



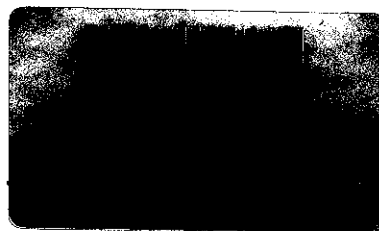
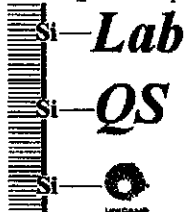
UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Laboratório de Química de Superfície

Laboratório de Química de Superfície



***Óxido de nióbio enxertado sobre a superfície da sílica
gel: Preparação e utilização na construção de eletrodos
modificados***

TESE DE DOUTORADO

Aluna: Christiana Andrade Pessoa

Orientador: Yoshitaka Gushikem

Campinas – SP

Novembro / 2001

"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita."

(Mahatma Gandhi)

À minha família querida

Aos meus pais

Arnaldo e Martha

Pelo apoio incondicional

E conforto nas horas difíceis

Às minhas irmãs

Camilla e Lourdinha

Aos meus xodozinhos

Dudinha e Bernardo

Ao

Toshiozinho,

Por todo “amor, carinho e compreensão”.

Dedico esta tese

Agradecimentos

- ☛ Ao Professor Yoshitaka Gushikem, um grande exemplo de amor e dedicação à pesquisa científica, pela orientação, amizade e preocupação constante com o crescimento profissional dos seus alunos.
- ☛ Ao Prof. Lauro T. Kubota pelas discussões eletroquímicas
- ☛ A todo pessoal do laboratório: Ana Mauricéia, Akira, Angélica, Almir, Alexandre, César, Cláudia, Claudemir, Emerson, Ilauro, Lincoln, Neusa, Sílvia, Simone, Suzana, Vanusa, William.
- ☛ À Lucila por me aguentar por tanto tempo como companheira de república e às amigas Iara e Noemi.
- ☛ A todos os técnicos do Instituto sem os quais não seria possível realizar este trabalho.
- ☛ Ao pessoal da CPG.
- ☛ Ao pessoal da biblioteca do Instituto de Química.
- ☛ Ao CNPq pela bolsa concedida e à FAPESP pelo suporte financeiro

Obrigada!!!

RESUMO

Título: *“Óxido de nióbio enxertado sobre a superfície da sílica gel: Preparação e utilização na construção de eletrodos modificados”*

Autora: Christiana Andrade Pessoa

Orientador: Prof. Dr. Yoshitaka Gushikem

Palavras chave: sílica-nióbio, porfirina, ferrocenocarboxílico, eletrodo de pasta de carbono

Neste trabalho, utilizou-se a sílica modificada com o óxido de nióbio, SiNb, como matriz para imobilização de diferentes compostos que apresentam grupos carboxílicos em sua estrutura. Primeiramente, foram imobilizadas sobre SiNb três porfirinas: a hematoporfirina IX, protoporfirina IX e a tetracarboxifenilporfirina. Estas porfirinas quando imobilizadas foram facilmente metaladas com Co(II), o que pode ser observado através dos espectros de UV- Visível. A hematoporfirina e protoporfirina de cobalto imobilizadas sobre SiNb apresentaram a capacidade de eletrocatalisar a redução de oxigênio respectivamente a um potencial de -0,18 V e -0,16 V vs ECS, em pH 6,8. A corrente variou linearmente com a concentração de oxigênio de 2-12 mg L⁻¹, para ambos os eletrodos. Os potenciais de redução do O₂ permaneceram constantes entre os pH 2 a 7, tornando estes eletrodos potencialmente úteis para a construção de novos sensores para determinação de O₂ dissolvido. Estudos utilizando-se eletrodo de disco rotatório indicaram que a redução do oxigênio sobre tais eletrodos ocorre segundo um mecanismo de quatro elétrons, no qual o O₂ é reduzido a H₂O. A cobalto

tetracarboxifenilporfirina imobilizada sobre SiNb, por outro lado, não eletrocatalisou com eficiência a redução de O_2 . Esta, entretanto, apresentou a propriedade de eletrocatalisar a oxidação de hidrazina, a um potencial de 0,40 V vs SCE, em pH 7. A corrente apresentou-se linear com a concentração na faixa de $1,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} .

Em uma segunda etapa, imobilizou-se o ácido ferroceno carboxílico sobre SiNb. Este apresentou uma considerável estabilidade sobre tal matriz. O ferroceno imobilizado apresentou a propriedade de eletrocatalisar a oxidação da coenzima NADH. Estudos realizados utilizando-se eletrodo de disco rotatório, indicaram que a reação entre o ferroceno imobilizado e o NADH, ocorre com a formação de um intermediário radicalar $NADH^{0+}$, numa reação similar a observada na literatura para derivados de ferroceno em eletrodos de grafite.

ABSTRACT

Title: *"Niobium oxide grafted on silica gel surface: Preparation and application for the construction of modified electrodes "*

Author: Christiana Andrade Pessôa

Supervisor: Prof. Dr. Yoshitaka Gushikem

Key words: silica-niobium, porphyrin, ferrocenemonocarboxylic, carbon paste electrode.

In this work, the niobium oxide grafted on silica gel surface, designated as SiNb, was used as a matrix for the immobilization of different compounds which have carboxylic groups in their structure. Firstly, three porphyrins were immobilized on SiNb: hematoporphyrin IX, protoporphyrin IX and tetracarboxyphenylporphyrin. These immobilized porphyrins were easily metallated with Co(II), which were confirmed by UV-Vis spectra. The cobalt (II) hematoporphyrin IX and protoporphyrin IX on SiNb, when incorporated in carbon paste electrodes, presented the property of electrocatalyze the dioxygen reduction at -0.18 V and -0.16 V vs SCE, respectively. The cathodic peak potential remained practically constant between pH 4 and 7. The current intensities for a fixed negative potential changed linearly with dissolved dioxygen concentration between 2 and 12 mg L^{-1} . Rotating disk electrode experiments showed that dioxygen reduction occurs by a mechanism that involves four electrons, where the oxygen is reduced to water at the electrode solid-solution interface.

The cobalt tetracarboxyphenylporphyrin, unlike the other two porphyrins, didn't electrocatalyze efficiently the dioxygen reduction. However, this immobilized porphyrin

catalyze the hydrazine oxidation at 0.40 V vs SCE, pH 7. Plotting the current peak intensities against hydrazine concentrations, a linear response was obtained from $1,0 \times 10^{-5}$ to $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Likewise the porphyrins, the ferrocenecarboxylic acid was efficiently immobilized on Nb₂O₅ grafted on silica gel surface. This modified electrode presented the property of mediating the coenzyme NADH oxidation. Kinetic studies using rotating disk electrodes indicated that the reaction between the immobilized ferrocene and NADH occurs with the formation of a NADH⁰⁺ radical as an intermediate, a reaction similar to those observed in the literature for other ferrocene derivatives on graphite electrodes.

Curriculum Vitae

1. Pós Graduação

- Doutorado em Química, na área de Química Inorgânica - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP (setembro de 1997 a novembro 2001).

Título da tese: *"Óxido de nióbio enxertado sobre a superfície da sílica gel: Preparação e utilização na construção de eletrodos modificados."*

Orientador: Prof. Yoshitaka Gushikem

- Mestrado em Química, na área de de Química Inorgânica - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP (março de 1995 a julho de 1997)

Título da dissertação: *"Estudos eletroquímicos de corantes orgânicos com propriedades redox imobilizados sobre o fosfato de zircônio"*

Orientador: Prof. Dr. Yoshitaka Gushikem

2. Formação superior

- Bacharelado em Química - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP (1991 a 1994)

3. Trabalhos publicados

- C. A. Pessoa, Y. Gushikem, L.T. Kubota, "Electrochemical study of methylene blue immobilized on zirconium phosphate", *Electroanalysis*, 9 (1997) 800.

- C. A. Pessoa, Y. Gushikem, L. T. Kubota, L. Gorton, "Preliminary electrochemical study of phenothiazines e phenoxazines immobilized on zirconium phosphate", *J. Electroanal. Chem.*, 431 (1997).

- C. A. Pessoa, Y. Gushikem, "Cobalt (II) metallated hematoporphyrin IX and protoporphyrin IX immobilized on niobium (v) grafted on silica gel surface: Electrochemical studies", *J. Electroanal. Chem.*, 477 (1999) 158.
- C. A. Pessoa, Y. Gushikem, L. T. Kubota, "Ferrocenecarboxylic acid adsorbed on Nb₂O₅ film grafted on SiO₂ surface: The NADH oxidation study", *Electrochim. Acta*, 46 (2001) 2499.
- C. A. Pessoa, Y. Gushikem, "Cobalt porphyrins immobilized on niobium (V) oxide grafted on a silica gel surface: Study of the catalytic reduction of dissolved dioxygen", *J Porphyr. Phthalocya.*, 5 (2001) 537.
- C. A. Pessoa, S. Nakagaki, Y. Gushikem, Cobalt Porphyrin Immobilized on a Niobium(V) Oxide Grafted - Silica Gel Surface: Study of the Catalytic Oxidation of Hydrazine, *Electroanalysis*, no prelo.

4. Trabalhos apresentados em congressos e simpósios

- C. A. Pessoa, Y. Gushikem e L. T. Kubota, "Estudo ciclovoltagemétrico do indigo de carmin imobilizado sobre a superfície da sílica gel modificada com o íon piridínio", 19^o Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas-MG (maio/1996).
- C. A. Pessoa, Y. Gushikem e L. T. Kubota, "A utilização de um novo sensor químico construído com o azul de metileno adsorvido sobre um compósito sílica-fosfato de zircônio. estudo da eletrooxidação do ácido ascórbico.", X Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - SIBEE, São Carlos-SP (outubro/1996) – apresentação oral.

- C. A. Pessoa, Y. Gushikem, L. T. Kubota e L. Gorton, "Estudo eletroquímico de corantes redox imobilizados sobre o fosfato de zircônio", 20^º Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas-MG (maio/1997).
- C. A. Pessoa, Y. Gushikem, L. T. Kubota e L. Gorton, "Biossensor para peróxido a base de fosfato de zircônio com corantes redox e peroxidase co-imobilizados", X Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA, São Carlos - SP, (setembro/1997) - apresentação oral
- C. A. Pessoa e Y. Gushikem, "Protoporfirina de cobalto imobilizada sobre sílica modificada com óxido de nióbio: preparação e propriedade eletrocatalíticas", 22^º Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas -MG (maio/1999).
- C. A. Pessoa e Y. Gushikem, "Niobium oxide thin film grafted on silica gel surface: porphyrins immobilization and electron transfer properties", 50th ISE 99 - International Society of Electrochemistry, 5-9 setembro 1999, Pavia -Italia.
- C. A. Pessoa, Y. Gushikem e L. T. Kubota, "Estudo das propriedades eletroquímicas do ferroceno monocarboxílico sobre a sílica gel modificada com o óxido de nióbio", 23^º Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas-MG (maio/2000)
- C. A. Pessoa, A. M. Castellani e Y. Gushikem, "Utilização de matrizes inorgânicas modificadas com porfirinas para a construção de sensores de oxigênio", XL Congresso Brasileiro de Química, 23-26 outubro 2000 - Recife – PE.
- C. A. Pessoa, S. Nakagaki e Y. Gushikem, "Porfirina de cobalto imobilizada sobre Nb₂O₅/SiO₂: Estudo eletrocatalítico da oxidação de hidrazina", XI Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA, Campinas – SP (setembro/2001)

5. Atividades didáticas

- Auxiliar Didático em "QG 564- Química Orgânica e Inorgânica Experimental", 1^o semestre de 1997.
- Auxiliar didático em "QG 564- Química Orgânica e Inorgânica Experimental", 1^o semestre de 1998.
- Auxiliar didático em "QG 564- Química Orgânica e Inorgânica Experimental", 1^o semestre de 2000.
- Participação no Programa de Estágio Docente do Grupo II (PED-GII) atuando como auxiliar didático na disciplina de "QG 650- Química Orgânica e Inorgânica Experimental", 2^o semestre de 2000.
- Participação no Programa de Estágio Docente do Grupo I (PED-GI) atuando como docente nas disciplinas de "QG100 e QG102- Química Geral Experimental", 1^o semestre de 2001.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xxiii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xxix
PRINCIPAIS SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xxxi
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
1.1. Modificação da sílica com óxidos metálicos.....	1
1.1.1. Sílica gel modificada com óxido de nióbio	3
1.2. Eletrodos Quimicamente Modificados (EQMs)	5
1.3. Eletrodos de pasta de carbono modificados com sílica gel.....	9
1.3.1. Utilização da sílica gel modificada com óxidos metálicos para construção de eletrodos de pasta de carbono.....	11
1.4. Espécies mediadoras de elétrons imobilizadas sobre a $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$ para construção de eletrodos modificados.....	15
1.4.1. Porfirinas e Metaloporfirinas	15
1.4.1.1. Caracterização das porfirinas e metaloporfirinas: Espectroscopia na região do UV-Visível	17
1.4.2. Ferroceno.....	19
1.5. Técnicas eletroquímicas utilizadas para o estudo dos eletrodos quimicamente modificados.....	21
1.5.1. Voltametria cíclica.....	21
1.5.2. Voltametria de pulso diferencial	24
1.5.3. Voltametria de disco rotatório.....	26
1.5.4. Cronoamperometria	29
 2. OBJETIVOS.....	 31

3. PARTE EXPERIMENTAL	32
3.1. Preparação da sílica nióbio (SiNb).....	32
3.2. Imobilização e metalação das porfirinas sobre a SiNb.....	33
3.2.1. Determinação da quantidade de cobalto incorporado na estrutura das porfirinas	33
3.2.2. Obtenção dos espectros eletrônicos	34
3.3. Imobilização do ácido ferrocenomonocarboxílico	35
3.4. Preparação dos eletrodos de pasta de carbono	35
3.5. Medidas eletroquímicas	36
3.5.1. Redução eletrocatalítica de oxigênio (eletrodos utilizados: SiNb/CoPP e SiNb/CoHMP)	38
3.5.2. Oxidação eletrocatalítica de hidrazina (eletrodo utilizado: SiNb/CoTCPP) ...	39
3.5.3. Oxidação eletrocatalítica de NADH (eletrodo utilizado: SiNb/FeCp ₂ COOH). 39	
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Síntese da sílica modificada com o óxido de nióbio (SiNb).....	41
4.2. Imobilização e metalação das porfirinas sobre a SiNb.....	42
4.2.1 Caracterização das porfirinas imobilizadas por espectroscopia na região UV-Visível	44
4.3. Estudos eletroquímicos das porfirinas imobilizadas.....	47
4.3.1. Estudo da redução eletrocatalítica de oxigênio dissolvido nos eletrodos modificados SiNb/CoPP e SiNb/CoHMP	48
4.3.1.1. Estudos de voltametria cíclica e de pulso diferencial	48
4.3.1.2. Estudos com eletrodo de disco rotatório	57
4.3.1.3. Estudo da potencialidade dos eletrodos modificados SiNb/CoPP e SiNb/CoHMP como sensores para O ₂ dissolvido- Estudos amperométricos.....	60
4.3.2. Estudo da oxidação eletrocatalítica da hidrazina sobre o eletrodo modificado SiNb/CoTCPP.....	65
4.3.2.1. Estudos de voltametria cíclica.....	66

4.3.2.2. Estudos amperométricos.....	68
4.4. Imobilização do ácido ferroceno monocarboxílico sobre a SiNb.....	72
4.4.1. Estudos eletroquímicos utilizando-se o eletrodo modificado com SiNb/FeCp ₂ COOH- Estudos de voltametria cíclica.....	72
4.4.2. Oxidação eletrocatalítica do NADH.....	77
4.4.2.1. Estudos amperométricos.....	78
4.4.2.2 Estudos com eletrodo de disco rotatório- Estudo da cinética da reação entre o ferroceno imobilizado e o NADH.....	81
5. CONCLUSÕES.....	85
6. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

	pg.
Figura 1. Interface eletrodo-solução para um EQM na presença apenas da solução do eletrólito suporte.	6
Figura 2. Oxidação eletrocatalítica de um determinado substrato pelo eletrodo quimicamente modificado.	7
Figura 3. Número de publicações por ano baseadas em eletrodos modificados com sílica.	10
Figura 4. Estrutura básica das porfirinas.	15
Figura 5. Espectro eletrônico típico das porfirinas não metaladas.	18
Figura 6. Representação das transições eletrônicas das porfirinas (simetria D_{2h}) e metaloporfirinas (simetria D_{4h}).	19
Figura 7. Voltamograma cíclico típico de espécies redox em solução e os principais parâmetros obtidos a partir deste.	23
Figura 8. Voltametria de pulso diferencial (a) Curva potencial-tempo (b) Perfil da curva de corrente versus potencial.	26
Figura 9. Diagrama mostrando o fluxo da solução na superfície e abaixo do eletrodo de disco rotatório.	27
Figura 10. Esquema do eletrodo de pasta de carbono.	36
Figura 11. Esquema da cela eletroquímica utilizada.	37
Figura 12. Esquema do eletrodo de disco rotatório.	38
Figura 13. Porfirinas imobilizadas sobre a SiNb.	42
Figura 14. Esquema de imobilização e metalação das porfirinas.	43

