, ácido salicílico, glucoronídeos e ácido 2,5 dihidroxibenzóico (produto de deacetilação do AAS)⁷.

O AAS, quando em excesso no organismo humano, causa desde úlceras estomacais, náuseas, vômitos, distúrbios no sistema nervoso central à alterações no metabolismo da glicose, chegando a falha renal e respiratória podendo levar a morte, dependendo da dosagem por massa corpórea⁷.

A necessidade da construção de um biossensor para salicilato está ligada ao fato da pequena diferença entre a dose terapêutica (1,1 a 2,2 mmol L⁻¹ por L de sangue) e a dose tóxica (concentrações acima de 2,2 mmol L⁻¹)⁷, sendo que valores de concentrações superiores a 4,3 mmol L⁻¹ são considerados letais. Logo, um

rápido, efetivo e sensível método para determinação de salicilato em amostras biológicas é desejável para o diagnóstico de intoxicações por salicilato.

IV. 1. 1. Métodos para determinação de salicilato

Das muitas metodologias descritas na literatura para determinação de salicilato, tem-se os métodos: cromatográficos⁸, colorimétricos⁹ e eletroquímicos¹⁰⁻²⁶. Para melhor visualizar como estes métodos estão classificados a Figura IV.1 foi elaborada, a qual indica os tipos de métodos existentes e suas respectivas referências.

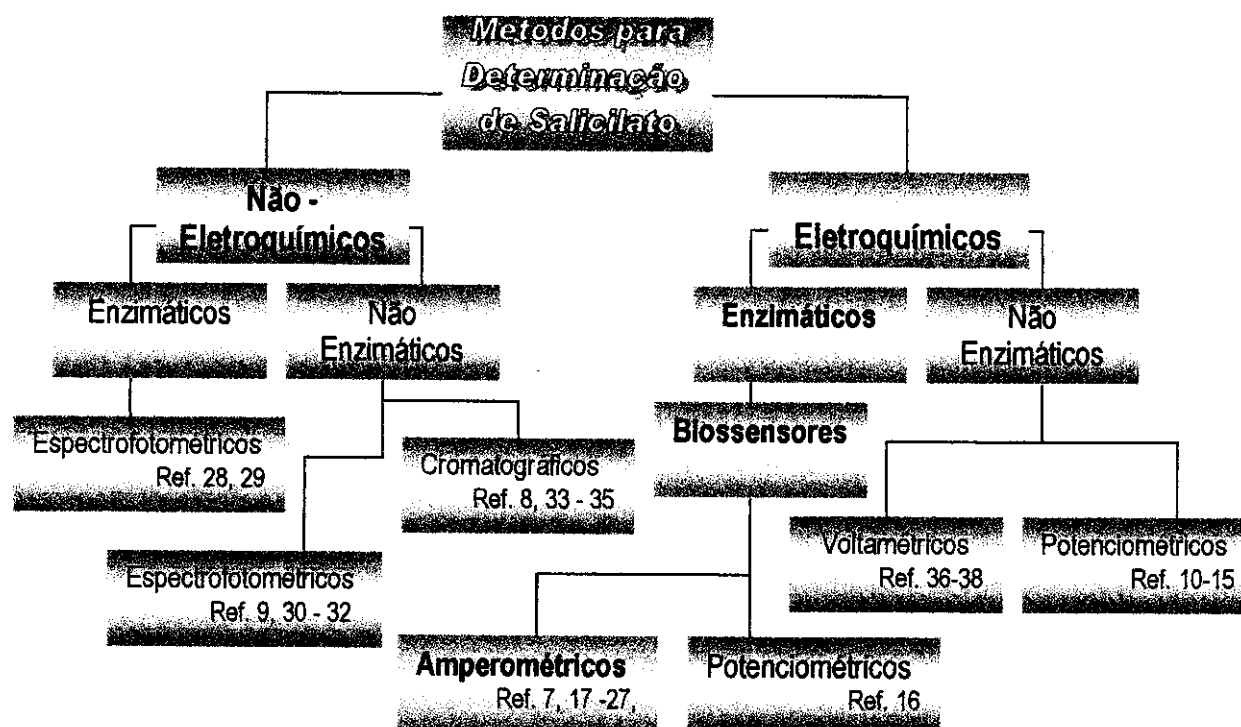


Figura IV.1- Organograma que reúne as metodologias descritas na literatura para determinação de salicilato.

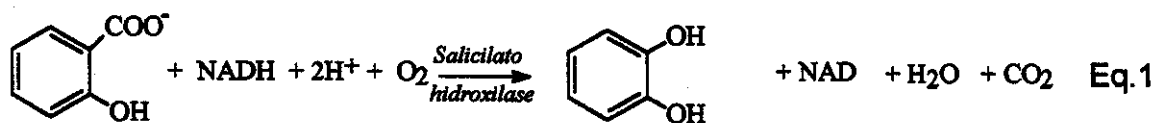
Uma revisão bem detalhada das metodologias citadas acima o leitor pode encontrar em um artigo de revisão escrito por Oliveira Neto e colaboradores³⁹.

Dos métodos apresentados no diagrama acima, os métodos cromatográficos e espectrofotométricos são que apresentam maiores problemas de interferência ou requerem etapas de tratamento da amostra, dificultando a aplicação da metodologia

no monitoramento de salicilato para diagnósticos rápidos. Os problemas de interferências podem, em muitos casos, serem minimizados com o uso de métodos eletroquímicos (potenciométricos¹⁰⁻¹⁵ ou amperométricos¹⁷⁻²⁶). Entretanto, os métodos potenciométricos possuem sensibilidade baixa, limite de detecção relativamente alto e tempo de resposta mais longo quando comparado aos métodos amperométricos. Em razão disso, procurou-se desenvolver um método amperométrico simples e seletivo para determinação de salicilato.

Descreve-se aqui, o desenvolvimento de um biossensor amperométrico a base de fibra de carbono para determinar salicilato em amostras clínicas e de medicamentos de forma barata, rápida e simples, bem como o comportamento de diferentes fibras de carbono na construção do mesmo.

O método de determinação envolve o uso da enzima "salicilato hidroxilase" (SH), que converte o salicilato à catecol e dióxido de carbono na presença de NADH e oxigênio, como mostrado na Eq.1. O catecol formado é então oxidado na superfície do eletrodo de fibra de carbono para o-quinona.



A detecção de catecol mostra vantagens, porque o potencial redox é mais baixo que para salicilato. A formação de um filme sob a superfície do eletrodo devido a subprodutos formados na oxidação e suas subseqüentes oligomerizações é bem menor para oxidação do catecol do que para a do salicilato⁴⁰. A outra vantagem da metodologia proposta é o uso das fibras de carbono como material eletródico, que tornam possível a construção de microbiossensores. Os biossensores miniaturizados são atrativos particularmente para conexão em várias aplicações e medidas em volumes extremamente pequenos e também possibilitam o uso como microsensores em sistemas de microfluxo, com alta sensibilidade.

IV. 2. EXPERIMENTAL

IV.2. 1. Reagentes e materiais

Salicilato hidroxilase SH (EC. 1.14.13.1 *Pseudomonas*); 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (carbodiimida - E1769); tris-hidroximetil aminometano (TRIS - HCL) e (piperazina- N, N'-bis[ácido 2-etanosulfônico]) de sódio (PIPES) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, USA). Salicilato de sódio e nicotinamida adenina dinucleotídeo (β - NADH) foram adquiridos da Merck (Darmstadt-Alemanha). Fosfato de monossódico e dissódico foram adquiridos da Synth (Diadema-Brasil). Todos os reagentes usados foram de grau analítico.

IV.2. 2. Medidas eletroquímicas

O sistema utilizado nesta parte do trabalho foi igual ao usado nos experimentos anteriores, salvo que o eletrodo de trabalho foi um biossensor para salicilato também construído com fibras de carbono através da imobilização da enzima *salicilato hidroxilase*. As medidas foram realizadas em um potenciostato, PGSTAT20-AUTOLAB (Ecochemie-Netherlands), acoplado a um microcomputador para aquisição dos dados e controle de potencial.

IV.2. 3. Preparação do Biossensor

Fibras de carbono de cinco diferentes tipos, cujas características podem ser visualizadas na Tabela 1, foram utilizadas nesta parte do trabalho. A construção dos eletrodos foi realizada seguindo a metodologia empregada no segundo capítulo desta tese.

Preparados os eletrodos, os mesmos foram pré-tratados eletroquimicamente, aplicando um potencial fixo de +800 mV por 30 s.

Tabela 1: Características das fibras utilizadas neste trabalho.

Tipo	Especificações	Módulo de Tensão	Sensor
Grafil	HM S/ 6H GH, 370 Gpa	-	Biossensor 1
Toray	T800H	42.7 9 MSI	Biossensor 2
Grafil	XA S 234 GPa	-	Biossensor 3
Sigrafil	HM 4800 B	-	Biossensor 4
Toray	M40	54.7 MSI	Biossensor 5

Após pré-tratamento, os mesmos foram modificados por ligação covalente com carbodiimida, tendo como base a metodologia utilizada por Csöregi e colaboradores¹. Os eletrodos foram imersos em uma solução de carbodiimida (7 mg em 500 μ L), preparada em tampão acetato 0,05 mol L⁻¹, pH 4,8, durante 60 min, sob agitação. Os eletrodos foram lavados com água destilada e secos em temperatura ambiente por 60 min e então imersos em de solução de enzima (SH), com pH 7,6 ajustado em tampão fosfato, por 15 min. Após este passo, os biossensores foram secos em temperatura ambiente por mais 60 min e estocados em refrigerador, quando não em uso.

IV.2. 4. Efeito do tipo de tampão e concentração

Três tipos diferentes de tampão foram usados nestes estudos: TRIS, PIPES e fosfato na concentração de 0,1 mol L⁻¹. Os experimentos foram realizados em pH 7,5, em um limite de concentração de salicilato entre $1,0 \cdot 10^{-7}$ e $8,0 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹, mantendo a concentração de NADH constante em $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹.

O efeito da concentração do tampão sobre a resposta do biossensor foi avaliada num limite de concentração de 0,05 a 0,25 mol L⁻¹, fixando a concentração de salicilato e NADH em $2,0 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, respectivamente. Este estudo foi realizado somente em tampão fosfato, pois este apresentou melhor resposta em relação as outras soluções.

IV.2. 5. Influência do pH da Solução

A influência do pH na resposta do biossensor foi investigada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em um limite de pH de 5,8 a 8,0, usando solução de salicilato de sódio $3,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ contendo NADH na concentração de $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

IV.2. 6. Influência da concentração de NADH

A quantidade de NADH para o máximo de resposta do eletrodo em uma dada concentração de salicilato ($1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) foi estudada na faixa de $1,0 \cdot 10^{-4}$ a $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Este estudo foi realizado em tampão fosfato, $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,6.

IV.2. 7. Influência do potencial aplicado na resposta do biossensor

As investigações do efeito do potencial aplicado na resposta do biossensor foram realizadas utilizando uma solução de salicilato $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em presença de NADH $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, preparada em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato em pH 7,6.

IV.2. 8. Estabilidade e curva analítica

A curva analítica do biossensor para salicilato foi obtida em 5,0 mL de tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,6, contendo NADH numa concentração de $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com sucessivas adições de 50 μL de uma solução de salicilato $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O potencial aplicado foi de 300 mV vs SCE. A estabilidade foi verificada através do uso contínuo do biossensor para determinação de salicilato em amostras sintéticas.

IV.2.9. Aplicação em Amostras Reais

A performance do biossensor foi verificada pela determinação de salicilato em amostras de medicamentos e amostras biológicas (urina). As amostras de fármacos foram compradas numa farmácia local (comprimidos com valor quantitativo nominal de 85 mg de ácido acetil salicílico). Estas amostras de ácido acetil salicílico foram hidrolizadas adicionando 10,0 mL de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e depois as misturas foram aquecidas por 1 h, seguidas pela neutralização com H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e transferidas quantitativamente para balões volumétricos de 50,00 mL³⁹. O volume foi completado

com água desmineralizada e as diluições necessárias foram feitas com tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ pH 7,6. As amostras de urinas, adquiridas do Hospital das Clínicas da Unicamp, foram neutralizadas com NaOH 1,0 mol L⁻¹ e as diluições também foram feitas com tampão fosfato. Todas as amostras foram analisadas em triplicata, utilizando o biossensor, bem como o método padrão^{9,41}.

IV. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fibras de carbono de diferentes procedências geralmente apresentam maior ou menor eletroatividade dependendo do material precursor e da metodologia utilizada em seu preparo. Por isso, a investigação sobre o mecanismo de resposta do biossensor foi realizada para os diferentes tipos de fibras.

Na Figura IV.2, os voltamogramas cíclicos obtidos em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando fibras Toray T-800, antes e após a imobilização da enzima. O voltamograma cíclico obtido com eletrodos antes da imobilização apresenta uma corrente capacitiva maior que após a imobilização, indicando que a área superficial decresce com a imobilização. Este mesmo comportamento foi observado para os diferentes tipos de fibras de carbono aqui utilizados, vide Tabela IV.1.

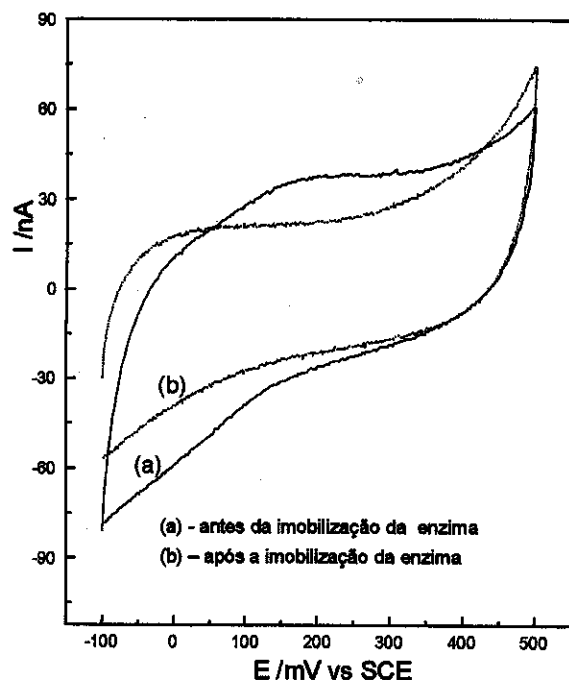


Figura IV.2- Voltamogramas cíclicos obtidos ante e após a imobilização da enzima SH, em tampão fosfato, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5, com velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} . Utilizando fibras Toray- T800.

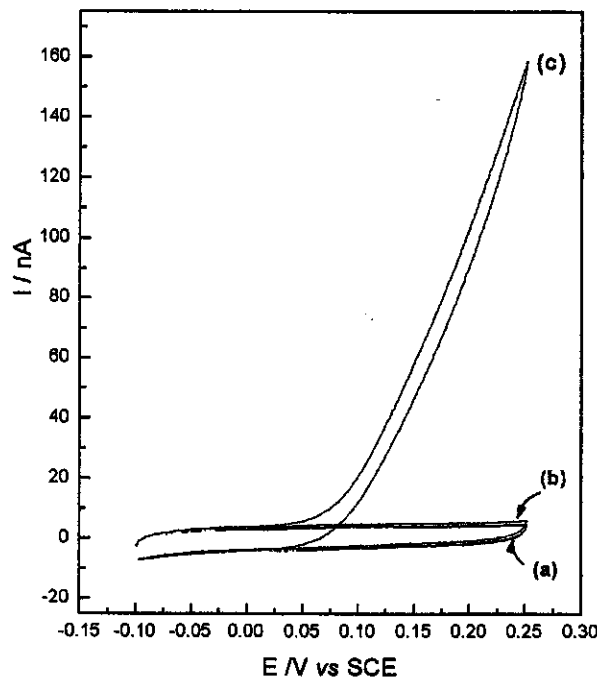


Figura IV.3- Voltamogramas cíclicos obtidos em tampão fosfato, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5, com velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} . Curva (a) na ausência de salicilato, curva (b) em presença de salicilato ($2,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), e curva (c) em presença de salicilato e NADH ($5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Utilizando fibras Grafil XA-S.

Na Figura IV.3, encontram-se os voltamogramas cíclicos na ausência, na curva (a) e na presença de salicilato, curva (b) e na presença de salicilato e NADH, curva (c); (utilizando biossensor confeccionado com fibras de carbono Grafil XA-S). Através desta figura pode-se observar a ausência de corrente de pico sem a presença do cofator NADH, demonstrando a necessidade do cofator NADH para que o sistema possa responder. Isto demonstra que a resposta deve ser dependente da reação enzimática no eletrodo e deverá ser proporcional à concentração de salicilato na solução. Estes voltamogramas foram obtidos com fibras Grafil XA-S, o comportamento dos outros biossensores foi similar.