Figura 15. Espectros de UV-Vis da hematoporfirina (A) e protoporfirina (B): a) em solução, b) imobilizada sobre SiNb e c) após a metalação com Co(II). 45

Figura 16. (A) Espectros de UV-Vis tetracarboxifenilporfirina: a) imobilizada sobre SiNb e b) após a metalação com Co(II). (B) Deconvolução do espectro b na faixa de 500 a 600 nm. 47

Figura 17. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se eletrodo de pasta de carbono modificado com (A) SiNb/CoHMP na ausência de O₂, (B) SiNb/CoHMP na presença de O₂, (C) SiNb e (D) SiNb/H₂HMP na presença de O₂. Eletrólito suporte: KCl 1,0 mol L⁻¹, pH 6,8 e $v=20$ mVs⁻¹. 49

Figura 18. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos utilizando-se o eletrodo modificado com SiNb/CoHMP. As setas indicam a direção de varredura de potencial. 51

Figura 19. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura utilizando-se os eletrodos modificados (A) SiNb/CoHMP e (B) SiNb/CoPP. Figura inserida: Relação entre I_{pc} vs $v^{1/2}$. 52

Eletrólito suporte: KCl 1,0 mol L⁻¹, pH 6,8. 53

Figura 20. Influência do pH no potencial de redução do oxigênio dissolvido: SiNb/CoPP (●) e SiNb/CoHMP (■). 53

Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes concentrações de O₂ utilizando-se os eletrodos modificados (A) SiNb/CoPP e (B) SiNb/CoHMP. Eletrólito suporte: KCl 1,0 mol L⁻¹, pH 6,8 e $v=20$ mVs⁻¹. 55

Figura 22. Corrente de pico catódica em função do número de ciclos: SiNb/CoHMP (■) e SiNb/CoPP (●). Eletrólito suporte: KCl 1,0 mol L⁻¹. 56

Figura 23. (A) Gráfico de Levich e (B) Gráficos de Koutecky-Levich calculados para $n=2$ e $n=4$ e experimental para o eletrodo modificado SiNb/CoHMP. 59

Figura 24: Relação entre a corrente e o potencial aplicado, obtida por cronoamperometria, fixando-se a concentração em $[O_2] = 10 \text{ mg L}^{-1}$: SiNb/CoHMP(■) e SiNb/CoPP(●). 62

Figura 25: Cronoamperograma obtido com o eletrodo modificado SiNb/CoHMP, após sucessivas adições de O_2 , fixando-se o potencial em $-0,25 \text{ V vs ECS}$. Figura inserida: Relação entre corrente e a concentração de O_2 em ppm. Eletrólito suporte: $KCl 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e $pH 6,8$. 63

Figura 26. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se o eletrodo modificado SiNb/CoTCPP na ausência e após adições sucessivas de hidrazina. Concentrações de hidrazina (mol L^{-1}): $a = 0$, $b = 2,0 \times 10^{-4}$, $c = 4,0 \times 10^{-4}$, $d = 6,0 \times 10^{-4}$, $e = 8,0 \times 10^{-4}$, $f = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $KCl 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 20 \text{ mVs}^{-1}$ e (B) Relação entre a corrente de pico anódica, I_{pa} , e a concentração de hidrazina. 66

Figura 27. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se o eletrodo de pasta de carbono modificado com SiNb/TCPP na ausência e presença de hidrazina ($[hidrazina] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Eletrólito suporte: $KCl 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 20 \text{ mVs}^{-1}$. 67

Figura 28: Influência do pH da solução do eletrólito suporte na resposta do eletrodo SiNb/CoTCPP para hidrazina. Potencial aplicado: $0,40 \text{ V vs ECS}$ e $[hidrazina] = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. 68

Figura 29: Relação entre a corrente e o potencial aplicado, obtida por cronoamperometria, para o eletrodo modificado com SiNb/CoTCPP. ($[hidrazina] = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $pH 7$). 69

Figura 30. (A) Cronoamperograma obtido após adições sucessivas de hidrazina, fixando-se o potencial em 0,40 V vs ECS. Figura inserida: Tempo de resposta do eletrodo.

(B) Relação entre a corrente anódica e a concentração de hidrazina na faixa de $1,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Eletrólito suporte: tampão tris 0,1 mol L⁻¹ / KCl 0,1 mol L⁻¹. **70**

Figura 31. Dependência logarítmica da corrente de pico anódica e a concentração de hidrazina. **71**

Figura 32. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura para o eletrodo de pasta de carbono modificado com SiNb/FeCp₂COOH.

Eletrólito suporte: KCl 0,5 mol L⁻¹ e pH 6,8. **73**

Figura 33. Relação entre as correntes de pico anódico e catódico (*I*_{pa} e *I*_{pc}) e a raiz quadrada da velocidade de varredura (*v*^{1/2}). **74**

Figura 34. Estabilidade do eletrodo: relação entre as correntes de pico e o número de ciclos em KCl 1,0 mol L⁻¹ e *v*=20 mVs⁻¹. **75**

Figura 35. Influência do pH no potencial médio, *E*_M, do eletrodo modificado, SiNb/FeCp₂COOH. **77**

Figura 36. Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com (A) SiNb, (B) SiNb/FeCp₂COOH na ausência de NADH e (C) o mesmo que B na presença de NADH, em KCl 0,5 mol L⁻¹, pH 6,8 e *v*=20 mVs⁻¹.

78

Figura 37. Resposta do eletrodo para $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ NADH em diferentes potenciais aplicados, obtida pela técnica de cronoamperometria. **79**

Figura 38. Resposta do eletrodo para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NADH em diferentes pHs. Potencial aplicado $E_{\text{apl}} = 0,35 \text{ V}$ vs ECS. **80**

Figura 39. Curvas de calibração para NADH obtidas utilizando-se o eletrodo modificado SiNb/FeCp₂COOH, em diferentes soluções tampões (TRIS, PIPES e fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). **81**

Figura 40. Gráficos de Koutecky-Levich ($1/i$ vs $1/\omega^{1/2}$) obtidos em diferentes concentrações de NADH. **82**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Área superficial e análise química da SiNb e das porfirinas imobilizadas sobre a SiNb. **44**

Tabela 2. Medidas de O₂ dissolvido em amostras de água potável, utilizando-se o eletrodo de Clark e os eletrodos de pasta de carbono modificados com SiNb/CoHMP e SiNb/CoPP. **64**

Tabela 3. Potenciais médios, E_m , obtidos para o eletrodo modificado com SiNb/FeCp₂COOH em diferentes íons do eletrólito suporte 0,5 mol L⁻¹, $v=20$ mVs⁻¹. **76**

PRINCIPAIS SIGLAS E ABREVIATURAS

CoHMP- hematoporfirina de cobalto

CoPP- protoporfirina de cobalto

CoTCPP- tetracarboxifenilporfirina de cobalto

DPV- voltametria de pulso diferencial

ECS - eletrodo de calomelano saturado

ΔE_p - diferença entre os potenciais de pico

EPC- eletrodo de pasta de carbono

E_m - potencial médio

E_{apl} - potencial aplicado

E_p - potencial de pico

E_{pa} - potencial de pico anódico

E_{pc} - potencial de pico catódico

EQM- eletrodo quimicamente modificado

FeCp₂COOH - ácido ferrocenomonocarboxílico

H₂HMP - hematoporfirina

H₂PP - protoporfirina

H₂TCPP- tetracarboxifenilporfirina

I- corrente

I_p- corrente de pico

I_{pa} - corrente de pico anódico

I_{pc} - corrente de pico catódico

Med_{ox} - mediador oxidado

Med_{red} - mediador reduzido

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo

PIPES- ácido 1,4-piperazina-dietano sulfônico

SiNb (ou SiO₂/Nb₂O₅)- sílica modificada com o óxido de nióbio

SiNb/CoHMP- hematoporfirina de cobalto imobilizada sobre a SiNb

SiNb/CoPP- protoporfirina de cobalto imobilizada sobre a SiNb

SiNb/CoTCPP- tetracarboxifenilporfirina de cobalto imobilizada sobre a SiNb

SiNb/FeCp₂COOH- ferrocenomonocarboxílico imobilizado sobre a sílica modificada com o óxido de nióbio

SiNb/H₂HMP- hematoporfirina imobilizada sobre a SiNb

SiNb/H₂PP- protoporfirina imobilizada sobre a SiNb

SiNb/H₂TCPP- tetracarboxifenilporfirina imobilizada sobre a SiNb

TRIS- tris-hidroximetil-aminometano

UV- Vis- espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível

v^{1/2}- raiz quadrada da velocidade de varredura

1. INTRODUÇÃO

1.1. Modificação da sílica com óxidos metálicos

A superfície da sílica contém grupos silanóis, $\equiv\text{SiOH}$, os quais podem reagir com haletos e alcóxidos metálicos. O desenvolvimento de métodos de preparação de óxidos metálicos dispersos como monocamadas sobre a superfície da SiO_2 , utilizando tais reagentes, tem sido uma área de crescente interesse nos últimos anos. Vários procedimentos experimentais, visando a obtenção de monocamadas dos óxidos metálicos com alta estabilidade térmica, têm sido desenvolvidos [1-11]. Os óxidos metálicos suportados em matrizes sólidas obtidos pelo método de enxerto do reagente na superfície, diferentemente dos óxidos suportados preparados pelos processos de impregnação e co-precipitação, levam a obtenção de superfícies de óxidos, cujas propriedades ácidas estão associadas a uma alta estabilidade térmica e química, as quais não são características do óxido não suportado [12]. Tal procedimento é particularmente vantajoso, devido a formação de uma superfície bastante definida, permitindo dessa forma, um estudo mais preciso do caráter ácido-base dos sítios ativos [13].

Muitos destes materiais têm sido sintetizados com o objetivo de se obter sistemas catalíticos com maior atividade e seletividade, através do controle total da morfologia da superfície. Por esta razão, a maioria dos estudos são realizados no sentido de se obter um melhor entendimento sobre estrutura da superfície modificada com o óxido [2-6,8,9,14-20]. Embora, a SiO_2 seja considerada um material

relativamente inerte, os grupos silanóis superficiais podem reagir de acordo com a seguinte reação:



onde MX_n é um composto ativo do metal (haleto metálico, por exemplo) e $\equiv \text{SiOH}$ corresponde aos grupos silanóis.

Uma hidrólise cuidadosa, leva a formação de uma monocamada do óxido, na qual os metais estão presos à superfície através da ligação $\equiv \text{SiO-M}$. A reação de hidrólise está mostrada abaixo:



Nos óxidos metálicos, M_xO_y , altamente dispersos como monocamadas finas sobre a superfície da SiO_2 (denominados para simplificação como $\text{SiO}_2/\text{M}_x\text{O}_y$), a ligação covalente Si-O-M formada sobre a superfície da sílica, restringe a mobilidade dos óxidos ancorados resultando em óxidos metálicos coordenativamente insaturados (sítios ácidos de Lewis), além dos sítios ácidos de Brönsted. Os sítios ácidos de Brönsted originam-se dos grupos MOH ou SiOH, sendo o último devido aos grupos silanóis que não reagiram. Como os óxidos ancorados estão fortemente imobilizados sobre a superfície, eles são também muito estáveis termicamente. O caráter anfótero de muitos dos óxidos imobilizados à superfície da sílica permite a imobilização de várias espécies químicas, ácidos ou bases, resultando em uma ampla aplicação destes materiais. Dessa forma, além do uso como sistemas catalíticos, tais materiais também têm sido largamente utilizados como adsorventes seletivos [21,22], suporte para

enzimas [23], materiais para coluna de HPLC [24,25] e no desenvolvimento de eletrodos de pasta de carbono para construção de sensores eletroquímicos e biossensores [26-29].

1.1.1. Silica gel modificada com óxido de nióbio

O óxido de nióbio, Nb_2O_5 , é um sólido branco, estável ao ar e insolúvel em água. Sua estrutura é extremamente complexa, apresentando um extensivo polimorfismo [30]. Este apresenta dois tipos distintos de acidez em sua superfície. O primeiro tipo é a acidez de Lewis, que ocorre em átomos do metal coordenativamente insaturados, podendo aceitar um par de elétrons. O segundo tipo é a acidez de Brønsted que ocorre em sítios que podem doar prótons para uma base.

O óxido de nióbio é geralmente empregado como catalisador em inúmeras reações químicas, tais como: redução de NO, desidratação de álcoois, além de reações de isomerização e oxidação [31-35].

A síntese e a caracterização do óxido de nióbio (V) imobilizado sobre a superfície da sílica gel tem sido uma área de crescente interesse nos últimos anos [7,8, 36-41]. Uma monocamada do óxido pode ser formada pela reação de um precursor adequado do nióbio com as hidroxilas superficiais do suporte [3, 4, 42]. As propriedades físicas e químicas do óxido suportado sobre a superfície da sílica, $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$, podem ser bastante diferentes das observadas para o óxido não suportado. Por exemplo, o óxido de nióbio, Nb_2O_5 , quando submetido a tratamento térmico torna-se cristalino a uma temperatura de aproximadamente 773 K [43], enquanto que o óxido de nióbio enxertado

sobre a sílica, $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$, a esta temperatura continua amorfo. Apenas a uma temperatura de 1273 K este material torna-se cristalino, com separação de fases, em $\text{H-Nb}_2\text{O}_5$ e SiO_2 cristalino [44]. Tal comportamento indica que o Nb_2O_5 encontra-se fortemente ligado à superfície da sílica e, portanto, somente a altas temperaturas a camada de óxido pode se mover e aglomerar para formar partículas cristalinas.

Os sítios ácidos de Lewis da $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$ são também consideravelmente mais estáveis do que para o Nb_2O_5 não suportado. Estes permanecem estáveis em amostras quando aquecidas até acima de 800 K, enquanto que para o óxido não suportado, os sítios ácidos de Lewis são drasticamente reduzidos a temperaturas acima de 573 K [33].

É conhecido que tais sítios ácidos superficiais de Lewis do óxido de nióbio disperso sobre a superfície da sílica gel, $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$, apresentam particular afinidade por ácidos orgânicos, possibilitando que estes fiquem fortemente ligados ao óxido metálico através da formação da ligação $-\text{COO-Nb}$ e evitando dessa forma o seu lixiviamento da matriz de sílica. De fato, adicionando-se a $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$ a uma solução de ácido ascórbico, a sílica modificada adquire imediatamente uma coloração amarelo forte, devido a formação do complexo na superfície. Foi observado que ácido ascórbico imobilizado sobre a $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$ pode reduzir com eficiência alguns íons metálicos na interface sólido-solução [36].

Moléculas que apresentam grupos carboxílicos em sua estrutura são portanto facilmente adsorvidas pela $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$.

1.2. Eletrodos Quimicamente Modificados (EQMs)

Em um eletrodo quimicamente modificado, a superfície do eletrodo é propositalmente alterada através da imobilização de espécies eletroquimicamente ativas, com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução [45]. O resultado consiste em bloquear o acesso direto ao eletrodo, inibindo alguns processos de eletrodo e promovendo outros. A modificação pode, portanto, ser uma ajuda importante na obtenção de maior seletividade, e daí a sua importância em análise [46].

Os eletrodos quimicamente modificados são muito úteis em situações onde as espécies a serem analisadas requerem a aplicação de altos sobrepotenciais para sofrerem o processo redox em eletrodos convencionais (Pt, C), havendo dessa forma um aumento do efeito de interferentes, através da oxidação ou redução de outras espécies presentes no meio. A utilização de EQMs possibilita o abaixamento deste sobrepotencial, aumentando a velocidade de certas reações eletroquímicas, além de aumentar a sensibilidade e seletividade [47]. A interface eletrodo-solução para um EQM na presença apenas da solução de eletrólito suporte, pode ser demonstrada de maneira esquemática na Figura 1.

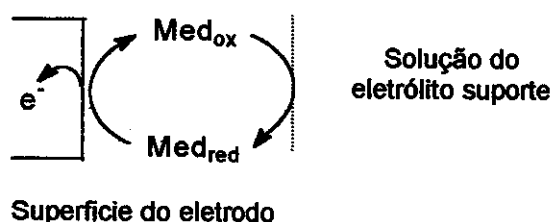


Figura 1. Interface eletrodo-solução para um EQM na presença apenas da solução do eletrólito suporte.

Realizando-se a varredura na direção de potenciais mais positivos ocorre a oxidação da espécie reduzida presente na superfície do eletrodo. Quando a varredura de potencial é invertida (na direção de potenciais mais negativos) esta pode ser então novamente reduzida.