IV. 3. 1. Amplificação de sinal

Um importante ponto que chama a atenção na resposta do biossensor aqui desenvolvido é a total ausência da corrente de pico catódica, Figura IV.3.

O mecanismo de resposta proposto aos biossensores para salicilato, utilizando-se a enzima “*salicilato hidroxilase*”, geralmente é dado pela oxidação eletroquímica do catecol, formado na reação enzimática, na superfície do eletrodo²⁷, cuja proposta pode ser melhor visualizada através da Figura IV.4, onde mostra a representação esquemática do mecanismo de resposta proposto na literatura para maioria dos biossensores para salicilato. Porém, o comportamento apresentado pelos biossensores de fibra de carbono não pode ser explicado por este mecanismo.

Uma explicação para ausência da corrente catódica é um processo catalítico envolvendo catecol e NADH. Esta hipótese foi comprovada através de um experimento onde os voltamogramas cíclicos (VC) foram realizados em uma solução contendo catecol $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com eletrodos sem a presença de enzima.

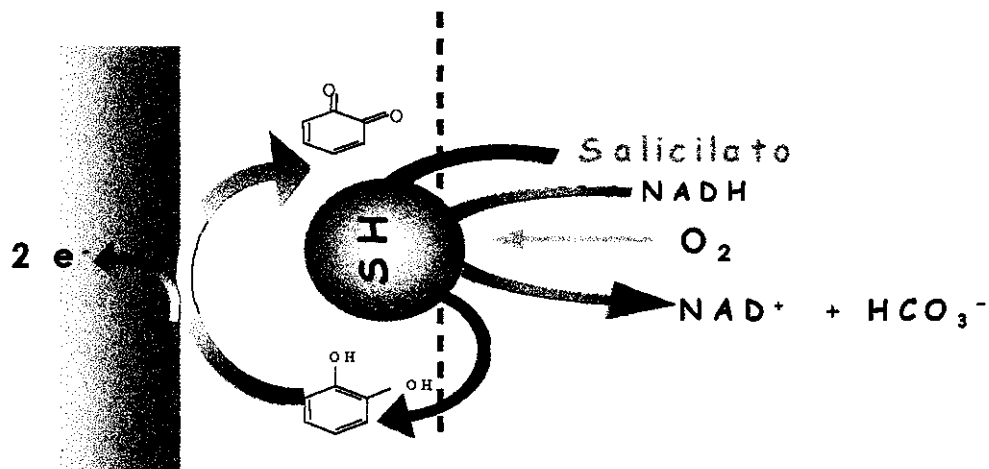


Figura IV.4 Representação esquemática do mecanismo proposto na literatura para biossensores para salicilato, utilizando carbono como material eletrodico

Os resultados são apresentados na Figura IV.5, na qual a curva (a) é o voltamograma cíclico em tampão fosfato pH 7,6; a curva (b) é o voltamograma cíclico em solução de tampão contendo catecol; e a curva (c) é o voltamograma cíclico em solução contendo catecol e NADH $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Na ausência de NADH os voltamogramas mostram uma pequena corrente, entretanto foi possível observar uma corrente catódica, como mostrado na Figura 5. Na presença de NADH a corrente anódica aumentou significativamente, desaparecendo a corrente catódica. Isto é uma evidência de um processo catalítico no sistema, conseqüentemente o mecanismo que explica este comportamento deve seguir o proposto na Figura IV.6. Este comportamento também foi observado para os demais biossensores, porém mais evidente para as fibras Grafil XA.

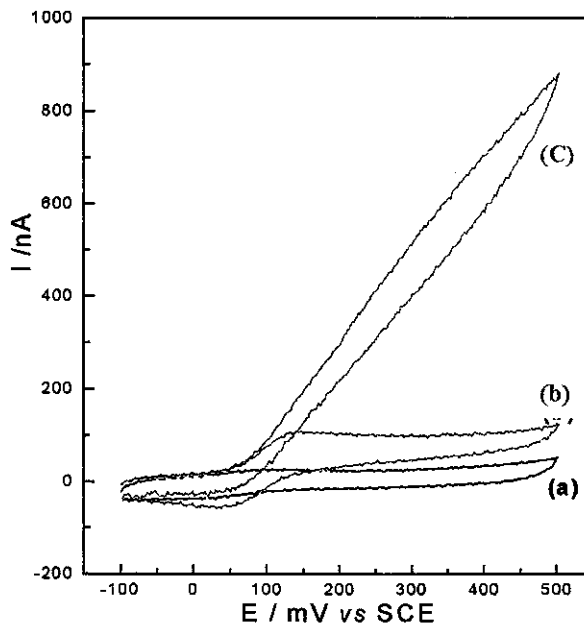


Figura IV.5 Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos de fibras de carbono (Grafil XA) em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,6 velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} . Curva (a) Tampão fosfato, curva (b) catecol $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e curva (c) solução contendo catecol e NADH $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

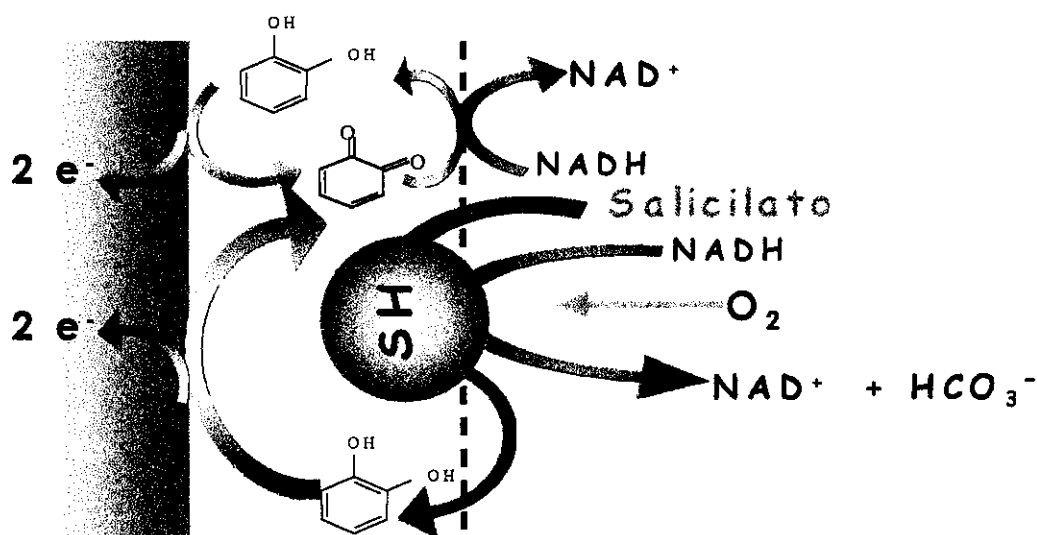


Figura IV.6- Representação esquemática do mecanismo proposto neste trabalho para fibras de carbono.

O mecanismo proposto envolve então: a conversão do salicilato para catecol, que é oxidado na superfície do biossensor perdendo dois elétrons, transformando em ortoquinona. Esta por sua vez reage com NADH presente na solução regenerando o catecol, que volta a perder dois elétrons e gerando nova corrente elétrica. Esta amplificação ocorre sem a necessidade de adição de outros reagentes.

IV.3. 2. Efeito do tipo de tampão e concentração

A resposta do biossensor foi avaliada para três diferentes tampões (fosfato, TRIS – HCl e PIPES em pH 7,5). Os experimentos foram feitos em pH 7,5, mudando a concentração de salicilato entre $1,0 \cdot 10^{-7}$ à $8,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, deixando a concentração de NADH constante em $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A maior sensibilidade foi observada com tampão fosfato, seguida por PIPES e TRIS, como pode ser observado na Tabela IV.2.

Tabela IV.2 – Sensibilidade obtida para o biossensor em diferentes tampões: fosfato, TRIS-HCl e PIPES, em pH 7,5 e concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Potencial aplicado, 300 mV vs SCE. Biossensor construído com fibras Toray – T800.

Tampão	Sensibilidade / mA L mol^{-1}
Fosfato	$18,6 \pm 0,2$
PIPES	$14,3 \pm 0,2$
TRIS – HCl	$11,3 \pm 0,3$

Alguns estudos demonstraram que íons monovalentes como cloreto podem causar inibição na enzima *salicilato hidroxilase*⁴², isto explica a baixa resposta para TRIS-HCl.

Sabe-se também que fosfatos podem complexar com o anel piridina do NADH provocando um aumento na velocidade de oxidação⁴³, isto pode explicar a maior sensibilidade na resposta do biossensor quando o tampão fosfato é usado.

Para todos os biossensores o comportamento foi similar, sendo as melhores sensibilidades encontradas para o fosfato. Em relação à concentração do tampão, os experimentos foram feitos nas concentrações entre 0,05 a 0,25 mol L⁻¹ de tampão fosfato, e a melhor resposta foi obtida na concentração de 0,2 mol L⁻¹.

IV.3. 3. Influência do pH da solução

O efeito do pH na resposta do biossensor foi avaliada na faixa de pH entre 5,8 a 8,0, em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹. A melhor resposta foi obtida em pH 7,6, (Figura IV.7) que é o pH ótimo da enzima solúvel. Este resultados indicam que as medidas podem ser feitas no pH que a enzima desenvolve sua atividade máxima e em condições cuja desnaturação em função do pH é minimizada.

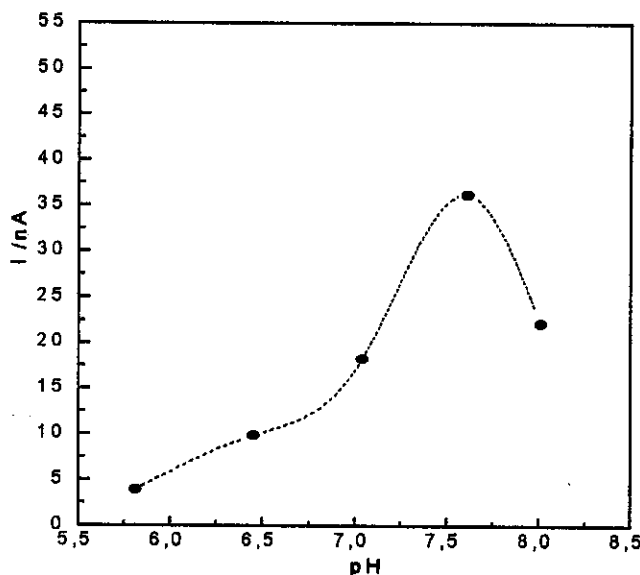


Figura IV.7- Resposta do biossensor obtida para salicilato em diferentes valores de pH. Concentração de salicilato $5,0 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹ e NADH $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, potencial aplicado 300 mV vs SCE em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹. Biossensor confeccionado com fibras Toray-T800.

IV.3. 4. Influência da concentração de NADH

A quantidade de NADH utilizada foi de $2,5 \cdot 10^{-4}$ a $10,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para encontrar o máximo de resposta do biossensor na concentração de $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de salicilato (este estudo foi realizado em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ no pH 7,6).

Uma razão molar entre NADH e salicilato maior que 500 vezes é necessária para ocorrer o máximo de conversão do salicilato (Figura IV.8). Esta razão é muito maior que a encontrada em outros biossensores descritos na literatura e este excesso pode ser atribuído à dificuldade de interação da enzima com NADH e também devido ao fato do consumo de NADH na redução da o-quinona evidenciada pela grande amplificação do sinal. Acima de $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, a resposta mostrou-se constante e abaixo da concentração de $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, a razão sinal/ruído é pequena. Logo a concentração de $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi escolhida como melhor condição.

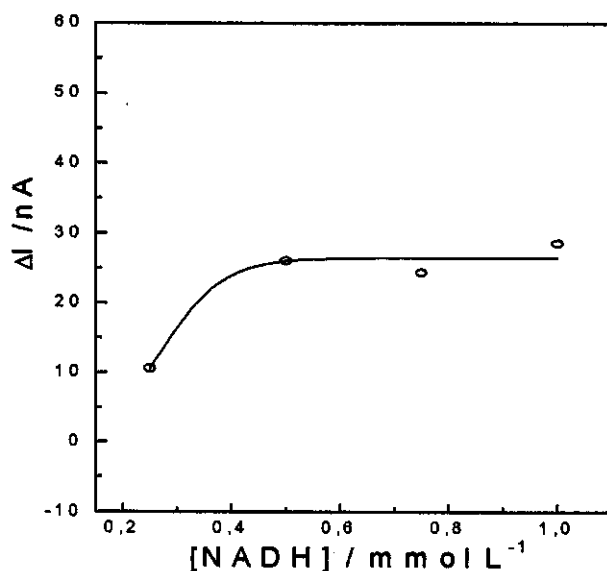


Figura IV.8- Influência da quantidade de NADH na resposta do biossensor. Potencial aplicado 300 mV vs SCE em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,6. Concentração de salicilato $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Biossensor confeccionado com fibras Toray-T800.

IV.3. 5. Influência do potencial aplicado na resposta do biossensor

A influência do potencial aplicado nas respostas dos biossensores foi investigada em um potencial entre -100 e $+500 \text{ mV}$. As correntes limités de todos os

biossensores foram encontradas entre 370 e 450 mV vs SCE, entretanto as formas das curvas apresentam uma leve diferença. Estes resultados sugerem um comportamento similar das fibras de carbono em função do potencial aplicado.

IV.3.6. Estabilidade

A estabilidade foi diferente para cada biossensor (Figura IV.9), mostrando que as características das fibras de carbono são muito importantes para fornecer um bom processo de imobilização, ou dar eletroatividade por um longo tempo.

O biossensor 5 foi o menos estável tornando impossível realizar mais que 20 medidas, pois a razão sinal/ruído decresce drasticamente. Isto sugere que a enzima perde a atividade ou a imobilização não foi efetiva e a enzima é lixiviada para a solução. Para os biossensores 1, 3 e 4, a estabilidade foi similar, permitindo aproximadamente 85 determinações, porém pouco menos estável que o biossensor 2.

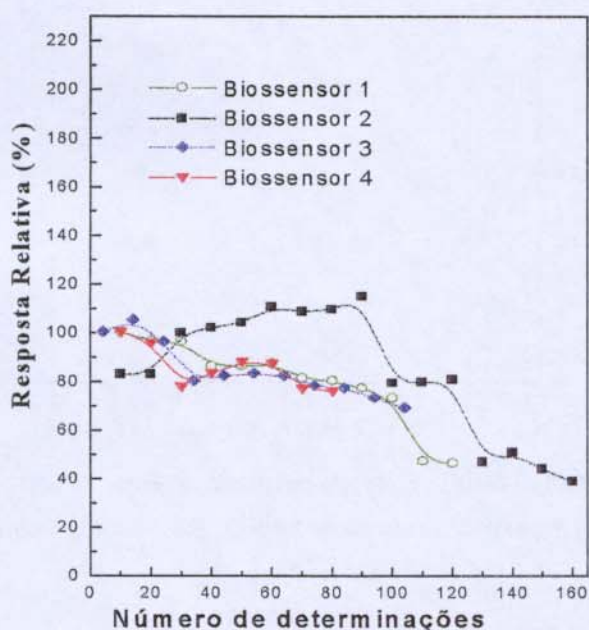


Figura IV.9- Estabilidade dos biossensores, com potencial aplicado de: 150 mV (-○-) e (-◆-); 300 mV (-■-) e 450 mV (-▼-). A concentração de NADH e salicilato foram $5,0 \cdot 10^{-4}$ e $1,5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente; em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,6.

IV.3.7. Faixa de resposta linear e limite de detecção

A faixa de resposta linear para todos os biossensores é bastante ampla como pode ser verificado na Tabela IV.3, especialmente para o biossensor 2 que mostra duas faixas de resposta linear. Esta característica é bastante importante para aplicação do biossensor em diferentes tipos de amostras.

Os limites de detecção, considerando 3 vezes o sinal do ruído foram, 393, 64, 196, 371 e 159 nmol L⁻¹ para os biossensores 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. Os quais são similares para todos os biossensores, exceto para o biossensor 2 que mostrou um valor baixo.

Tabela IV.3: Características dos biossensores construídos

	RSD (%)	Sensibilidade (mA mol ⁻¹ L)	Tempo de resposta (s)	Faixa linear (μ mol L ⁻¹)	Limite de detecção (nmol L ⁻¹)
Biossensor 1	8,6	9,8 ± 0,1	2,7 ± 0,1	1,0 - 9,0	393 ± 69
Biossensor 2	4,1	56,0 ± 0,4 20,8 ± 0,4	3,5 ± 0,1	0,10 - 1,93/ 1,96 - 12,0	64 ± 9
Biossensor 3	6,4	3,0 ± 0,1	4,0 ± 0,1	1,0 - 15,0	196 ± 16
Biossensor 4	15	18,0 ± 0,1	4,8 ± 0,1	0,75 - 1,8	371 ± 28
Biossensor 5	11	4,5 ± 0,1	3,2 ± 0,1	0,40 - 1,4	159 ± 23

RSD – desvio padrão relativo

IV.3.8. Sensibilidade

Com relação à sensibilidade, o biossensor 2 também apresentou uma grande diferença em comparação aos outros, dando uma sensibilidade de 56,0 mA L mol⁻¹. Este valor é cerca de 3 vezes maior que o valor encontrado para o biossensor 4 (18,5 mA L mol⁻¹), 6 vezes o biossensor 1 (9,8 mA L mol⁻¹), 12 vezes ao biossensor 5 (4,5 mA L mol⁻¹) e 20 vezes ao biossensor 3 (3,0 mA L mol⁻¹).