Em um processo eletrocatalítico promovido por um EQM, a oxidação ou redução de um determinado substrato que apresenta uma reação eletroquímica lenta à superfície do eletrodo, é mediada por um sistema redox ($\text{Med}_{\text{ox}}/\text{Med}_{\text{red}}$) que pode trocar elétrons mais rapidamente com o eletrodo e o substrato, reduzindo o sobrepotencial de ativação da reação (potencial adicional ao potencial formal E^0 do substrato, necessário para vencer a barreira da energia de ativação da eletrólise em um determinado tipo de material do eletrodo, para manter a reação a uma determinada velocidade) [48]. A redução deste sobrepotencial aumenta a seletividade da medida pois permite a aplicação de potenciais de operação mais baixos. Sendo a especificidade inversamente proporcional a magnitude do potencial aplicado, fica assim reduzida ou praticamente eliminada a possibilidade de que potenciais de eletrólise de outras espécies presentes no meio sejam atingidos. Na Figura 2, está representado o

processo de transferência de carga electrocatalítico para uma molécula do substrato sendo oxidada pelo mediador, o qual é subsequentemente re-oxidado na superfície do eletrodo. O processo inverso, a redução do substrato também pode ocorrer.

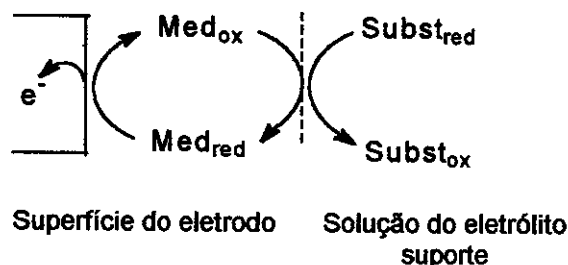


Figura 2. Oxidação electrocatalítica de um determinado substrato pelo eletrodo quimicamente modificado.

Existem diferentes tipos de eletrodos quimicamente modificados. Entre eles, os eletrodos de carbono, tanto carbono pirolítico como vítreo [49-53], podem ser modificados por adsorção de espécies electroativas e também através de ligações covalentes entre estas e grupos da superfície do eletrodo. Esta é a técnica mais simples de se modificar a superfície de um eletrodo, entretanto ela apresenta a desvantagem da espécie imobilizada apresentar baixa estabilidade na superfície do mesmo.

Também tem sido efetuada a modificação de eletrodos utilizando-se polímeros. Estes polímeros podem apresentar o centro redox como parte de sua estrutura (polímeros redox) [54-56] ou serem utilizados como adsorventes da espécie electroativa [57,58]. Tanto os eletrodos de carbono como os eletrodos metálicos podem ser modificados por polímeros.

Uma outra classe de eletrodos quimicamente modificados muito importante é a dos eletrodos de pasta de carbono (EPC) [59-63]. Os eletrodos de pasta de carbono são formados por uma mistura de grafite em pó e um líquido orgânico, o qual é imiscível em contato com soluções aquosas. O líquido orgânico serve para manter uma forma firme do eletrodo, preencher as cavidades entre as partículas de grafite e “isolar” o grafite do contato com soluções aquosas [64].

Os eletrodos preparados a base de pasta de carbono oferecem versatilidade, baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo, modificação conveniente, facilidade de renovação da superfície, além da possibilidade de miniaturização. Devido a essas propriedades, os eletrodos a base de pasta de carbono apresentam um extensivo uso em eletroanálise [65-67].

A principal desvantagem dos eletrodos de pasta de carbono é a falta de estabilidade estrutural do bulk e da superfície, especialmente quando eles são explorados por um longo período de tempo ou na presença de solventes orgânicos na solução. Um outro aspecto a considerar é que, em geral, os eletrodos de pasta de carbono são caracterizados pela falta de reprodutibilidade. Na maioria dos casos, o grafite e aglutinante são misturados manualmente fornecendo muitas vezes um material não homogêneo, podendo ser difícil reproduzir as pastas. Tem sido verificado que pequenas diferenças no tempo usado para a secagem, temperatura, tipo de tampão, polimento da superfície, podem ser fatores cruciais para o resultado final [65].

1.3. Eletrodos de pasta de carbono modificados com sílica gel

O uso de sílicas modificadas para a construção de eletrodos quimicamente modificados somente foi possível devido ao desenvolvimento dos eletrodos de pasta de carbono. As sílicas contendo a espécie eletroativa adsorvida em sua superfície, são então incorporadas à pasta. Através da construção destes eletrodos é possível a caracterização destes sistemas pelo estudo do comportamento eletroquímico das espécies adsorvidas.

O desenvolvimento de eletrodos modificados a base de sílica gel é bastante recente. Este iniciou-se lentamente em 1989/90 e desde então tem crescido exponencialmente, segundo levantamento realizado por Walcarius (Figura 3) [68]. A variedade de materiais a base de sílica juntamente com a química de sua superfície implica um grande potencial para aplicação desses materiais em eletroquímica. A sílica apresenta propriedades bastante atrativas tais como capacidade de adsorção, química ácido-base e estabilidade térmica. Tais propriedades podem ser vantajosamente exploradas, por exemplo, no acúmulo de espécies eletroativas na sua superfície, antes da sua detecção eletroquímica.

Além disso, a superfície da sílica pode ser modificada com uma grande variedade de grupos funcionais, levando a um considerável enriquecimento das suas propriedades superficiais. A alta área superficial das sílicas sintéticas, quando combinadas à sua química de superfície, torna esse material bastante útil como suporte para vários catalisadores.

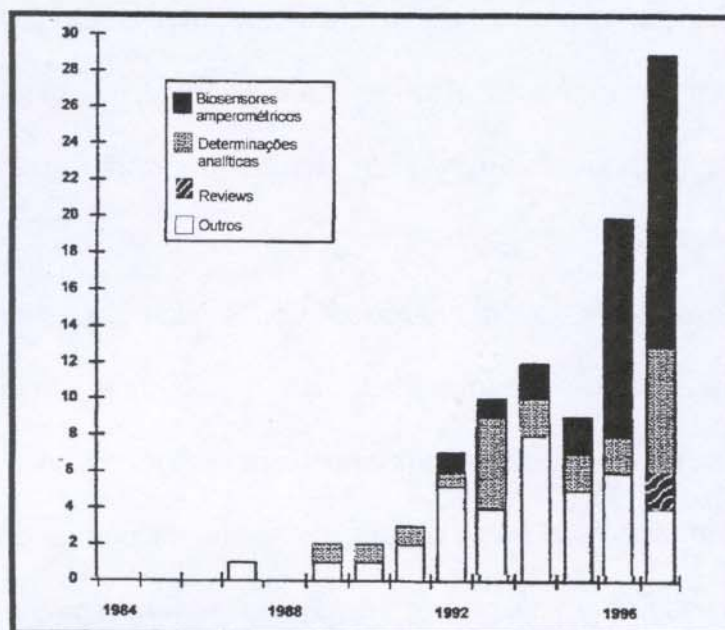


Figura 3. Número de publicações por ano baseadas em eletrodos modificados com sílica.

Sílicas quimicamente modificadas têm atraído considerável atenção devido a vantajosa combinação das propriedades intrínsecas da matriz inorgânica à reatividade dos modificadores. Para construção de eletrodos, mais especificamente eletrodos de pasta de carbono, as sílicas quimicamente modificadas são modificadores atrativos, porque permitem introduzir na interface eletrodo-solução uma grande variedade de

espécies tanto orgânicas como inorgânicas, as quais ficam ligadas à matriz de sílica, prevenindo dessa forma o seu desprendimento do eletrodo para solução, dando origem a eletrodos bem mais estáveis em relação aos eletrodos de pasta de carbono usuais.

1.3.1. Utilização da sílica gel modificada com óxidos metálicos para construção de eletrodos de pasta de carbono

A versatilidade da sílica gel em imobilizar vários componentes tais como filmes de óxidos metálicos e espécies eletroativas foi em grande parte estudada por Gushikem, Kubota e colaboradores. Muitos dos estudos foram baseados na preparação da sílica gel modificada com óxidos metálicos e utilização destes materiais como suporte para imobilização de vários mediadores de transferência de elétrons [26-29, 69-77]. Os filmes dos metais conferem à sílica além de uma maior condutividade, a possibilidade de imobilização de uma grande quantidade de espécies eletroativas, podendo levar a obtenção de uma série de novos eletrodos quimicamente modificados.

Abaixo estão descritas algumas das principais aplicações de óxidos metálicos enxertados sobre sílica na construção de eletrodos de pasta de carbono para o desenvolvimento de novos sensores e biossensores.

a) SiO₂/ZrO₂

O ânion hexacianoferrato foi adsorvido sobre a sílica modificada com o óxido de zircônio, SiO₂/ZrO₂. Tal material foi utilizado para determinação quantitativa de vitamina C em comprimidos e em sucos naturais e processados. O [Fe(CN)₆]³⁻ imobilizado

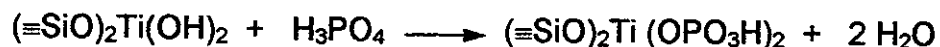
apresentou a propriedade de mediar a oxidação do ácido ascórbico a um potencial relativamente baixo, evitando portanto a interferência de outras espécies normalmente presentes em amostras reais [78].

Em um outro trabalho, a $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$ foi utilizada para a construção de um sensor amperométrico para O_2 dissolvido, utilizando-se o complexo $[\text{Ru}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]^-$. Este material quando incorporado na pasta de carbono apresentou resposta para O_2 dissolvido em -250 mV, contra -500 mV vs ECS no eletrodo de barra de grafite. O eletrodo apresentou-se bastante estável e seletivo tornando desnecessário o uso de uma membrana semi-permeável semelhante a utilizada no eletrodo de Clark [27].

b) $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$

Ftalocianinas metálicas imobilizadas sobre a $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ apresentaram a propriedade de eletrocatalisar principalmente as reações de oxidação da hidrazina e cisteína. Particularmente, a ftalocianina tetrassulfonada de ferro, quando imobilizada sobre a $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$, mostrou uma grande estabilidade em meio ácido. Esta apresentou a propriedade de mediar a reação de oxidação da hidrazina. De maneira similar, a ftalocianina tetrassulfonada de níquel imobilizada sobre a $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ foi utilizada no desenvolvimento de um sensor eletroquímico para hidrazina e cisteína [77,79].

A sílica gel modificada com óxido de titânio, também pode reagir com ácido fosfórico, formando fosfato de titânio na superfície da sílica.



Este novo material obtido foi utilizado para imobilizar espécies mediadoras de elétrons carregadas positivamente, tais como o Azul de Meldola e Azul de Metileno,

através de uma reação de troca iônica com os prótons dos grupos fosfato [29,73,74,76].

O azul de Meldola foi imobilizado sobre a $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2/\text{PO}_4^-$ (denominado $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2/\text{PO}_4^-/\text{MB}$, apresentando-se bastante estável sobre tal matriz. Este material quando incorporado no eletrodo de pasta de carbono mostrou ser um sensor efetivo para NADH [73].

Eletrodos de pasta de carbono modificados com $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2/\text{PO}_4^-/\text{MB}$, foram também utilizados para construção de biossensores para frutose e salicilato [29,74]. Em ambos os casos, a presença do mediador permitiu a aplicação de um baixo sobrepotencial para a detecção dos analitos. Os eletrodos foram preparados através da incorporação das enzimas frutose-5-desidrogenase e salicilato desidrogenase, respectivamente, na pasta de carbono.

c) $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$

Na literatura, a matriz de $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$ é ainda uma das menos exploradas, na construção de sensores baseados em eletrodos de pasta de carbono.

Em um trabalho recente, o azul de metileno foi imobilizado sobre a $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$ e o eletrodo de pasta de carbono deste material testado para oxidação de NADH. Os sítios NbOH da matriz são os responsáveis pela adsorção do mediador na superfície da sílica. Uma importante característica deste eletrodo é que o seu potencial redox praticamente não foi influenciado pelo pH do meio entre pH 4 e 7, diferentemente do observado para o azul de metileno em solução [80]. Outros corantes, tais como o Azul do Nilo e o Azul de Toluidina também podem ser eficientemente imobilizados sobre a $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$.

É possível notar portanto que os óxidos metálicos uniformemente dispersos na forma de filmes finos sobre a superfície da sílica podem ser utilizados com sucesso na fabricação de dispositivos eletroquímicos, tais como sensores e biossensores. A alta sensibilidade atingida por tais dispositivos deve-se principalmente ao caráter poroso da matriz de sílica, permitindo que as espécies difundam livremente através da interface eletrodo-solução.

Estudos mais recentes têm sido realizados no sentido de se imobilizar enzimas diretamente sobre tais superfícies de sílica modificada com óxidos metálicos, com o objetivo de se construir novos biossensores para a determinação dos mais diversos tipos de substratos de interesse biológico [23, 28, 81]. Particular atenção até agora tem sido dada à sílica modificada com óxido de titânio, $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$. O óxido de titânio oferece uma boa possibilidade para imobilizar enzimas devido à sua afinidade pelos grupos carboxílicos dos resíduos de aminoácidos terminais das moléculas de enzima [82].

Dentre os óxidos metálicos suportados sobre a superfície da sílica gel, o menos explorado ainda na preparação de eletrodos de pasta de carbono quimicamente modificados é o óxido de nióbio. Entretanto, sabe-se que o óxido de nióbio apresenta grande afinidade por moléculas que apresentam grupos carboxílicos em sua estrutura [36, 83]. Esta característica torna a $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$ bastante interessante como matriz para imobilização de espécies que apresentam tais grupos funcionais, como por exemplo porfirinas carboxiladas ou mesmo enzimas para a construção de novos sensores e biossensores.

1.4. Espécies mediadoras de elétrons imobilizadas sobre a $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$ para construção de eletrodos modificados

1.4.1. Porfirinas e Metaloporfirinas

As porfirinas correspondem a uma importante classe de compostos macrocíclicos que ocorrem vastamente na natureza, os quais desempenham um importante papel em vários processos biológicos. São moléculas constituídas por quatro anéis pirrólicos, unidos por átomos de carbono sp^2 , derivadas da porfina (Figura 4) pela substituição dos átomos de hidrogênio nas posições periféricas do anel por cadeias laterais (metila, vinila, etila, etc).

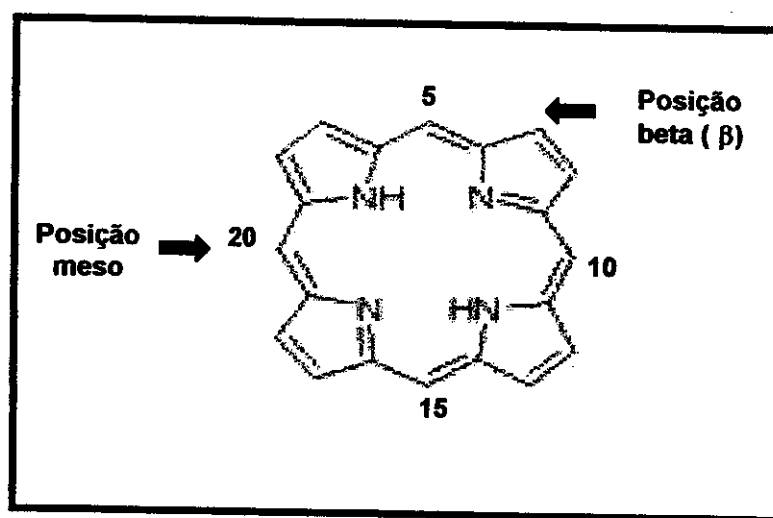


Figura 4. Estrutura básica das porfirinas (porfina).

O núcleo da porfirina constitui-se de um ligante tetradentado, no qual o espaço disponível para um metal se coordenar tem um diâmetro máximo de aproximadamente

3,7 Å [84].

Quando a coordenação ocorre, dois prótons são removidos dos átomos de nitrogênios pirrólicos, deixando duas cargas negativas. A maioria dos elementos da tabela periódica forma complexos com as porfirinas sintéticas, sendo os mais estudados, os de magnésio, manganês, ferro, cobalto, zinco e cobre [85]. Tais complexos formados apresentam uma estabilidade considerável.

As metaloporfirinas (porfirinas metálicas) são de grande importância em sistemas biológicos. As hemoglobinas, mioglobinas e citocromos, assim como algumas enzimas (algumas catalases e peroxidases) apresentam como grupo prostético, a molécula heme, um complexo de protoporfirina de ferro. Já a clorofila e a vitamina B12 possuem estruturas semelhantes às das porfirinas, entretanto associadas respectivamente ao Mg(II) e ao Co(II). Além disso, as porfirinas metaladas têm se mostrado eficientes catalisadores em um grande número de sistemas químicos e fotoquímicos.

As porfirinas metálicas quando adsorvidas na superfície de grafite, carbono vítreo e outros eletrodos inertes são utilizadas como eletrocatalisadores para a redução ou oxidação eletroquímica de uma grande variedade de espécies, tais como redução de oxigênio [86,87], peróxido de hidrogênio [88], íons sulfeto, nitrito e óxido nitroso [89-91] e para oxidação de hidrocarbonetos [92] e hidrazina [93].

Porfirinas de cobalto adsorvidas em eletrodos de grafite têm sido especialmente estudadas por Anson e colaboradores [94-99]. Tais porfirinas imobilizadas apresentam particular atividade eletrocatalítica na redução de oxigênio dissolvido. Em seus trabalhos, foi observado que a posição e as espécies dos grupos substituintes do anel afetam de maneira significativa a atividade eletrocatalítica das porfirinas metaladas [99].

1.4.1.1. Caracterização das porfirinas e metaloporfirinas: Espectroscopia na região do UV-Visível

Dentre as várias técnicas disponíveis para a caracterização das porfirinas de base livre e metaladas, a mais utilizada é sem dúvida a espectroscopia na região do ultravioleta e visível. Como o benzeno e seus homólogos, os espectros de absorção das porfirinas consistem de duas regiões distintas. Entretanto, diferentemente do benzeno, estas aparecem em regiões do ultravioleta próximo e do visível do espectro eletrônico, dando a estes compostos cores bastante intensas.

Os espectros das porfirinas apresentam geralmente uma absorção intensa entre 390 - 425 nm (dependendo se a porfirina é β ou meso substituída) chamada banda B ou também conhecida como banda Soret. Esta banda corresponde à transição $a_{1u} \rightarrow e_g$. Juntamente com a Banda Soret, observam-se mais duas ou quatro bandas menos intensas, situadas entre 480 e 700 nm, denominadas bandas Q (transição $a_{2u} \rightarrow e_g$). As bandas Q ocorrem devido a transições eletrônicas que envolvem estados vibracionais dos orbitais HOMO e LUMO. O número e a intensidade destas bandas podem fornecer importantes informações sobre o padrão de substituição da porfirina e se esta apresenta-se ou não metalada.

As porfirinas não metaladas apresentam 4 bandas Q, denotadas de acordo com o aumento do comprimento de onda de IV, III, II e I (Figura 5). Variações dos substituintes periféricos no anel porfirínico geralmente causam mudanças na intensidade e comprimento de onda dessas absorções.

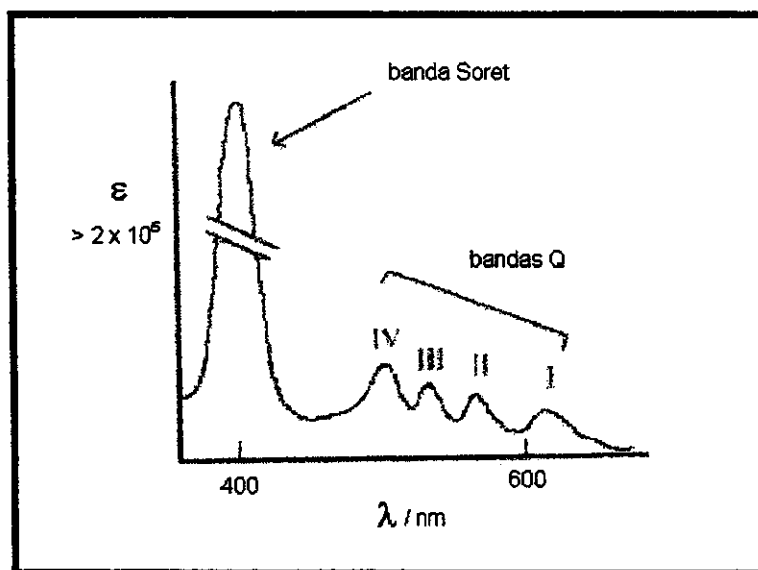


Figura 5. Espectro eletrônico típico das porfirinas não metaladas.

A protonação da porfirina com ácido leva a adição de mais dois prótons nos nitrogênios centrais. Esta é uma situação mais estável que a porfirina de base livre, produzindo uma simplificação das bandas Q do espectro, as quais podem levar a profundas mudanças de cor. Essencialmente, neste caso, as quatro bandas Q colapsam em apenas duas bandas.

Assim como as porfirinas protonadas, as metaloporfirinas também tem anéis macrocíclicos mais simétricos (simetria D_{4h}) do que as porfirinas de base livre (simetria D_{2h}), apresentando geralmente duas bandas Q no espectro eletrônico. As bandas Q das metaloporfirinas são frequentemente denominadas α e β , onde a banda α ou Q(0,0) é a de menor energia (maior λ) e a banda β ou Q (1,0) é a de maior energia. As

intensidades relativas destas duas bandas, α e β , podem dar indicações acerca da estabilidade do metal complexado pelos quatro nitrogênios porfirínicos [100].

Na Figura 6, está mostrada a representação esquemática das transições entre os diferentes níveis eletrônicos das metaloporfirinas (D_{4h}) e porfirinas (D_{2h}).

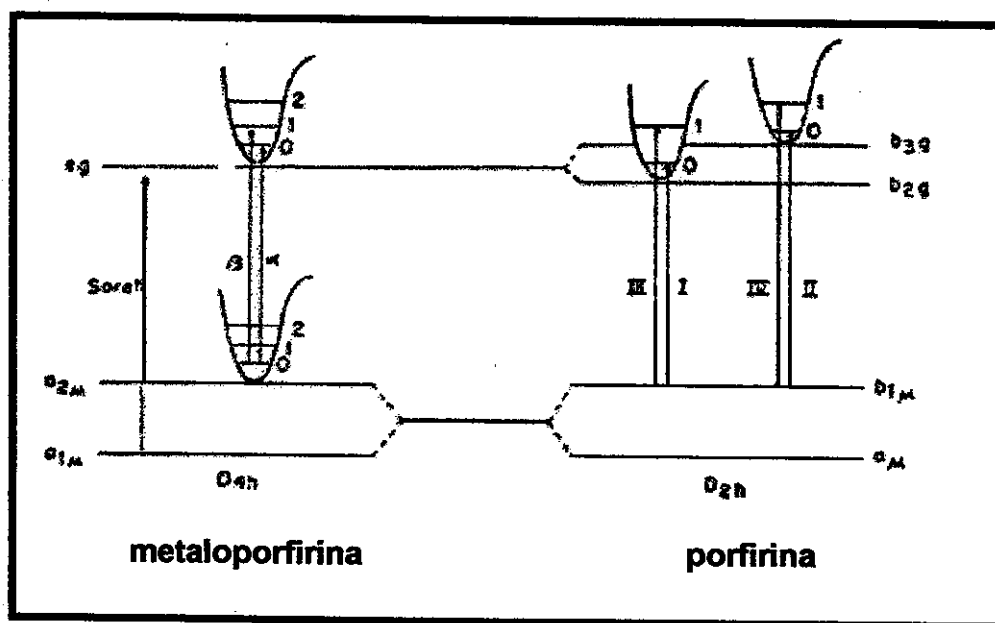


Figura 6. Representação das transições eletrônicas das porfirinas (simetria D_{2h}) e metaloporfirinas (simetria D_{4h}).

1.4.2. Ferroceno

O ferroceno e seus derivados, em particular o ferroceno monocarboxílico, são geralmente utilizados como mediadores de elétrons em diversas reações eletroquímicas, principalmente enzimáticas [101-107]. Este apresenta a vantagem da sua reação redox não envolver prótons e dessa forma a mesma não é influenciada pelo pH do meio, ao contrário de alguns mediadores orgânicos [108].

O NADH, nicotinamida adenina dinucleotídeo, tem um papel importante em muitas reações redox, como coenzima para uma série de enzimas desidrogenases e por essa razão a sua reação tem sido largamente estudada em muitas áreas da química. Em particular, estudos eletroquímicos da oxidação desta coenzima têm despertado considerável interesse. A oxidação direta do NADH em eletrodos inertes ocorre geralmente com a aplicação de altos sobrepotenciais tais como 1,1 V nos eletrodos de carbono e 1,3 V em eletrodos de platina [109,110]. Consequentemente, mediadores de elétrons necessitam ser utilizados para facilitar essa transferência de elétrons entre o NADH e o material do eletrodo e dessa forma diminuir o potencial a ser aplicado [111,112]. Um grande número de mediadores tem sido utilizados na oxidação do NADH, tais como quinonas, fenoxazinas e fenotiazinas, complexos de ósmio, além do ferroceno e derivados [113-116].

O ferroceno monocarboxílico em solução e imobilizado em eletrodos de grafite apresenta a propriedade de eletrocatalisar com relativa eficiência a oxidação desta coenzima [116,117].

1.5. Técnicas eletroquímicas utilizadas para o estudo dos eletrodos quimicamente modificados

Aqui estão descritos os princípios básicos das técnicas mais utilizadas para caracterização e estudos eletroquímicos dos eletrodos quimicamente modificados.

1.5.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é provavelmente uma das técnicas eletroanalíticas mais versáteis para o estudo de espécies eletroativas em solução ou imobilizadas sobre eletrodos, fornecendo informações tanto quantitativas quanto qualitativas sobre sistema. Esta versatilidade combinada com a facilidade na medida, tem resultado num extensivo uso da voltametria cíclica nos campos da eletroquímica, química inorgânica e bioquímica. O voltamograma resultante é análogo a um espectro convencional, o qual fornece informações de uma determinada espécie como função de uma varredura de potencial [118-120].

Esta técnica consiste em submeter um eletrodo, denominado eletrodo de trabalho, a um potencial de forma de onda triangular (sinal de excitação). O voltamograma cíclico é obtido através da medida de corrente neste eletrodo durante a varredura de potencial. A corrente pode ser considerada o sinal de resposta a aplicação deste potencial.

Geralmente em um experimento de voltametria cíclica são utilizados três eletrodos: o **eletrodo de trabalho**, no qual a reação de interesse está localizada num potencial aplicado, medido relativamente a um **eletrodo de referência** (os mais

utilizados são o eletrodo de calomelano saturado e Ag/AgCl) no qual não há fluxo de corrente, sendo o circuito completo por um **eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo**, normalmente um fio de platina.

Em um voltamograma cíclico típico, os principais parâmetros de interesse medidos são os valores de potenciais de pico anódico e catódico, respectivamente E_{pa} e E_{pc} , as correntes de pico, I_{pa} e I_{pc} e a diferença entre os potenciais de pico $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$. O potencial de pico médio pode ser obtido através da média entre os potenciais de pico catódico e anódico ($E_m = (E_{pa} + E_{pc})/2$). Um voltamograma cíclico típico para espécies redox em solução, que apresentam comportamento controlado por difusão, está mostrado na Figura 7.

Observa-se que quando o potencial torna-se positivo o suficiente para que ocorra a oxidação da espécie em solução, E_{pa} (que depende da espécie), há um aumento da corrente anódica, I_{pa} (proporcional à concentração da espécie) até atingir um máximo. Como a concentração da espécie reduzida na interface eletrodo-solução nesta etapa torna-se muito pequena, observa-se um decréscimo significativo da corrente após ter sido atingido o máximo, pois o passo determinante vem a ser agora a difusão da espécie eletroativa ao eletrodo. Quando invertida a varredura de potencial, no sentido catódico (para potenciais mais negativos), a espécie é então reduzida, observando-se novamente um aumento de corrente, I_{pc} , a um determinado potencial, E_{pc} .

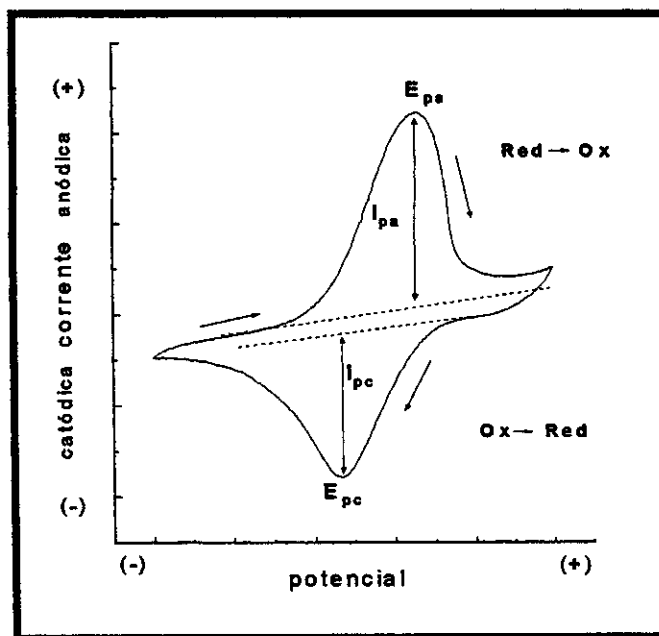


Figura 7. Voltamograma cíclico típico de espécies redox em solução e os principais parâmetros obtidos a partir deste.

Em sistemas eletroquimicamente reversíveis, a relação I_{pa}/I_{pc} é igual a 1 e a separação entre os potenciais de pico é de $\Delta E_p = 59/n$ (onde n é o número de elétrons envolvidos na semi-reação) e esta separação mantém-se constante com a velocidade de varredura. Valores maiores que este e um aumento do ΔE_p com a velocidade de varredura indicam que o processo de transferência de elétrons no eletrodo é lento. A corrente de pico em ampéres para espécies em solução é dada pela equação 1:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Eq. 1}$$

onde n é o número de elétrons transferidos; A é a área do eletrodo em cm^2 ; D é o coeficiente de difusão em cm^2/s ; C é a concentração da espécie eletroativa na solução

em mol / cm³ e v a velocidade de varredura em (V.s⁻¹).

Para sistemas onde a espécie redox encontra-se imobilizada sobre o eletrodo a análise do voltamograma é análoga a anterior, porém neste caso não há difusão da espécie eletroativa para o eletrodo. A corrente de pico, I_p , é então dada pela equação 2:

$$I_p = \frac{n^2 F^2 \Gamma v}{4RT} \quad \text{Eq. 2}$$

onde Γ (mol.cm²) é denominado rugosidade eletroquímica, expressa em carga por unidade de área, e constitui o número de espécies imobilizadas na superfície do eletrodo que realmente participam do processo redox, obtido pela seguinte equação:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad \text{Eq. 3}$$

onde Q é a carga e F a constante de Faraday.

1.5.2. Voltametria de pulso diferencial

As técnicas de pulso foram desenvolvidas inicialmente para o eletrodo gotejante de mercúrio, tendo como objetivo sincronizar os pulsos com o crescimento da gota e reduzir a contribuição da corrente capacitiva. Após a aplicação de um pulso de potencial, a corrente capacitiva extingue-se mais rapidamente do que a corrente

faradaica, sendo a corrente medida no final do pulso. Este tipo de medida tem como vantagem o aumento na sensibilidade e, dessa forma, apresenta melhores características para aplicações analíticas. Em eletrodos sólidos há uma vantagem adicional, pois evita-se a adsorção de espécies presentes na solução, deixando o eletrodo livre para as reações redox [46].

A voltametria de pulso diferencial (DPV) é um tipo de voltametria de pulso, na qual o potencial base é aumentado entre os pulsos e a corrente é medida antes da aplicação do pulso e no fim do mesmo, registrando-se a diferença entre as duas correntes. A onda potencial - tempo está mostrada na Figura 8a. Como a DPV é uma técnica diferencial, a resposta é semelhante a primeira derivada de um voltamograma diferencial, isto é, um pico (Figura 8b). O potencial de pico, E_p , pode ser identificado como sendo aproximadamente o potencial médio, E_m (ou $E_{1/2}$). Com o aumento da irreversibilidade, E_p afasta-se de E_m , ao mesmo tempo que aumenta a largura do pico e a sua altura diminui. Em eletrodos sólidos, melhores respostas são obtidas com a voltametria de pulso diferencial (DPV) do que a voltametria de pulso normal (NPV), especialmente quando compostos orgânicos estão envolvidos na reação [46].

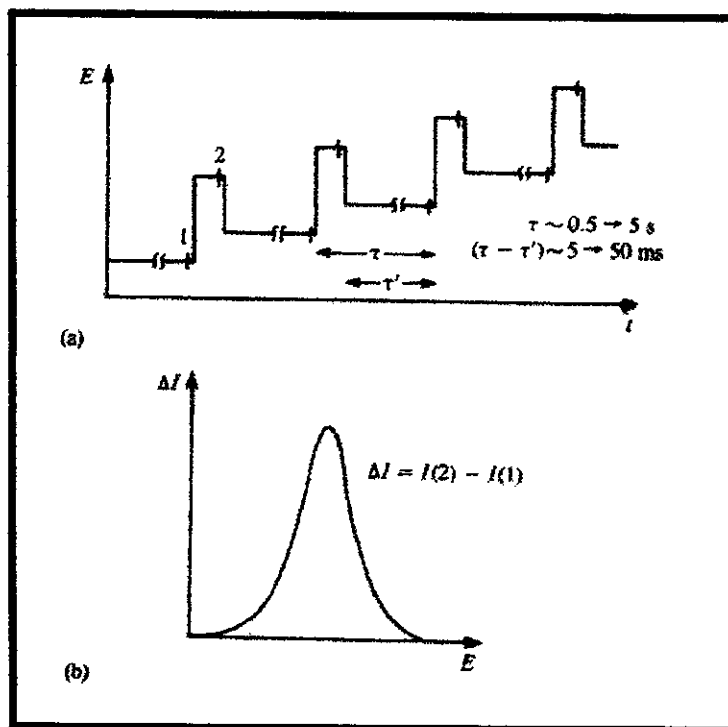


Figura 8. Voltametria de pulso diferencial (a) Curva potencial-tempo (b) Perfil da curva de corrente versus potencial.