IV.3.9. Tempo de resposta

O tempo de resposta para todos os biossensores foi bem menor se comparado aos outros biossensores descritos na literatura^{18,20}. O tempo de resposta

foi aproximadamente 5 segundos para todos os biossensores como pode ser observado na Figura IV.10 e melhor visualizado na Tabela 3; o mesmo foi estimado como o tempo necessário para alcançar o máximo de sinal, ou seja, o estado estacionário. Este comportamento indica que as enzimas estão bem expostas na superfície das fibras de carbono proporcionando uma boa resposta.

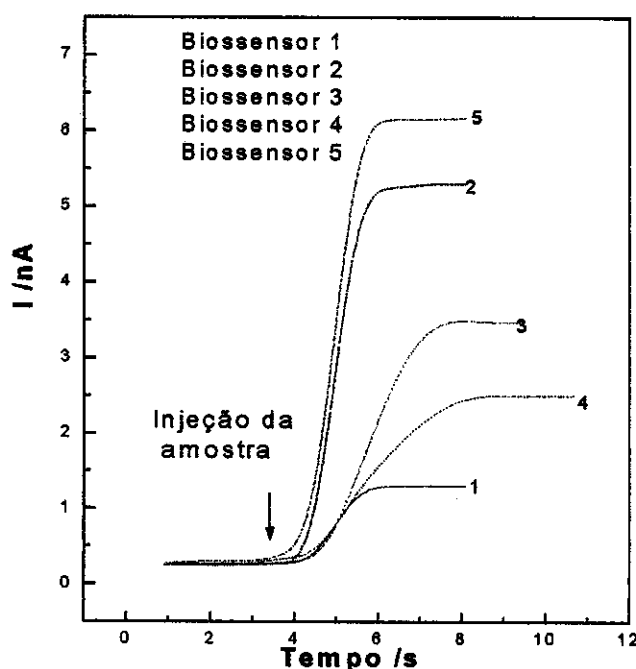


Figura IV.10- Tempo de resposta dos biossensores, com potencial aplicado de: 150 mV (1) e (3); 300 mV (2) e 450 mV (4) e (5). As concentrações de NADH e salicilato foram $5,0 \cdot 10^{-4}$ e $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente, em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,6.

IV. 3. 10. Escolha do biossensor que apresentou melhor performance

A correlação entre os resultados obtidos para cada tipo de fibra usada na preparação do biossensor não é clara para escolher o melhor biossensor. A escolha do melhor biossensor foi feita considerando os parâmetros na forma normalizada, pois se estes parâmetros forem considerados em seus valores absolutos, o resultado final poderia ser mal interpretado.

Os parâmetros considerados para o fator de seleção foram: o desvio padrão relativo, sensibilidade e limite de detecção. O potencial aplicado não foi considerado, pois um comportamento similar para este parâmetro foi observado. A normalização

foi realizada através da divisão dos parâmetros pelo seu respectivo maior valor. A equação utilizada para expressar o fator de seleção (FS) dos parâmetros normalizados foi a seguinte:

$$FS = SN / (DPRN \times LDN) \quad \text{Eq. 2}$$

onde: SN é a sensibilidade normalizada, DPRN é o desvio padrão relativo normalizado e LDN o limite de detecção normalizado. Com nesta equação, verifica-se claramente que altos valores de FS indicam o biossensor que possui o melhor desempenho. Baseado neste contexto o biossensor preparado com fibras de carbono Toray T800 (biossensor 2) foi o melhor, como pode ser observado na Tabela IV.4.

Tabela IV.4 – Parâmetros normalizados (desvio padrão, sensibilidade e limite de detecção) dos biossensores e correlação.

	SN	DPRN	LDN	FS=SN/(DPRN x LDN))
Biossensor 1	0,175 ± 0,002	0,57	1,00 ± 0,17	0,31 ± 0,17
Biossensor 2	1,000 ± 0,07	0,29	0,16 ± 0,02	21,55 ± 0,02
Biossensor 3	0,053 ± 0,001	0,43	0,49 ± 0,04	0,24 ± 0,04
Biossensor 4	0,321 ± 0,002	1,00	0,94 ± 0,07	0,34 ± 0,07
Biossensor 5	0,080 ± 0,002	0,73	0,40 ± 0,06	0,27 ± 0,06

Onde :

FS – é o fator de escolha;

DPRN – é o desvio padrão relativo normalizado;

SN – é a sensibilidade normalizada;

LDN – é limite de detecção normalizado

IV. 3.12. Características do biossensor que apresentou melhor performance.

Para uma melhor visualização, as características do biossensor que apresentou melhor desempenho (biossensor 2), foram reunidas neste item. A resposta do biossensor em nA é linear para a concentração de salicilato entre $1,00 \cdot 10^{-7}$ e $1,93 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($i(\text{nA}) = -2,66 \pm 0,64 + 5,57 \pm 0,04 \cdot 10^7 [\text{salicilato} (\text{mol L}^{-1})]$), para $n=24$ com $r = 0,9991$) e entre $1,96 \cdot 10^{-6}$ e $1,20 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($i(\text{nA}) = 12,20 \pm 2,93 + 2,08 \pm 0,04 \cdot 10^7 [\text{salicilato} (\text{mol L}^{-1})]$), para $n=13$ com $r = 0,9994$), como mostrado nas curvas de calibração, Figura IV.11. O limite de detecção do biossensor é de $6,4 \cdot 10^{-8}$

mol L⁻¹ (considerando 3 vezes o sinal do ruído), para um biossensor recentemente preparado, com desvio padrão relativo de 4,12 % (n=10). O tempo de resposta do biossensor é baixo, aproximadamente 3,5 s, quando comparado com outros biossensores para salicilato^{18,20}.

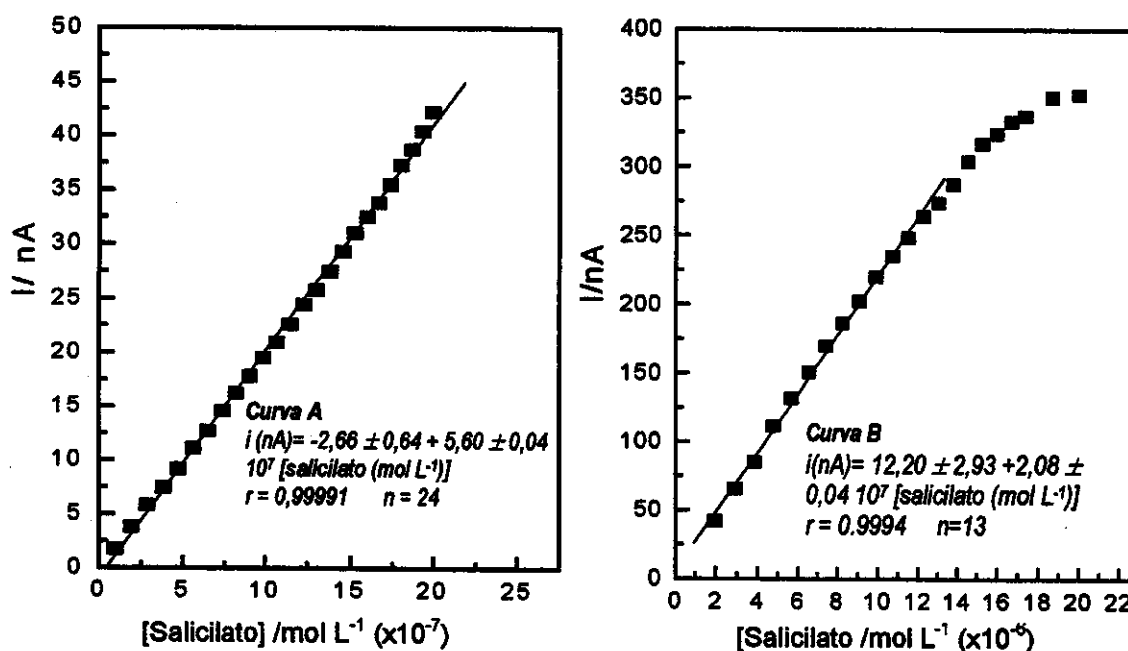


Figura IV.11- Curvas analíticas do biossensor, nas seguintes condições experimentais: [tampão fosfato] = 0,2 mol L⁻¹, [NADH] = 5,0 10⁻⁴ mol L⁻¹, pH = 7,6. Potencial aplicado 300 mV. Faixa de concentração de salicilato - Curva A: 1,00 10⁻⁷ – 1,93 10⁻⁶ mol L⁻¹, Curva B: 1,96 10⁻⁶ – 1,2 10⁻⁵ mol L⁻¹. Biossensor confeccionado com fibras Toray T-800.

A estabilidade do biossensor foi observada em uso contínuo e mostrou-se estável para aproximadamente 100 medidas, após este número de medidas o sinal decresce aproximadamente 25%. Estes resultados provavelmente poderão ser melhorados se o biossensor for adaptado a um sistema de injeção em fluxo.

IV. 3. 11. Estudo cinético da enzima imobilizada

Este estudo foi realizado para estimar o K_m^{ap} da enzima, *salicilato hidroxiliase* para o biossensor que apresentou melhor desempenho (biossensor 2). O valor aproximado de K_m foi obtido a partir do gráfico de duplo-recíproco da corrente versus

a concentração de salicilato (gráfico de Lineweaver-Burk), Figura IV.12 A. O biossensor apresentou uma constante aparente de Michaelis-Menten de $16,3 \mu\text{mol L}^{-1}$. O valor de K_m^{ap} demonstra a boa seletividade do biossensor, visto que a K_m para enzima solúvel é de $2,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ³⁹.

Quando o valor de K_m^{ap} foi determinado pelo gráfico de Eadie-Hofstee, Figura IV.12 (B), o qual é a corrente versus a razão corrente/concentração, o valor encontrado ($K_m^{\text{ap}} = 15,9 \mu\text{mol L}^{-1}$) é muito próximo do encontrado pelo gráfico duplo-recíproco. A vantagem do uso deste método é a simplicidade, visto que o valor de K_m é a inclinação da curva; além disso, os desvios da linearidade que podem não ser aparente em um gráfico duplo-recíproco são amplificados⁴⁵.

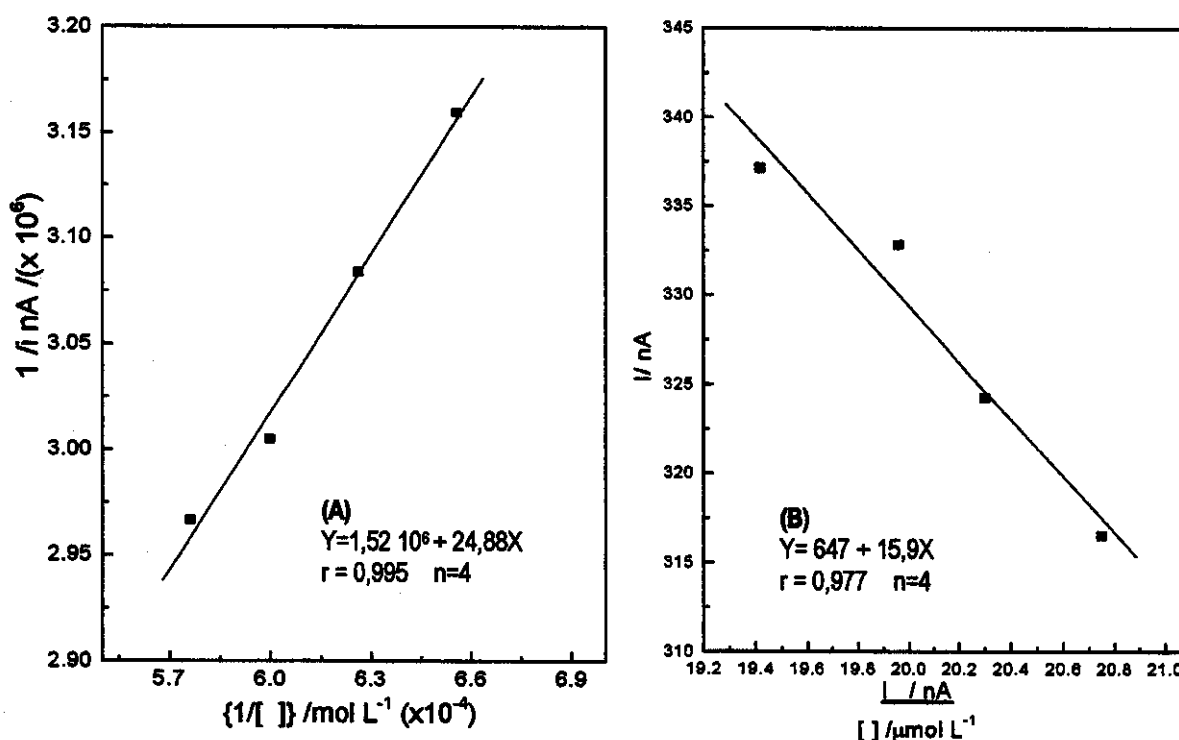


Figura IV.12 - (A) Gráfico de Lineweaver-Burk, duplo-recíproco da corrente vs concentração de salicilato e (B) Gráfico de Eadie-Hofstee, Corrente vs a razão corrente/[salicilato].

IV.3.13. Aplicação em Amostras Reais

Os valores encontrados para o salicilato em amostras de medicamentos e urina com o biossensor aqui desenvolvido foram concordantes com os valores

encontrados através do método de Trinder (British Pharmacopoeia, Her Majesty's Stationary Office, London, 733 (1980))⁴¹, como pode ser visto na Tabela IV.5.

Tabela IV.5: Resultados obtidos para o biossensor e método de referência.

Fármaco	Quantidade encontrada mg/tablete (ácido acetil salicílico)	
	<i>Biossensor*</i>	<i>Método de referência*</i>
I	85 ± 3	81 ± 1
II	81 ± 2	83 ± 5
III	80 ± 2	75 ± 1
Urina	Quantidade encontrada mg/ml (salicilato)	
	<i>Biossensor*</i>	<i>Método de referência*</i>
AMI	416 ± 12	419 ± 5
AMII	355 ± 11	366 ± 5

* - os valores encontrados correspondem à média e seus desvios de medidas em triplicata.

Aplicando o teste t no nível de confiança de 95%, verifica-se que não há diferença significativa nos dois métodos. Estes resultados mostram o bom desempenho do biossensor nas determinações de salicilato, indicando que o mesmo pode ser aplicado na determinação de salicilato em amostras de fármacos e urina. Ressalta-se ainda a facilidade das análises realizadas com o biossensor em relação ao método de referência, pois no método de referência é necessário, além do uso de reagente cromogênico ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$), o uso de cloreto mercúrico e ácido clorídrico, que são usados para precipitar proteínas, no caso de amostras biológicas.

IV. 4. CONCLUSÕES

Os biossensores preparados com fibras de carbono de alto módulo mostraram bons resultados exceto o biossensor 5, porém a fibra utilizada na construção deste é de alto módulo, ou seja, apresenta um elevado grau de alinhamento carbono-carbono, ligados paralelamente na direção axial da fibra. O processo de transferência de elétrons nas fibras ocorre preferencialmente com orientação lateral¹, o qual explica porque as fibras de alto módulo apresenta de maneira geral melhor performance. Este fato demonstra que o processo de imobilização também é importante para obter um biossensor com bom desempenho.

O biossensor aqui descrito resulta em um método com baixo limite de detecção e alta sensibilidade. A amplificação do sinal difere o biossensor desenvolvido dos demais citados na literatura, sendo que, o ponto chave deste método é a não necessidade da utilização de um outro sistema acoplado (como a utilização de uma segunda enzima) para que o sinal possa ser amplificado.

O fato da amplificação do sinal explica a alta sensibilidade do biossensor, além da necessidade de uma razão salicilato/NADH de aproximadamente 500 para obter o máximo de sinal. Já para os biossensores descritos na literatura esta razão é de aproximadamente 4¹⁸. Um comportamento similar, para todos os biossensores de fibra de carbono desenvolvidos, foi verificado indicando que o processo catalítico é responsável por este fato.