1.5.3. Voltametria de disco rotatório

O voltamograma de disco rotatório de um eletrodo quimicamente modificado é muito similar ao voltamograma cíclico, pois independe do transporte hidrodinâmico da espécie eletroquimicamente ativa. Por essa razão, esta técnica não traz informações adicionais, a menos que se queira estudar reações redox mediadas pelo eletrodo modificado. As reação de maior interesse são aquelas em que o processo mediado

ocorre mais rapidamente ou leva a uma diminuição do sobrepotencial, ou seja, as reações eletrocatalíticas. Obviamente, estas podem ser estudadas por voltametria cíclica, mas os parâmetros cinéticos podem ser mais convenientemente obtidos por voltametria de disco rotatório.

Diferentemente das técnicas anteriores em que o transporte de massa depende apenas da difusão, na voltametria de disco rotatório o transporte de massa é hidrodinâmico. Neste caso, o eletrodo gira em torno de um eixo vertical, criando-se uma força centrífuga, responsável pelo aparecimento de um fluxo laminar da solução no sentido axial / laminar, como mostrado na Figura 9 abaixo [121]:

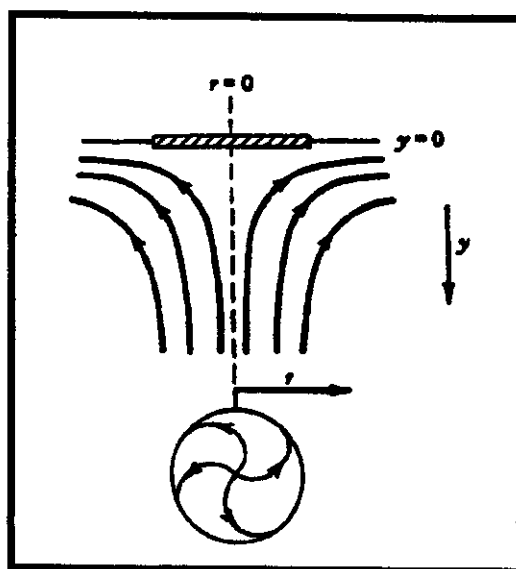


Figura 9. Diagrama mostrando o fluxo da solução na superfície e abaixo do eletrodo de disco rotatório.

Quanto maior a velocidade de rotação, maior será a força centrífuga e, portanto,

a velocidade de deslocamento radial da solução, v_r . Porém, v_r não é máxima na superfície do eletrodo, mas a uma distância y . De fato, v_r tende a zero a medida que y tende a zero. Assim, existe uma fina camada de solução adjacente à superfície do eletrodo, que não sofre influência dos processos hidrodinâmicos, denominada camada limite do fluido (fluid boundary layer). Assim, as espécies em solução, transportadas pela convecção forçada, devem se difundir através dessa camada para alcançar a superfície do eletrodo. Essa camada torna-se mais fina a medida que a velocidade de rotação aumenta, tornando maior a velocidade de convecção/difusão das espécies em solução para a superfície do eletrodo e conseqüentemente a corrente.

No caso de processos reversíveis, ou seja, limitados apenas pelos processos de convecção/difusão e não pela cinética de transferência heterogênea de elétrons, os voltamogramas obtidos são sigmóides, cujas correntes limites, i_L , são definidas pela equação de Levich, descrita abaixo (Eq.4):

$$i_L = 0,620nFAD^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}C$$

Eq. 4

Onde: i_L = corrente limite, n = número de elétrons, F = constante de Faraday, A = área do eletrodo, D = coeficiente de difusão, C = concentração da espécie, ω = velocidade de rotação, ν = viscosidade cinemática ($0,01 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, em solução aquosa a 20°C).

Todavia, utiliza-se a equação de Koutecky-Levich no tratamento quantitativo de processos eletrocatalíticos (em eletrodos quimicamente modificados) nos quais as velocidades de reação são controladas pela transferência de elétrons entre o sítio ativo

presente no eletrodo e o substrato em solução.

Considerando-se que a reação eletrocatalítica é definida por uma constante de velocidade k_f , a concentração superficial do mediador Γ e a concentração C do substrato em solução tem-se que

$$\frac{1}{i_L} = \frac{1}{nFk\Gamma C} + \frac{1}{0,620nFAD^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}C} \quad \text{Eq. 5}$$

Construindo-se o gráfico de $1/i_L$ em função de $1/\omega^{1/2}$, uma reta deve ser obtida.

1.5.4. Cronoamperometria

Os cronometodos são métodos eletroanalíticos nos quais a dependência de um sinal elétrico é medida em função do tempo. Os parâmetros elétricos medidos podem ser: corrente, como no caso da cronoamperometria, no qual o processo é iniciado por um pulso de potencial, ou o potencial (cronopotenciometria), no qual o processo por sua vez é iniciado por um fluxo de corrente [122].

Na cronoamperometria a potencial constante, a corrente que flui através do eletrodo de trabalho é monitorada em função do tempo, a um potencial fixo onde ocorre a reação redox do substrato de interesse. Em sistemas onde a espécie eletroativa encontra-se adsorvida sobre a superfície do eletrodo, como no caso dos eletrodos quimicamente modificados, quando aplicado um potencial fixo, ocorre a redução ou oxidação total do mediador, a corrente então estabiliza-se a um valor constante (ou próximo de zero). Quando adicionada à cela eletroquímica a espécie (substrato) a qual deseja-se determinar, observa-se uma variação de corrente devido ao processo

catalítico. Se a corrente observada apresentar uma correlação linear com a concentração do substrato, tal eletrodo modificado pode ser utilizado como sensor amperométrico.

A equação fundamental da cronoamperometria é dada pela equação de Cottrell:

$$I_d = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad \text{Eq. 6}$$

para um controle de difusão linear de corrente em um eletrodo estacionário, onde t constitui o tempo de medida.

A técnica de cronoamperometria, além de ser uma importante ferramenta analítica, é também uma técnica bastante útil para medidas de coeficientes de difusão, velocidades de processos de eletrodos, parâmetros de adsorção e velocidades de reações acopladas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo a utilização da sílica modificada com o óxido de nióbio, SiNb, como matriz para espécies que apresentam grupos carboxílicos em sua estrutura e construção de novos eletrodos quimicamente modificados utilizando-se estes materiais.

Para tanto, três porfirinas (que contém grupos carboxílicos em sua estrutura) foram imobilizadas sobre sílica nióbio: a hematoporfirina IX, protoporfirina IX e a tetracarboxifenilporfirina. Em uma segunda etapa, o ácido ferroceno carboxílico foi também imobilizado. Os materiais obtidos foram incorporados em eletrodos de pasta de carbono e foram realizados estudos eletroquímicos dos compostos imobilizados.

Com o intuito de se desenvolver novos sensores amperométricos, foram verificadas as potencialidades eletrocatalíticas dos eletrodos obtidos utilizando-se substratos de interesse biológico tais como oxigênio, hidrazina e NADH.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Preparação da sílica nióbio (SiNb)

A superfície da sílica gel foi modificada com óxido de nióbio segundo procedimento já descrito na literatura [44].

A sílica gel (Aldrich) com diâmetro de poros de 10 nm foi inicialmente ativada na estufa 373 K por 4 h. Este procedimento tem como finalidade expor os grupos silanóis da superfície da sílica ao agente modificador, através da remoção das moléculas de H₂O fisicamente adsorvidas [123]. Posteriormente, 20 g do pentacloreto de nióbio, NbCl₅ ($7,41 \times 10^{-2}$ mols), suspenso em 300 mL de tetracloreto de carbono e 40 mL de etanol seco, foram colocados para refluxar por 30 min até a completa dissolução do NbCl₅. Em seguida adicionou-se 60 g de sílica gel previamente ativada. A mistura resultante foi submetida ao aquecimento na temperatura de refluxo do solvente ($\sim 80^{\circ}\text{C}$) por um período de 52 h, em atmosfera de nitrogênio e constante agitação. A sílica funcionalizada, SiNb (SiO₂/Nb₂O₅), obtida como produto do meio reacional descrito acima foi filtrada em Schlenk e lavada diversas vezes com tetracloreto de carbono e etanol seco. Este material foi então seco a vácuo ($\sim 10^{-3}$ Torr) por 4 h a uma temperatura de 333 K. Posteriormente, hidrolisou-se o mesmo em água deionizada. Filtrou-se, lavou-se e secou-se em estufa a 373 K. A quantidade de Nb (V) sobre a superfície da sílica foi analisada através da técnica de fluorescência de raios-X. A área superficial específica da sílica modificada, SiNb, foi determinada pela técnica BET multiponto. O equipamento utilizado foi o Micrometrics Flow Sorber 2300 conectado a um Flow Controller 2300 FC.

3.2. Imobilização e metalação das porfirinas sobre a SiNb

A 50 mL de uma solução etanólica de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ da hematoporfirina IX (denominada por H₂HMP) (Aldrich) foram adicionados 2,00 g da SiNb. Agitou-se esta mistura por 2 h. Posteriormente, filtrou-se e lavou-se com etanol até que o filtrado estivesse incolor para assegurar que toda a porfirina não imobilizada fosse removida. O material obtido foi seco em estufa a 373 K por 30 min. A tetracarboxifenilporfirina (H₂TCP) (Aldrich) e protoporfirina IX (H₂PP) (Aldrich) foram imobilizadas sobre SiNb, seguindo-se o mesmo procedimento, utilizando-se entretanto para a H₂PP, clorofórmio como solvente. As quantidades das porfirinas adsorvidas sobre SiNb foram determinadas por análise elementar C,H,N (Analisador Elementar PE-2400). As porfirinas imobilizadas serão descritas como sendo: SiNb/ H₂HMP, SiNb/ H₂PP e SiNb/ H₂TCP.

As porfirinas imobilizadas foram metaladas, segundo método descrito na literatura [124], através do refluxo de 1,00 g do material, SiNb/L (L= H₂HMP, H₂PP ou H₂TCP) em 50 mL de dimetilformamida na presença de excesso do sal do metal CoCl₂ (0,5 g), por 4 h. O material obtido foi lavado diversas vezes com H₂O para eliminar todo o cobalto livre presente na superfície da sílica. Após a metalação os materiais foram designados como: SiNb/ CoHMP, SiNb/ CoPP e SiNb/ CoTCP.

3.2.1. Determinação da quantidade de cobalto incorporado na estrutura das porfirinas

A quantidade de metal incorporado na estrutura das porfirinas foi determinada por espectrometria de absorção atômica. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer 5100.

Para tanto, uma curva analítica de calibração foi obtida utilizando-se soluções padrões na faixa de 2 mg L^{-1} a $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Co(II) em solução de HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A abertura das amostras (SiNb/CoPP , SiNb/CoHMP , SiNb/CoTCPP) foi realizada através da digestão a quente em ácido nítrico concentrado. Após a digestão, a suspensão foi filtrada e o sobrenadante recolhido em um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com solução de HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

3.2.2. Obtenção dos espectros eletrônicos

A metalação também pode ser confirmada através da obtenção dos espectros de absorção eletrônica UV-Vis. Os espectros de UV-Vis dos complexos imobilizados não metalados, descritos como $\text{SiNb/H}_2\text{HMP}$ e $\text{SiNb/H}_2\text{PP}$, $\text{SiNb/H}_2\text{TCPP}$ e dos metalados, SiNb/CoHMP , SiNb/CoPP , SiNb/CoTCPP foram obtidos através da suspensão dos respectivos sólidos em CCl_4 , em uma cela de 1mm de caminho óptico, utilizando-se a matriz de sílica, $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$ como branco. Este solvente, CCl_4 , foi utilizado pois seu índice de refração ($n_D=1,4595$) é próximo ao da sílica ($n_D=1,45845$), evitando dessa forma o espalhamento da radiação [125]. Os espectros dos complexos imobilizados

foram comparados com os espectros das porfirinas livres não metaladas, H₂PP e H₂HMP, H₂T CPP, dissolvidas nos seus respectivos solventes, clorofórmio (H₂PP) e etanol (H₂HMP e H₂T CPP). Estes foram obtidos utilizando-se celas de 1 cm de caminho óptico. As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro *Beckman DU-640*.

3.3. Imobilização do ácido ferrocenomonocarboxílico

A imobilização do ácido ferrocenomonocarboxílico (Sigma), FeCp₂COOH, foi realizada através da imersão de 0,5 g da SiNb em 50 mL de uma solução 0,01 mol L⁻¹ em 1:1 etanol/H₂O do ferroceno. A quantidade do ferroceno imobilizado foi determinada por análise elementar C,H,N. O material obtido será descrito no texto como sendo SiNb/FeCp₂COOH.

3.4. Preparação dos eletrodos de pasta de carbono

A pasta de carbono foi preparada através da mistura dos materiais obtidos (SiNb, SiNb/H₂HMP, SiNb/H₂PP, SiNb/H₂T CPP, SiNb/CoHMP, SiNb/CoPP, SiNbCoT CPP e SiNb/FeCp₂COOH) com grafite (Fluka) na proporção 1:1 (m/m) e gotas de óleo mineral (Nujol), misturando-se bem até obter uma pasta homogênea. Esta foi colocada na extremidade do eletrodo (tubo de vidro com diâmetro interno de 0,5 cm, contendo no seu interior um disco de platina conectado a um fio de platina para contato elétrico, de modo a formar uma cavidade de 0,2 cm de profundidade na sua extremidade), representado na Figura 10.

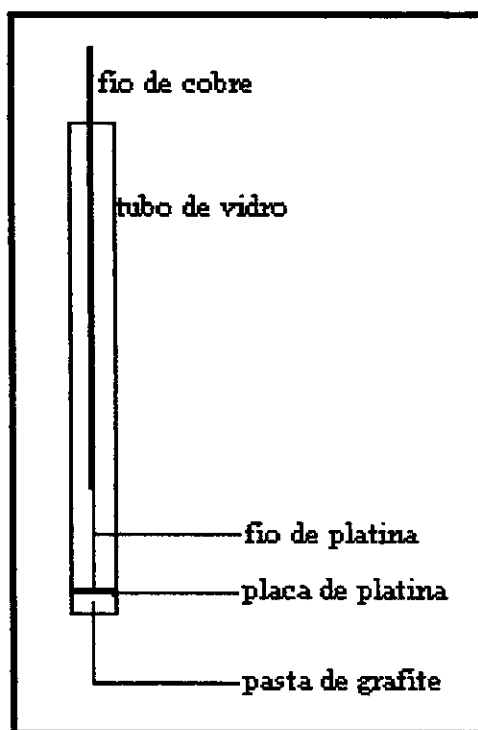


Figura 10. Esquema do eletrodo de pasta de carbono.

3.5. Medidas eletroquímicas

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em uma cela de 10 mL utilizando-se um sistema de três eletrodos: eletrodo de pasta de carbono, como eletrodo de trabalho, um eletrodo de fio de platina como contra-eletrodo e um eletrodo de calomelano saturado (ECS) como referência (segundo mostrado na Figura 11). As medidas de voltametria cíclica e cronoamperometria foram realizadas em um

potenciostato-galvanostato Autolab® modelo PGSTAT 20, interfaceado a um microcomputador para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados.

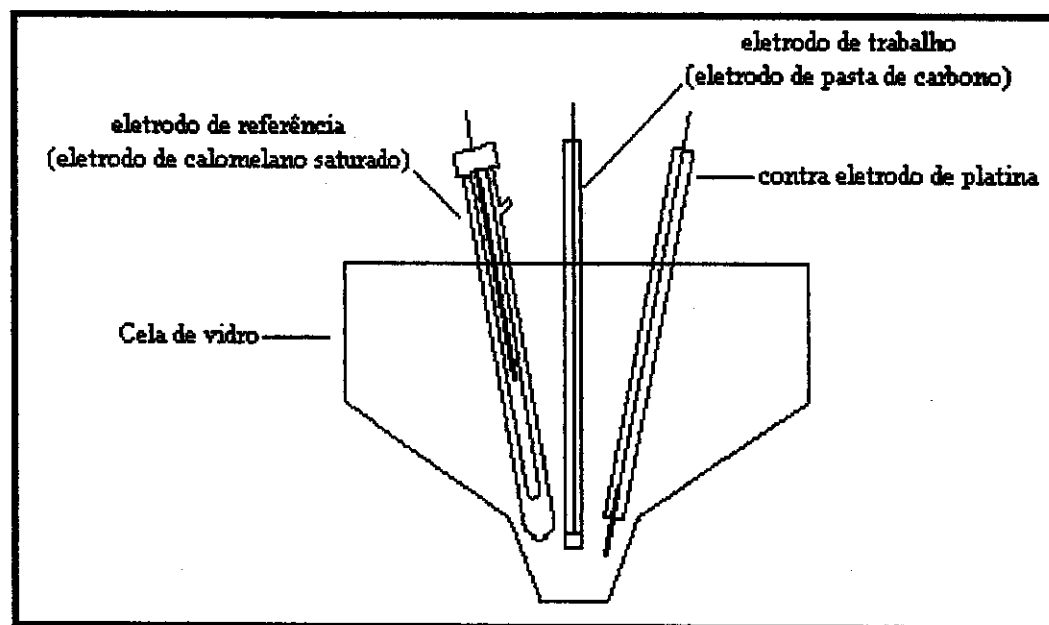


Figura 11. Esquema da cela eletroquímica utilizada.