Ressalta-se ainda que o comportamento das diferentes fibras no processo de amplificação do sinal foi o mesmo, isto sugere que diferentes fibras de carbono podem ser usadas na construção de biossensores para salicilato.

Outro ponto de muita importância é a possibilidade da utilização da reação catalítica para determinação de NADH, isto é, utilizando eletrodos de fibras de carbono em presença de catecol que é oxidado na superfície do eletrodo, a ortoquinona formada é reduzida pelo NADH, desta forma o NADH é determinado indiretamente.

Em relação à aplicação do biossensor em amostras reais, obteve-se bons resultados, os quais não apresentam diferenças significativas quando comparados ao método de referência. Além disso, a metodologia proposta possui como vantagens a altíssima sensibilidade, baixo limite de detecção, a rapidez e o não uso de reagentes cromogênicos.

IV. 5. REFERÊNCIAS

1. Csöregi, E.; Gorton, L. e Marko-Varga, G.; "Carbon Fibres as Electrode Materials for the Construction of Peroxidase-Modified Amperometric Biosensors", *Anal. Chim. Acta* **1993**, 273, 59.
2. Tamiya, E.; Sugiura, Y.; Navera, E. N.; Mizoshita, S.; Nakajima, K.; Akiyama, A. e Karube, I., "Ultramicro Acetylcholine Sensor Based on an Enzyme-Modified Carbon-Fiber Electrode", *Anal. Chim. Acta* **1991**, 251, 129.
3. Shram, N. F.; Netchiporouk, L. I.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N.; Bonnet, C. e Cespuglio, R.; "In Vivo Voltammetric Detection of Rat Brain with Carbon Fiber Microelectrode Coated with Lactate Oxidase", *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2618.
4. Zhang X. J.; Wang, J.; Ogorevc, B. e Spichiger U. E.; "Glucose Nanosensor Based on Prussian-Blue Modified Carbon-Fiber Cone Nanoelectrode and an Integrated Reference Electrode", *Electroanalysis* **1999**, 11, 945.
5. Ju, H. X.; Dong, L. e Chen, H. Y.; "Amperometric Determination of Lactate Dehydrogenase Based on a Carbon Fiber Microelectrode Modified Covalently with Toluidine Blue O by Acylation", *Talanta* **1996**, 43, 1177.
6. Ju, H. X.; Dong, L. e Chen, H. Y.; "Electrochemical Behavior of Toluidine Blue O Covalently Modified Microcylinder Carbon Fiber Electrode and Amperometric Determination of Hemoglobin in Whole Blood", *Anal. Lett.* **1996**, 29, 587.
7. Frew, J.E.; Bayliff S. W.; Gibbs, P. N. B. e Green, M. J.; "Amperometric Biosensor for the Rapid Determination of Salicylate in Whole Blood", *Anal. Chim. Acta* **1989**, 224, 39.
8. Bing-Sheng, Y.; Li-Hua, N. e Shou-Zhuo, Y.; "Ion Chromatographic Determination of Salicylate in Human Serum with a Bulk Acoustic Wave Sensor as Detector", *J. High Resol. Chromatogr.* **1997**, 20, 227.
9. McDonald, R. P.; "Standard Methods of Clinical Chemistry", vol.5, Academic Press, New York, 1965, p.237.
10. Rover Junior, L.; Garcia, C. A. B.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T. e Galembeck, F.; "Acetylsalicylic Acid Determination in Pharmaceutical Samples by FIA-

- Potentiometry Using a Salicylate-Sentive Tubular Electrode with an Ethylene-Vinyl Acetate Membrane", *Anal. Chim. Acta* **1998**, 336,103.
11. Katsu, T. e Mori, Y.; "Ion-Selective Electrode for Salicylate Assay in Blood Serum", *Talanta* **1996**, 43, 755.
12. Liu, D.; Chen, W-C.; Shen, S-L. e Yu, R-Q.; "Polymeric Membrane Salicylate-Sensitive Electrodes Based on Organotin (IV) Carboxylates", *Analyst* **1996**, 121, 1495.
13. Li, Z-Q; Song, X-P; Shen, G-L. e Yu, R-Q.; "Salicylate-Selective Membrane Electrodes Based on Tribenzyltin (IV) Phenolates as Neutral Carriers", *Anal. Lett.* **1998**, 31, 1473.
14. Ying M.; Yuan, R.; Li, Z-Q.; Song, Y-Q.; Shen, G-L e Yu, R-Q.; "Salicylate-Sensitive Membrane Electrode Based on Copper (II) Tetraaza[14]Annulene Macrocyclic Complex", *Anal. Lett.* **1998**, 31, 1965.
15. Li, J-Z.; Pang, X-Y; Gao, D. e Yu R.Q.; "Salicylate-Selective Based on Lipophilic Tin (IV) Phthalocyanine"; *Talanta* **1995**, 42, 1775.
16. Fonong, T. e Rechmitz, G. A, "Enzyme Electrode for the Determination of Salicylate", *Anal. Chim. Acta* **1984**,158, 357.
17. Kubota, L. T.; Milagres, B. G.; Gouvea, F. e Oliveira Neto, G.; "A Modified Carbon Paste Electrode with Silica Gel Coated with Meldola's Blue and Salicylate Hydroxylase as a Biosensor for Salicylate", *Anal. Lett.* **1996**, 29, 893.
18. Milagres, B., G.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L.T. e Yamanaka, H.; "A New Amperometric Biosensor for Salicylate Based on Salicylate Hydroxylase Immobilized on Polypyrrole Film Doped with Hexacyanoferrate", *Anal. Chim. Acta.*; **1997**, 347, 35.
19. Kubota, L. T.; Kleinke, M. U., Mello, C.; Bueno, M. I.; Oliveira Neto, G.; "Experimental Evidence of the Chaotic Regime in a Salicylate Biosensor", *Chem. Phys. Lett.*, **1997**, 264, 662.
20. Rover Junior, L.; Oliveira Neto, G.; Fernandes, J. R. e Kubota, L. T.; "Determination of Salicylate in Blood Serum Using an Amperometric Biosensor Based on Salicylate Hydroxylase Immobilized in a Polypyrrole – Glutaraldehyde Matrix", *Talanta* **2000**, 51, 547.

21. Rahni, M. A. N.; Guilbault; G. G. e Oliveira Neto, G.; "Immobilized Enzyme Electrode for the Determination of Salicylate in Blood Serum", *Anal. Chim. Acta* **1986**, 181, 219.
22. Bertocchi, P., D'Ottavo, D.; Evangelisti, M. E.; Maseini, M. e Palleschi, G., "A Flow-Through System for the Determination of Salicylate in Blood", *Clin. Chim. Acta*, **1992**, 207, 205.
23. Neumayr, M.; Sontag, G. e Pittner, "Enzymatic Sensor Coupled to a Flow-Injection Analysis System for the Determination of Salicylate", *Anal. Chim. Acta* **1995**, 305, 26.
24. Zhou, D. M.; Nigam, P.; Jones, J. e Marchant, R.; "Production of *Salicylate Hydroxylase* from *Pseudomonas Putida* UUC-1 and its Application in the Construction of a Biosensor", *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1995**, 64, 331.
25. Ehrendorfer, G.; Sontag, G. e Pittner, "Determination of Salicylate in Beverages and Cosmetics by Use of an Amperometric Biosensor", *Fresenius J. Anal. Chem.* **1996**, 356, 75.
26. Martin, C. e Dominguez, E.; "A New Enzyme Electrode for Quantification of Salicylic Acid in a FIA System", *J. Pharm. Bio. Anal.* **1999**, 19, 107.
27. Moore, T.J.; Joseph, M. J.; Allen, B. W. e Jr. Coury, L. A.; Enzymatically Amplified Voltammetric Sensor for Microeliter Sample Volumes of Salicylate", *Anal. Chem.*; **1995**, 67, 1896.
28. Bouvrette, P. e Luong, J. H. T., "A Coupled Enzymatic Assay for Salicylate and Acetylsalicylate Using Salicylate Hydroxylase and Tyrosinase" *Anal. Chim. Acta* **1996**, 335, 169.
29. Morris, H. C.; Overton, P. D. Ramsay, J. R.; Campbell, R. S.; Hammond, P.M.; Atkinson, T. e Price, C. P., "Development And Validation of an Automated, Enzyme-Mediated Colorimetric Assay of Salicylate in Serum" *Clin. Chem.* **1990**, 36, 131.
30. Rivas, G. A. e Galatayud, J. M., "FIA-AAS Determination o Salicylate by a Solid Phase Reactor of Copper Carbonate Incorporated in Polyester Resin Beads". *Talanta* **1995**, 42, 1285.

31. Zhu, G. Y. e Yang, J. H.; "A Rapid Fluorometric Method for the Determination of Salicylic Acid in Serum and Urine", *Anal. Lett.* **1984**, 17, 1827.
32. Garrigues, S.; Gallignani, M. e Delaguardia, M. "Simultaneous Determination of Acetylsalicylic Acid and Caffeine in Pharmaceuticals by Flow Injection with Fourier Transform Infrared Detection" *Talanta*, **1993**, 40, 1799.
33. Pirola, R.; Bareggi, S. R. e Debeneditis, G., "Determination of Acetylsalicylic Acid and Salicylic Acid in Skin and Plasma by High-Performance Liquid Chromatography" *J. Chromatogr.-B* **1998**, 705, 309.
34. McMahon, G. P. e Kelly, M. T., "Determination of Aspirin and Salicylic Acid in Human Plasma by Column-Switching Liquid Chromatography Using On-Line Solid-Phase Extraction", *Anal. Chem.* **1998**, 70, 409.
35. Goto, Y., Makino, K., Kataoka, Y.; Shuto, H. e Oishi, R., "Determination of Salicylic Acid in Human Serum with Capillary Zone Electrophoresis", *J. Chromatogr-B* **1998**, 706, 329.
36. Fogg, A. G.; Ali, M. A. e Abdalla, M.A., On-line Bromimetric Determination of Phenol, Aniline, Aspirin and Ionized Using Injection Voltammetry", *Analyst*, **1983**, 108, 840.
37. Evans, D.; Hart, J. P. e Rees, G., "Voltammetric Behaviour of Salicylic Acid at a Glassy Carbon Electrode and its Determination in Serum Using Liquid Chromatography with Amperometric Detection" *Analyst*, **1991**, 116, 803.
38. Fung, Y. S. e Luk, S. F., "Determination of Salicylic Acid in Pharmaceutical Formulations and Foods by Differential-Pulse Voltammetry Using a Glassy Carbon Electrode. *Analyst*, **1989**, 114, 943.
39. Oliveira Neto, G.; Rover Junior, L. e Kubota, L. R.; "Electrochemical Biosensors for Salicylate and its Derivatives", *Electroanalysis* **1999**, 11, 527.
40. Kafil, J. B. e Last, T. A.; "Liquid Chromatography with Voltammetric Detection for Quantitation of Phenolic Acids", *J. Chromatogr.* **1985**, 348, 397.
41. British Pharmacopeia, "Her Majesty's Stationary Office", London, 1980, p. 733.
42. White-Stevens, R. H. e Kamin, H.; "Studies of a Flavoprotein, Salicylate Hydroxylase", *J. Bio. Chem.*, **1972**, 247, 2358.

43. Rover Jr., L.; Fernandes, J. C. B.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T.; Katekawa, E. e Serrano, S. H. P.; "Study of NADH Stability Using Ultraviolet-Visible Spectrophotometric Analysis and Factorial Design", *Anal. Biochem.*, **1998**, 260, 50.
44. Hayes, M. A.; Kristensen, E. W. e Kuhr, W. G.; "Background-Substration of Fast-Scan Cyclic Staircase Voltammetry at Protein-Modified Carbon-Fiber Electrodes", *Biosens e Bioelectron*, **1998**, 13, 1297.
45. Lehninger, A. L.; "*Bioquímica – Componentes Moleculares*", 2 ed. Edgard Blucher, São Paulo, v. 1, 1976, pp. 133.

Capítulo V

V. CONCLUSÕES GERAIS

Das muitas vantagens obtidas quando as fibras de carbono são usadas como material eletródico, pode-se destacar a possibilidade de construção de eletrodos na ordem de micrômetros, os quais possuem inúmeras vantagens. Embora no trabalho em questão, os eletrodos desenvolvidos não eram da ordem de micrômetros, mas sim a junção de vários ultramicroeletrodos, já que os mesmos foram confeccionados com cerca de 50 a 100 fibras de carbono. Pode-se destacar aqui as vantagens do uso das fibras de carbono na construção de biossensores.

Em relação aos resultados obtidos neste trabalho, pode-se destacar inúmeros pontos como os bons resultados obtidos com a nova metodologia proposta para o pré-tratamento das fibras, onde um simples e rápido método foi suficiente para melhorar a performance eletroquímica das fibras de carbono, obtendo-se uma resposta para hexacianoferrato similar à observada para sistemas reversíveis. A camada de óxido de titânio formada com o tratamento é bastante estável, por aproximadamente 3 meses com um mínimo de 500 ciclos voltamétricos; além disso, a melhora na resposta eletroquímica foi grande. Estes fatos, juntamente com a boa reprodutibilidade e grande eficiência do procedimento aqui proposto, mostram um excelente potencial para preparação de eletrodos de fibras de carbono em uma forma reprodutível. A eficiência da metodologia de pré-tratamento aqui proposta foi mais uma vez testada quando sensores para determinação de catecol e hidroquinona foram construídos.

A determinação simultânea destes isômeros fenólicos utilizando voltametria de pulso diferencial e métodos de calibração multivariada, fazendo-se uso de eletrodos de fibras de carbono tratadas com TiCl_4 , mostrou-se uma boa metodologia. Embora a faixa de concentração na qual o método pode ser aplicado seja um pouco alta e restrita ($1,0 \cdot 10^{-4} - 6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), cabe salientar que esta metodologia poderá ser aplicada a medidas de compostos fenólicos em vesículas, visto que a concentração de catecolaminas é bastante alta.

Os estudos realizados indicaram que, dos métodos quimiométricos utilizados, a rede neural com apodização mostrou-se um pouco melhor na determinação da hidroquinona. Porém, na determinação do catecol, os erros obtidos são similares tanto para PLS1 e PLS2 como para rede neural. Além disso, pode-se verificar que a sobreposição dos picos voltamétricos e a resposta não linear do sistema tornam impossível modelar o sistema com métodos univariados.

Outro importante ponto foi a estabilidade do sensor indicando que o óxido de titânio e a varredura catódica contribuíram para minimizar a passivação do eletrodo, pois eletrodos de carbono sempre estão sujeitos à passivação quando compostos fenólicos são oxidados e/ou reduzidos sobre suas superfícies.

Dos biossensores construídos para determinação de salicilato, através da imobilização da enzima *salicilato hidroxilase* em diferentes fibras, também se verificou diversos pontos importantes. Dentre eles, destaca-se que o tipo de fibra utilizado é importante na transferência de elétrons. Entretanto o processo de imobilização também é importante para obter um biossensor com bom desempenho. O processo de amplificação de sinal no eletrodo de fibra aumenta a sensibilidade sem a necessidade da adição de reagentes. Ressaltando, o comportamento das diferentes fibras no processo de amplificação do sinal foi o mesmo, sugerindo que diferentes fibras podem ser usadas na construção de biossensores para salicilato.

Outro ponto de suma importância que deve ser destacado é a possibilidade da utilização da reação catalítica para determinação de NADH, isto é, utilização de fibras de carbono em presença de catecol, que é oxidado na superfície do eletrodo à ortoquinona e esta por sua vez é reduzida pelo NADH.

O biossensor que apresentou melhor performance foi o construído com fibras Toray – T800. O mesmo mostrou uma alta sensibilidade, um excelente tempo de resposta e uma ampla faixa de resposta. Este biossensor foi aplicado em amostras reais e os resultados obtidos foram satisfatórios.

Finalmente, é ainda possível vislumbrar um futuro promissor para os eletrodos construídos a partir deste tipo de material para diversas aplicações, tais como em análises clínicas, ambientais, farmacêuticas, controle de processos

industriais, medidas *in vivo* e *in vitro* e como detectores em sistemas de análises em fluxo, cromatografia líquida e eletroforese capilar.

IV.6.1. Perspectivas futuras

Das várias e boas características das fibras de carbono, que foram citadas anteriormente nesta tese, as quais muitas foram aproveitadas e investigadas, pode-se ainda sugerir uma série de propostas que fazem uso das diversas características peculiares das fibras de carbono. Sugere-se, então: a construção de sensores modificados para análises *in vivo*. Principalmente o desenvolvimento de ultramicrosensores, os quais possuem características bastantes peculiares e são ideais para serem colocados diretamente em preparações biológicas com um mínimo de dano nos tecidos. Além de eletrodos modificados, sugere a possibilidade de imobilização de outras enzimas, permitindo o desenvolvimento de diferentes tipos de biossensores.