Para os estudos utilizando-se o eletrodo de disco rotatório, a pasta de grafite contendo os materiais foi colocada na extremidade do eletrodo rotatório ($0,28 \text{ cm}^2$), em uma cavidade de 1mm de profundidade, em contato com uma superfície de grafite (mostrado na Figura 12) e este foi utilizado como eletrodo de trabalho (os demais eletrodos, contra e referência, foram os mesmos citados anteriormente).

A velocidade do eletrodo foi variada entre 100 a 1000 rpm. O equipamento utilizado neste caso foi um potenciostato / galvanostato da PAR modelo 273 A (EG & G) acoplado ao acessório para disco rotatório EG & G PARC modelo 616.

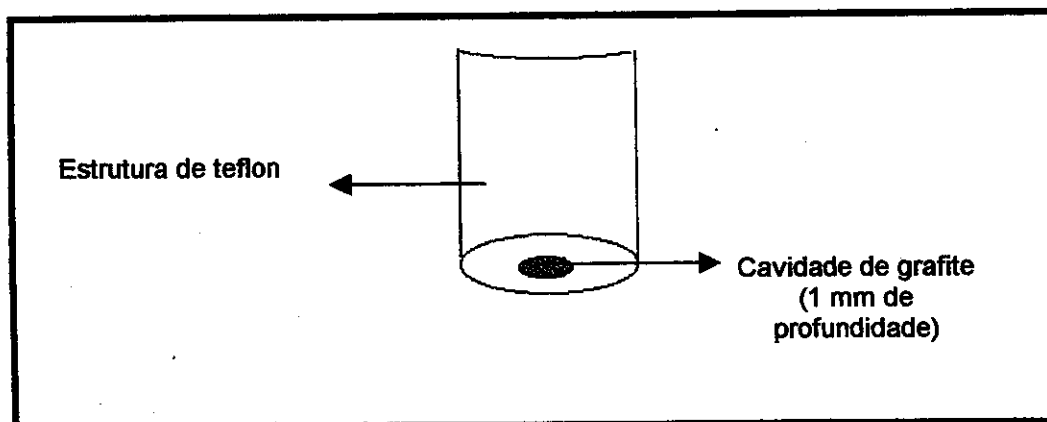


Figura 12. Esquema do eletrodo de disco rotatório.

3.5.1. Redução electrocatalítica de oxigênio (eletrodos utilizados: SiNb/CoPP e SiNb/CoHMP)

Nos experimentos utilizando-se o eletrodo na presença de oxigênio dissolvido, um oxímetro (Eletrodo de Clark) da Digimed DM4 foi utilizado para monitorar a concentração de O_2 durante as medidas eletroquímicas. A concentração de O_2 foi controlada purgando-se argônio puro na cela. Todas as medidas de oxigênio foram realizadas em uma cela termostatzada em $298,0 \pm 0,2$ K. Para a determinação de oxigênio em amostras reais, desaerou-se 10 mL da solução do eletrólito KCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, adicionou-se um volume igual da amostra (de modo a obter uma solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ do eletrólito suporte) e realizou-se a medida por cronoamperometria. O valor da concentração de O_2 obtido, foi multiplicado por dois devido a diluição (mistura 1:1 da solução do eletrólito e amostra). Para a construção da curva de calibração do eletrodo,

utilizou-se eletrólito KCl 0,5 mol L⁻¹. Os valores obtidos utilizando-se os eletrodos modificados foram comparados com os obtidos com o eletrodo de Clark.

Estudos realizados em diferentes pH da solução do eletrólito suporte, o pH destas foi ajustado utilizando-se soluções de HCl e NaOH.

3.5.2. Oxidação eletrocatalítica de hidrazina (eletrodo utilizado: SiNb/CoTCPP)

As soluções de hidrazina (Merck) foram preparadas no mesmo dia em que seriam utilizadas.

Tanto nos estudos de voltametria cíclica como nos de cronoamperometria, utilizou-se como eletrólito suporte uma solução de KCl 0,5 mol L⁻¹ tamponada com TRIS (tris-hidroximetil-aminometano da Sigma) de concentração 0,5 mol L⁻¹ e pH 7.

Nos experimentos de cronoamperometria, a intensidade da corrente em função do tempo foi medida após sucessivas adições (alíquotas de 0,2 mL) de uma solução de hidrazina 0,01 mol L⁻¹.

3.5.3. Oxidação eletrocatalítica de NADH (eletrodo utilizado: SiNb/FeCp₂COOH)

As soluções de NADH (Sigma 98 % de pureza) foram também preparadas no mesmo dia em que seriam utilizadas.

Nos estudos cronoamperométricos, foram realizadas adições de 0,2 mL de uma solução 0,01 mol L⁻¹ de NADH em 10 mL da solução do eletrólito suporte.

Soluções tampão de TRIS (tris-hidroximetil-aminometano da Sigma) , PIPES (ácido 1,4-piperazina-dietano sulfônico da Sigma) e fosfato de sódio (Synth), de

concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7, foram utilizadas para investigar o efeito das diferentes soluções tampão na resposta do eletrodo, SiNb/FeCp₂COOH, para NADH.

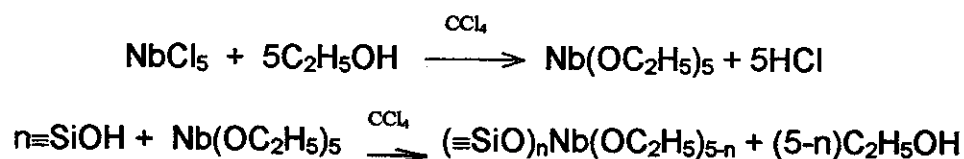
Nos experimentos de voltametria cíclica, utilizando-se o respectivo eletrodo na ausência de NADH, o eletrólito suporte utilizado foi KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Neste caso, o pH das soluções foi ajustado através de adições de HCl e NaOH.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

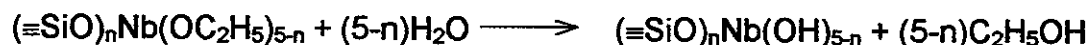
4.1. Síntese da sílica modificada com o óxido de nióbio (SiNb)

A reação de modificação da sílica gel com o óxido de nióbio ocorre através dos grupos silanóis da sílica, previamente ativada a 373 K, com o pentacloreto de nióbio, NbCl_5 , em meio de tetracloreto de carbono e etanol, sob atmosfera de nitrogênio.

Embora o NbCl_5 seja insolúvel em CCl_4 , a adição de etanol produz as espécies $\text{NbCl}_{5-n}(\text{OC}_2\text{H}_5)_n$, as quais são solúveis no meio reacional. A reação destas espécies (que para simplificação são consideradas como sendo $\text{Nb}(\text{OC}_2\text{H}_5)_5$) com a sílica gel, pode ser representada pelas seguintes equações, de acordo com o descrito na literatura [44]:



Onde $\equiv\text{SiOH}$ representa os grupos silanóis da superfície da sílica. Posteriormente o material é hidrolisado, levando à formação da sílica com o óxido de nióbio enxertado, $(\equiv\text{SiO})_n\text{Nb}(\text{OH})_{5-n}$, segundo a reação mostrada abaixo:



Para simplificação, a sílica modificada representada acima como sendo $(\equiv\text{SiO})_n\text{Nb}(\text{OH})_{5-n}$, será descrita como SiNb.

A quantidade de Nb (V) sobre a superfície da sílica, analisada através da espectroscopia de fluorescência de raios-X, foi de $0,58 \text{ mmol g}^{-1}$. A área superficial específica da sílica modificada, determinada pela técnica BET multiponto foi de $S_{\text{BET}} = 294 \pm 5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

4.2. Imobilização e metalação das porfirinas sobre a SiNb

As porfirinas imobilizadas sobre a SiNb foram a hematoporfirina IX, protoporfirina IX e a tetracarboxifenilporfirina (5,10,15,20, tetrafenil-tetrakis-ácido benzóico-21H-23H porfirina) cujas estruturas estão mostradas abaixo (Figura 13):

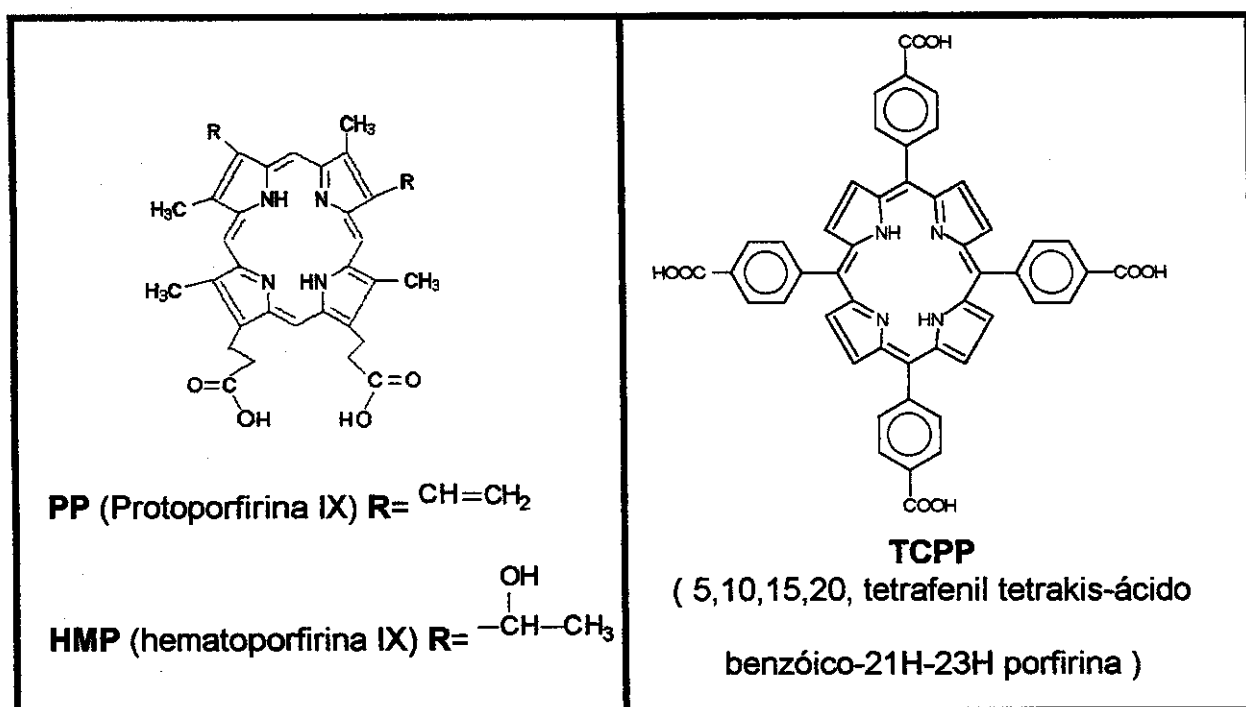


Figura 13. Porphirinas imobilizadas sobre a SiNb

A imobilização destas sobre a sílica modificada com óxido de nióbio ocorre provavelmente através da ligação $-\text{COO}-\text{Nb}$, formada entre os grupos carboxílicos das

porfirinas e o Nb_2O_5 , similar a imobilização do complexo da hematoporfirina de cobalto sobre Nb_2O_5 disperso sobre a membrana de acetato de celulose [126] e o ácido ascórbico sobre o óxido de nióbio [36, 83].

A Figura 14 mostra o esquema de imobilização e metalação com Co (II) da hematoporfirina e protoporfirina, de acordo com a literatura [126]:

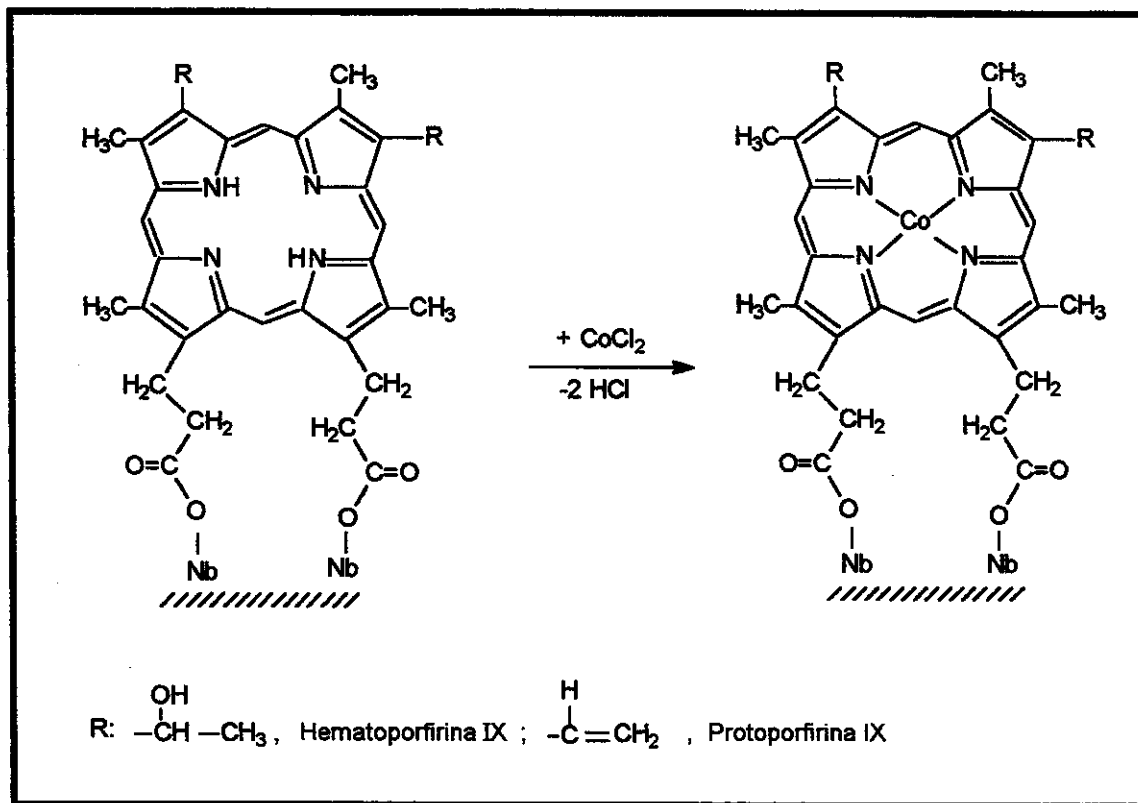


Figura 14. Esquema de imobilização e metalação das porfirinas.

A metalação ocorre com a saída dos dois hidrogênios dos nitrogênios pirrólicos e subsequente entrada do metal no centro da porfirina.

A área superficial e análise química dos materiais obtidos (porfirinas imobilizadas sobre a SiNb) estão mostradas na Tabela 1 .

Tabela 1. Área superficial e análise química da SiNb e das porfirinas imobilizadas sobre a SiNb.

Análise	SiNb	SiNb/CoPP	SiNb/CoHMP	SiNb/CoTCPP
$S_{\text{BET}} / \text{m}^2 \text{g}^{-1}$	294 ± 5	330 ± 5	307 ± 17	324 ± 13
Nb / mmol g^{-1}	0,58	0,58	0,58	0,58
Co porfirina / $\mu\text{mol g}^{-1}$	-	81	71	50

A área superficial específica não variou muito com a imobilização das porfirinas. A quantidade da CoTCPP imobilizada foi menor em relação às outras duas porfirinas, provavelmente devido ao maior tamanho da estrutura desta.

4.2.1 Caracterização das porfirinas imobilizadas por espectroscopia na região UV-Visível

Como dito anteriormente, as porfirinas de base livre (não metaladas) apresentam 4 bandas não muito intensas na região do visível entre 480 e 700 nm, as chamadas bandas Q (referentes a transição $a_{2u} \rightarrow e_g$ do anel porfirínico) e uma banda extremamente intensa na região do UV entre 390 a 425 nm, denominada banda Soret (referente a transição $a_{1u} \rightarrow e_g$). Essas bandas são permitidas pela simetria D_{2h} . A coordenação de um metal ao anel porfirínico, substituindo os dois hidrogênios pirrólicos, faz com que haja um aumento da simetria de D_{2h} para D_{4h} . Tal aumento na simetria leva a uma diminuição no número de bandas Q do espectro, além de um deslocamento da banda Soret para comprimentos de onda maiores. Dessa forma, a reação de metalação

pode ser confirmada através da obtenção dos espectros eletrônicos de UV-Visível das porfirinas imobilizadas antes e após a metalação [84, 100].

Na Figura 15, estão mostrados os espectros de UV-Vis da hematoporfirina e protoporfirina em solução, imobilizadas e após a metalação.

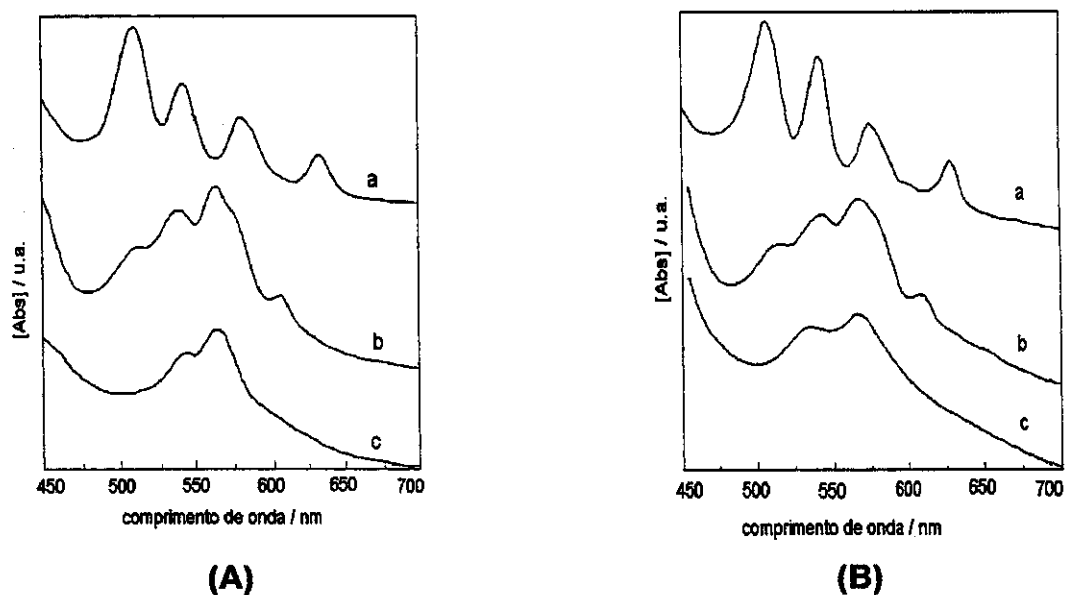


Figura 15. Espectros de UV-Vis da hematoporfirina (A) e protoporfirina (B): a) em solução, b) imobilizada sobre SiNb e c) após a metalação com Co(II).

Os espectros de UV-Vis da hematoporfirina e protoporfirina apresentaram-se bastante semelhantes. As bandas Q para a hematoporfirina IX (Figura 2) em solução foram observadas em 499, 532, 570 e 622 nm. Quando imobilizada (SiNb/H₂HMP), o espectro da porfirina apresentou o mesmo número de bandas, entretanto mais alargadas e de diferentes intensidades em relação às obtidas em solução, provavelmente devido às interações com a matriz. Estas se apresentaram em 506, 536, 560 e 603 nm. Após a metalação foram observadas apenas duas bandas, em 538 e 560 nm. Comportamento similar foi observado para a protoporfirina IX (Figura 2B): em

solução as bandas Q foram observadas em 490, 525, 570 e 650 nm, quando imobilizada na superfície da matriz (SiNb/H₂PP) estas foram observadas em 500, 530, 560 e 625 nm e após a metalização em 530 e 560 nm. Neste caso, a banda Soret não foi mostrada, pois esta não apresentou diferença de comportamento, antes e após a imobilização.

Diferentemente do observado para a protoporfirina e hematoporfirina, os espectros da tetracarboxifenilporfirina, em solução e imobilizada foram bastante similares. Provavelmente, a interação desta porfirina com a matriz SiNb não é tão efetiva em relação a protoporfirina e hematoporfirina. Apesar da TCPP possuir quatro grupos carboxílicos, estes estão dispostos na posição meso do anel porfirínico dificultando a interação com a matriz.

De acordo com a Figura 16 A, antes da metalização, a Banda Soret apresentou-se em 423 nm e as 4 bandas Q em 519, 555, 591, 649 nm (similar ao observado em solução aquosa cujo espectro não está mostrado). Após a metalização, observou-se um pequeno deslocamento da banda Soret para 440 nm além de uma diminuição no número de bandas de Q, de quatro para uma, em 537 nm, e um ombro na faixa de 570 a 580 nm, como pode ser observado através da deconvolução do espectro da Figura 16B.

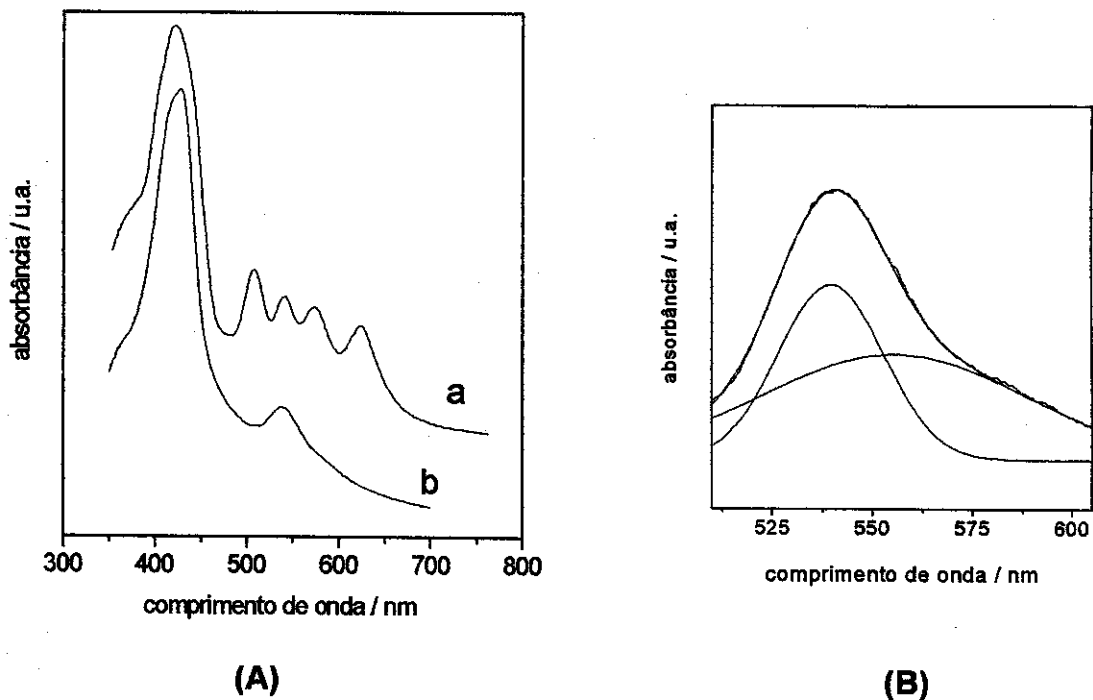


Figura 16. (A) Espectros de UV-Vis tetracarboxifenilporfirina: a) imobilizada sobre SiNb e b) após a metalação com Co(II). (B) Deconvolução do espectro b na faixa de 500 a 600 nm.

4.3. Estudos eletroquímicos das porfirinas imobilizadas

As porfirinas imobilizadas após serem metaladas foram utilizadas como materiais para preparação de eletrodos de pasta de carbono modificados. A protoporfirina e a hematoporfirina metaladas com cobalto, respectivamente denominadas como SiNb/CoPP e SiNb/CoHMP, apresentaram a propriedade de eletrocatalisar a redução de oxigênio dissolvido. A cobalto tetracarboxifenilporfirina, SiNb/CoTCPP, por sua vez,

apresentou uma maior eficiência para oxidação eletroquímica. Neste caso, realizou-se o estudo da oxidação de hidrazina neste eletrodo (SiNb/CoTCCP).

4.3.1. Estudo da redução eletrocatalítica de oxigênio dissolvido nos eletrodos modificados SiNb/CoPP e SiNb/CoHMP .

4.3.1.1. Estudos de voltametria cíclica e de pulso diferencial

Os voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se eletrodos de pasta de carbono modificados com as porfirinas metaladas imobilizadas, SiNb/CoHMP e SiNb/CoPP não apresentaram picos de oxidação ou redução, na ausência de oxigênio, na faixa de potencial -0,6 a 0,6 V vs ECS. Entretanto, na presença de oxigênio, estes apresentaram um pico irreversível em -0,18 V vs ECS para SiNb/CoHMP e -0,16 V vs ECS para SiNb/CoPP.

Para verificar se as porfirinas metaladas são realmente responsáveis pela eletrocatalise da redução O_2 , obteve-se voltamogramas cíclicos, na presença de oxigênio, utilizando-se entretanto eletrodos modificados com as porfirinas não metaladas, SiNb/H₂HMP e SiNb/H₂PP e também com a SiNb. Foi observado que nestes casos a redução ocorreu em aproximadamente -0,40 V vs ECS, potencial próximo a redução direta do oxigênio no eletrodo de grafite [27, 51].

Comparando-se os resultados obtidos com as porfirinas não metaladas (SiNb/H₂HMP e SiNb/H₂PP) e as porfirinas metaladas (SiNb/CoHMP e SiNb/CoPP) observou-se que a redução do O_2 nos eletrodos modificados com estas duas últimas, ocorre em potenciais aproximadamente 200 mV vs ECS mais positivos do que as porfirinas não metaladas. Isto é uma indicação de que apenas com a metalação a

protoporfirina e a hematoporfirina são capazes de eletrocatalisar a redução do O_2 . Esse deslocamento do potencial para regiões mais positivas é de grande importância, pois minimiza o efeito de espécies interferentes as quais são normalmente reduzidas em potenciais mais negativos, aumentando dessa forma a seletividade do eletrodo.

Na Figura 17 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se eletrodos modificados SiNb, SiNb/ H_2HMP , SiNb/CoHMP, na presença e ausência de O_2 . Comportamento similar foi observado para os eletrodos modificados com SiNb/CoPP e SiNb/ H_2PP .

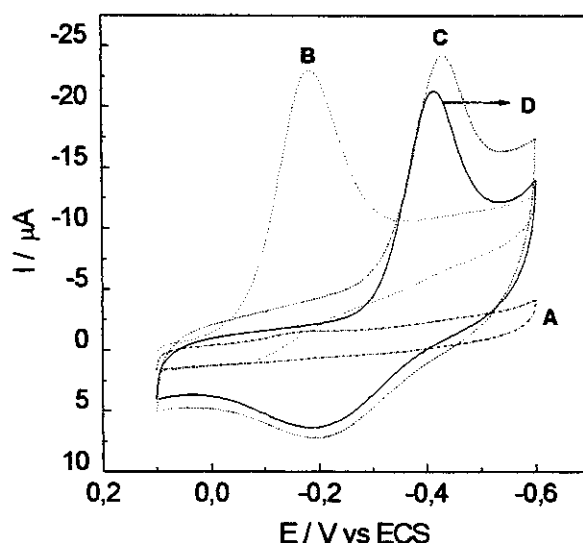


Figura 17. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se eletrodo de pasta de carbono modificado com (A) SiNb/CoHMP na ausência de O_2 , (B) SiNb/CoHMP na presença de O_2 , (C) SiNb e (D) SiNb/ H_2HMP na presença de O_2 . Eletrólito suporte: KCl 1 mol L^{-1} , pH 6,8 e $v=20\text{ mVs}^{-1}$.

Pode ser observado através da Figura 17B, que a redução do O_2 no eletrodo modificado com a porfirina metalada é totalmente irreversível, apresentando um único

pico catódico (Fig. 17B), enquanto que nos eletrodos modificados com SiNb e SiNb/H₂HMP (Figs. 17C e 17D), além do pico catódico é também observado um pico anódico.

Para tentar investigar a origem destes picos foram realizados experimentos utilizando-se os respectivos eletrodos modificados com SiNb e SiNb/ H₂HMP, em soluções do eletrólito contendo H₂O₂, na ausência de O₂. Nestas condições, ambos os eletrodos mostraram um aumento na corrente anódica após subseqüentes adições de peróxido, indicando que estes picos devem ser provavelmente devido a oxidação do H₂O₂ na superfície do eletrodo, formado na reação de redução do oxigênio dissolvido [127]. Em contraste, utilizando-se os eletrodos modificados com as porfirinas metaladas, SiNb/CoPP e SiNb/CoHMP, tal pico anódico não é observado. Como a redução do O₂ pode ocorrer por dois mecanismos distintos, onde o produto pode ser a H₂O ou H₂O₂ [128], provavelmente no caso dos eletrodos modificados com SiNb/CoPP e SiNb/CoHMP, a redução do oxigênio é mais efetiva, levando principalmente à formação de H₂O. Neste caso, sendo a quantidade de H₂O₂ produzido menor do que na reação direta na superfície do eletrodo de pasta de carbono, um pico anódico não é observado.

Através da voltametria de pulso diferencial, técnica mais sensível em relação a voltametria cíclica, foi possível observar os pares de picos relativos ao cobalto presente no anel porfirínico.

Realizando-se a varredura anódica e catódica na faixa de potencial - 0,5 a 0,7 V vs ECS, na ausência de oxigênio, observou-se dois pares de picos tanto para SiNb/CoHMP quanto para SiNb/CoPP, um em aproximadamente - 0,05 V vs ECS e outro em 0,40 V vs ECS. O primeiro par de picos na região negativa pode ser atribuído

ao par redox Co(II)/Co(I) enquanto que o segundo na região positiva de potencial é referente ao par Co(III)/Co(II) [99]. O eletrodo modificado apenas com SiNb não apresentou picos de oxidação ou redução através desta técnica.

Quando adicionado O_2 na cela eletroquímica e realizada a varredura catódica, um pico intenso referente a redução eletrocatalítica do oxigênio é observado em aproximadamente $-0,20 \text{ V vs SCE}$. A Figura 18 mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo modificado com SiNb/CoHMP. Resultado similar foi obtido para o eletrodo modificado com SiNb/CoPP.

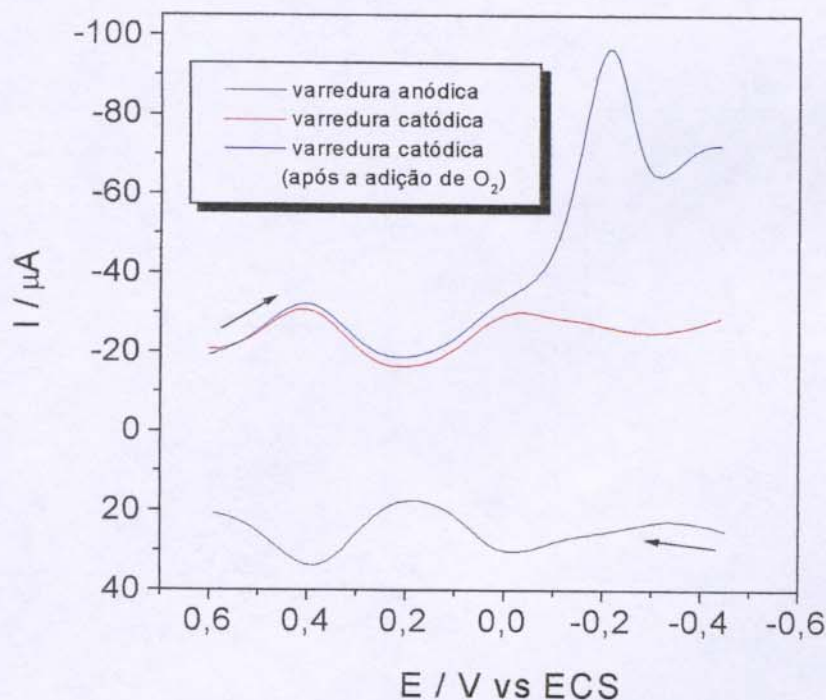


Figura 18. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos utilizando-se o eletrodo modificado com SiNb/CoHMP. As setas indicam a direção de varredura de potencial.

De acordo com a Figura 18, o par redox Co(II)/Co(I) e não Co(III)/Co(II) é que deve estar envolvido no processo de redução do oxigênio dissolvido em tais eletrodos modificados.

O efeito da velocidade de varredura na corrente de pico catódica correspondente à redução do oxigênio, em ambos os eletrodos modificados, está mostrado nas Figuras 19A e 19B (concentração de O_2 na cela mantida constante).

Construindo-se o gráfico de corrente catódica (I_{pc}) versus a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) uma correlação linear foi obtida. Tal comportamento indica que o processo de eletroredução catalítica do O_2 pelos complexos SiNb/CoPP e SiNb/CoHMP é controlado pela difusão do oxigênio à superfície destes eletrodos [86].

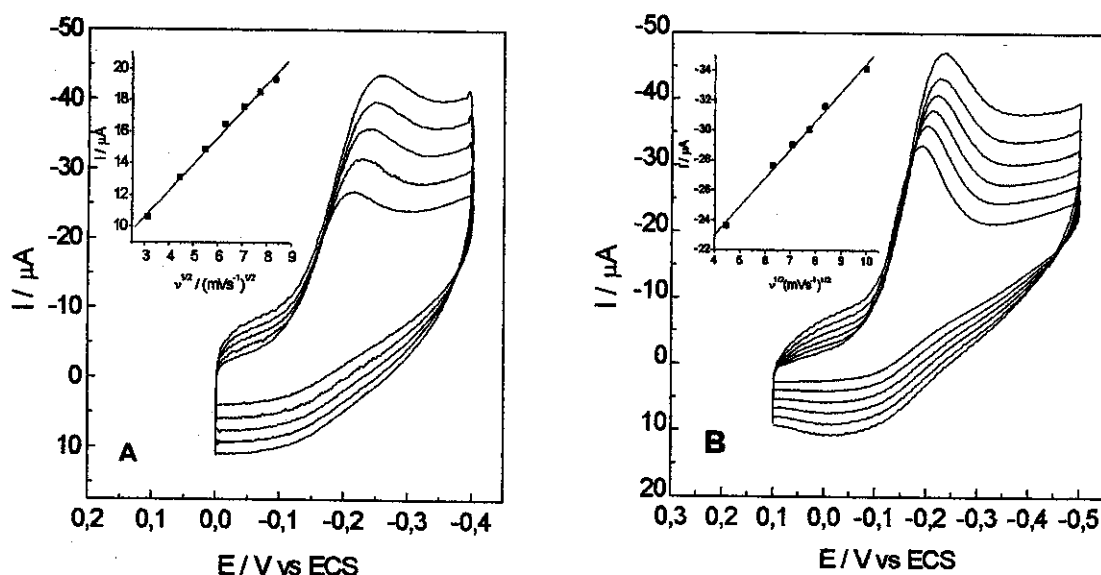


Figura 19. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura utilizando-se os eletrodos modificados (A) SiNb/CoHMP e (B) SiNb/CoPP . Figura inserida: relação I vs $v^{1/2}$. Eletrólito suporte: $\text{KCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,8 e concentração de O_2 de 10 mg L^{-1} .

O pH da solução do eletrólito tem grande influência no potencial de redução do oxigênio em eletrodos de grafite modificados com porfirinas metálicas [51,129]. Nestes casos, o O_2 é geralmente reduzido em potenciais que variam entre 0,40 a -0,4 V vs ECS, dependendo do pH do meio.

A dependência do potencial de redução do O_2 com o pH nos eletrodos modificados SiNb/CoHMP e SiNb/CoPP foi investigada variando-se o pH da solução do eletrólito suporte de pH 1 a 7, a uma concentração fixa de O_2 (10 mg L^{-1}). Na Figura 20, está mostrada a relação entre os potenciais de pico e o pH do meio para ambos os eletrodos modificados.

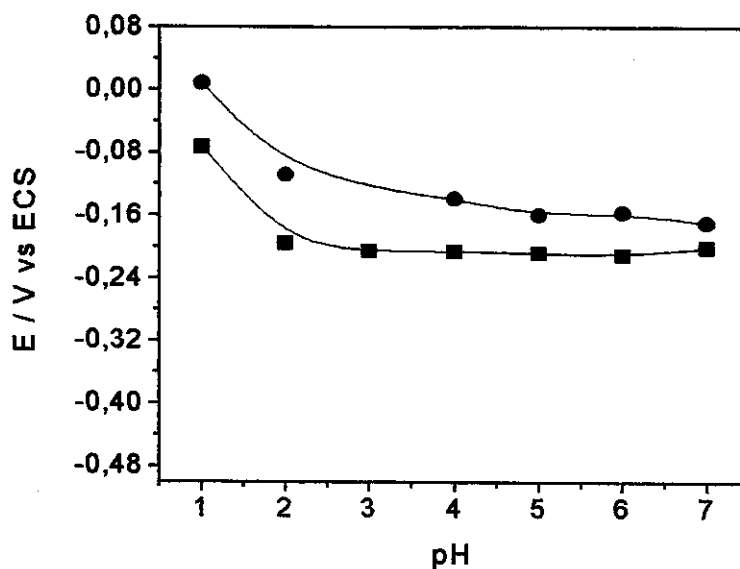


Figura 20. Influência do pH no potencial de redução do oxigênio dissolvido: SiNb/CoPP (●) e SiNb/CoHMP (■).

Diferentemente do comportamento apresentado por outras metaloporfirinas imobilizadas sobre eletrodos de grafite ou em solução, foi observado que entre os valores de pH 2 a 7, os potenciais permaneceram praticamente constantes em -0,20 e

-0,16 V vs ECS para os eletrodos SiNb/CoHMP e SiNb/CoPP, respectivamente. Porém, abaixo de pH 2, um gradual deslocamento na direção positiva de potencial é observado para ambas porfirinas imobilizadas, seguido de uma diminuição significativa das correntes de pico e perda de definição dos voltamogramas para uma mesma concentração de oxigênio.

Tal comportamento revela o caráter ácido da matriz, permitindo que o processo seja independente do pH do meio até pH 2. Abaixo deste pH, o que pode estar ocorrendo é que os grupos silanóis da sílica são protonados, regenerando as espécies $\equiv\text{SiOH}_2^+$ cujo ponto isoelétrico está entre pH 1,2 e 2,5, levando ao lixiviamento das espécies suportadas sobre a superfície da sílica [123], acarretando portanto uma diminuição da corrente. Uma outra hipótese é que abaixo de pH 2 pode ocorrer a desmetalção das porfirinas suportadas, diminuindo dessa forma a atividade catalítica.

Para verificar a relação entre a corrente de pico catódica dos respectivos eletrodos e a concentração de oxigênio, foram obtidos voltamogramas, em solução de KCl 1,0 mol L⁻¹ contendo oxigênio dissolvido em diferentes concentrações, medidas através do eletrodo de Clark. Para isto, a solução do eletrólito suporte foi inicialmente saturada com oxigênio, seguida do borbulhamento controlado de argônio, a fim de se obter concentrações variadas de oxigênio na solução.

Nas Figuras 21A e 21B estão mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes concentrações de oxigênio para os eletrodos SiNb/CoPP e SiNb/CoHMP. Os gráficos das correntes de pico catódico em diferentes concentrações de oxigênio apresentaram uma boa correlação linear para ambos os eletrodos modificados. As retas

obtidas foram ajustadas pelas seguintes equações: $I_{pc}/\mu A = 0,12 + 1,56 [O_2]$ ($R=0,999$) para SiNb/CoHMP e $I_{pc}/\mu A = 0,64 + 1,67 [O_2]$ ($R=0,9987$) para SiNb/CoPP.

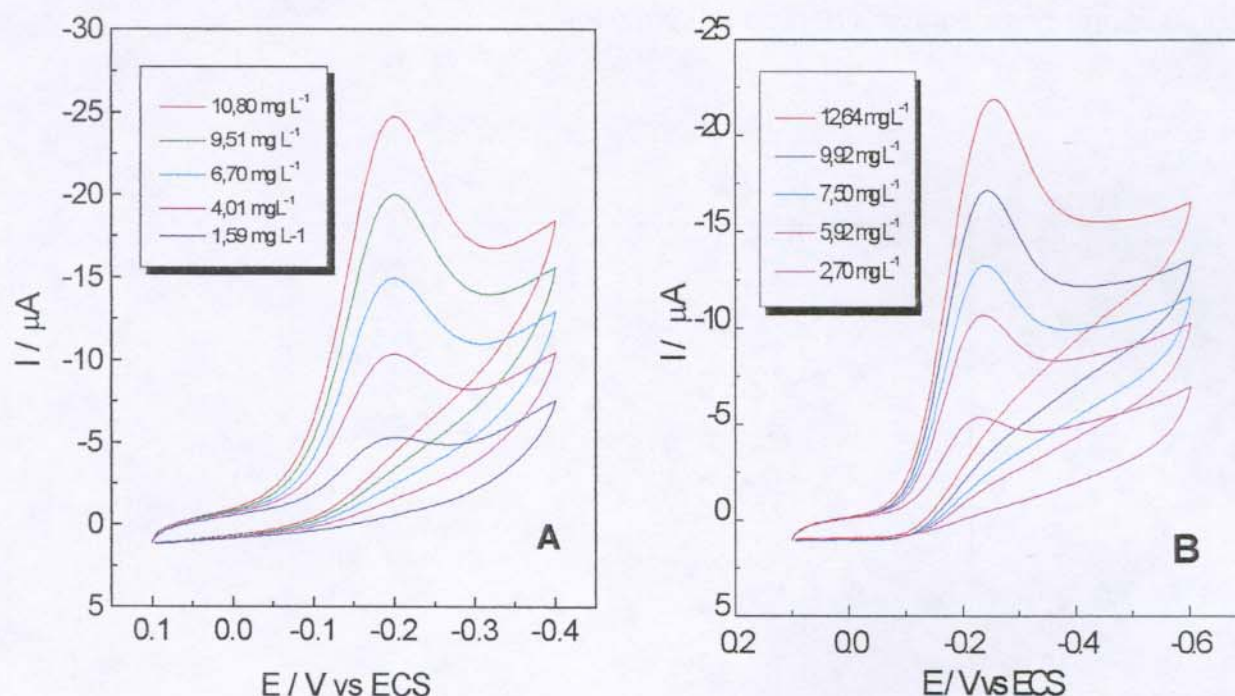


Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes concentrações de O_2 utilizando-se os eletrodos modificados (A) SiNb/CoPP e (B) SiNb/CoHMP. Eletrólito suporte: KCl 1,0 mol L^{-1} , pH 6,8 e $v=20$ mVs $^{-1}$.

Ambos os eletrodos apresentaram-se bastante estáveis. Submetendo-se estes a sucessivas varreduras na presença de uma solução de KCl 1,0 mol L^{-1} saturada com O_2 , foi observado que a corrente catódica permaneceu praticamente constante para o eletrodo SiNb/CoPP após 80 ciclos (Figura 22A), enquanto que para SiNb/CoHMP (Figura 22B) um pequeno decréscimo foi observado (decréscimo de aproximadamente

12% da corrente inicial). Diminuindo-se, entretanto, a concentração do eletrólito de 1,0 mol L⁻¹ para 0,5 mol L⁻¹ não se observou praticamente nenhum decréscimo de corrente após 100 ciclos para este mesmo eletrodo. Do ponto de vista prático, o lixiviamento das espécies eletroativas no eletrodo modificado SiNb/CoHMP, em solução concentrada do eletrólito suporte pode ser considerado desprezível.

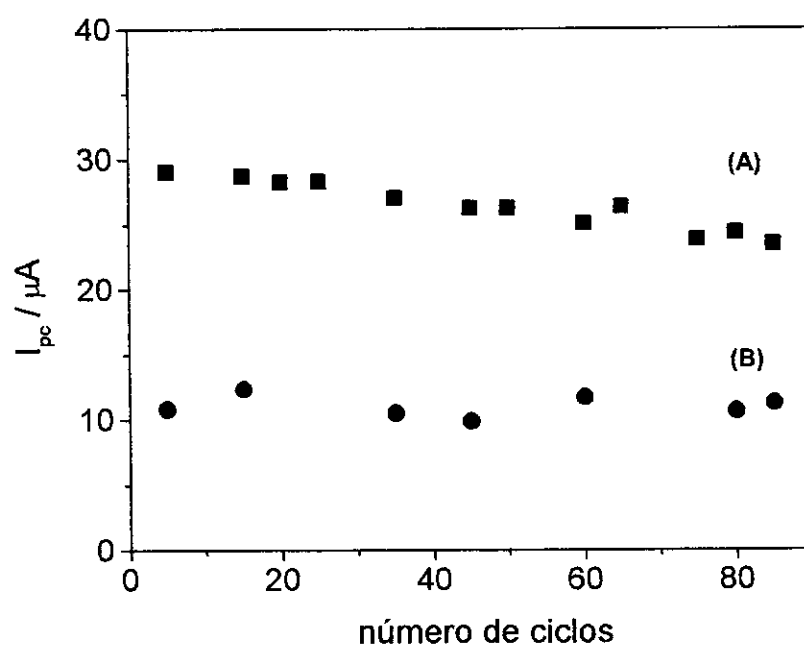


Figura 22. Corrente de pico catódica em função do número de ciclos: SiNb/CoHMP (■) e SiNb/CoPP (●). Eletrólito suporte: KCl 1,0 mol L⁻¹.

4.3.1.2. Estudos com eletrodo de disco rotatório

A redução de oxigênio em eletrodos modificados com metaloporfirinas e ftalocianinas pode ocorrer via dois mecanismos distintos: um que leva a formação de H_2O_2 e envolve a participação de dois elétrons e outro em que o produto final é H_2O e ocorre via quatro elétrons [128].

Estudos com eletrodo de disco rotatório são realizados com o objetivo de se determinar o mecanismo da redução do O_2 em tais eletrodos modificados [95, 96]. Normalmente, tais estudos são realizados em eletrodos sólidos, entretanto eletrodos modificados de pasta de carbono também têm sido recentemente utilizados [130-132]. Portanto, para um melhor entendimento do processo de transferência de elétrons e com o intuito de se determinar o número de elétrons envolvidos na reação de redução de oxigênio em ambos os eletrodos modificados, SiNb/CoHMP e SiNb/CoPP, foram realizados estudos com eletrodo de disco rotatório.

Realizando-se a varredura de potencial em diferentes velocidades de rotação, a uma velocidade de varredura constante (20 mVs^{-1}), utilizando-se os respectivos eletrodos modificados, um aumento da corrente catódica foi observado até no máximo 800 rpm, para ambos os casos. O gráfico de Levich (I vs $\omega^{1/2}$) apresentou-se não linear (Figuras 23A para o eletrodo SiNb/CoHMP) especialmente para velocidades de rotação mais altas. Tal comportamento indica a presença de um processo químico limitante no mecanismo, anterior ao processo de transferência de elétrons (mecanismo catalítico químico-eletroquímico). Isto sugere que o processo deve ocorrer provavelmente com formação de um aduto entre o centro metálico, cobalto, e a molécula de O_2 ($\text{Co}^{\text{II}}-\text{O}_2$), sendo este posteriormente reduzido, de acordo com o observado para a maioria das

porfirinas de cobalto [86, 87]. Comparando-se os gráficos de Koutecky-Levich ($1/i$ vs $1/\omega^{1/2}$) obtidos experimentalmente com os gráficos calculados para $n=2$ e $n=4$, pode-se estimar o número de elétrons envolvidos no processo. Para o cálculo das curvas para $n=2$ e $n=4$, utilizou-se a equação de Levich (eq.4).

$$i_L = 0,620nFAD^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}C$$

Eq. 4

Onde i_L é a corrente limitante, n é o número de elétrons envolvidos na redução do O_2 ($n=2$ ou $n=4$), A é a área do eletrodo ($0,28 \text{ cm}^2$), D o coeficiente de difusão, ν viscosidade cinemática da solução ($0,01 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), C é a concentração de oxigênio ($1,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), ω é a velocidade de rotação e F a constante de Faraday. O coeficiente de difusão utilizado na eq. 4 foi determinado para ambos os eletrodos, através da técnica de cronoamperometria, utilizando-se a equação de Cottrell [120], o qual foi $D_{\text{CoPP}} = 5,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $D_{\text{CoHMP}} = 5,8 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, valores próximos aos obtidos utilizando-se eletrodos similares modificados com sílica [131,132].

Através dos gráficos de Koutecky-Levich foi observado que as inclinações das retas dos gráficos de Koutecky-Levich obtidas experimentalmente apresentam uma inclinação mais próxima a das retas calculadas para $n=4$. Para SiNb/CoPP o coeficiente angular experimental foi $B_{\text{exp}}=0,06144$ enquanto que o teórico (calculado através da equação de Levich) foi $B_{\text{teom}=4}=0,0622$, para $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{CoHMP}$, $B_{\text{exp}}=0,06417$ e $B_{\text{teom}=4}=0,0632$. Isto é uma indicação de que o processo de redução do O_2 , em ambos os eletrodos modificados, aproxima-se mais de um mecanismo envolvendo 4 elétrons, isto é, onde o oxigênio é reduzido diretamente à H_2O .

Na Figura 23B, estão mostrados os gráficos de Koutecky Levich experimental e calculados para $n=2$ e $n=4$, para o eletrodo modificado SiNb/CoHMP.

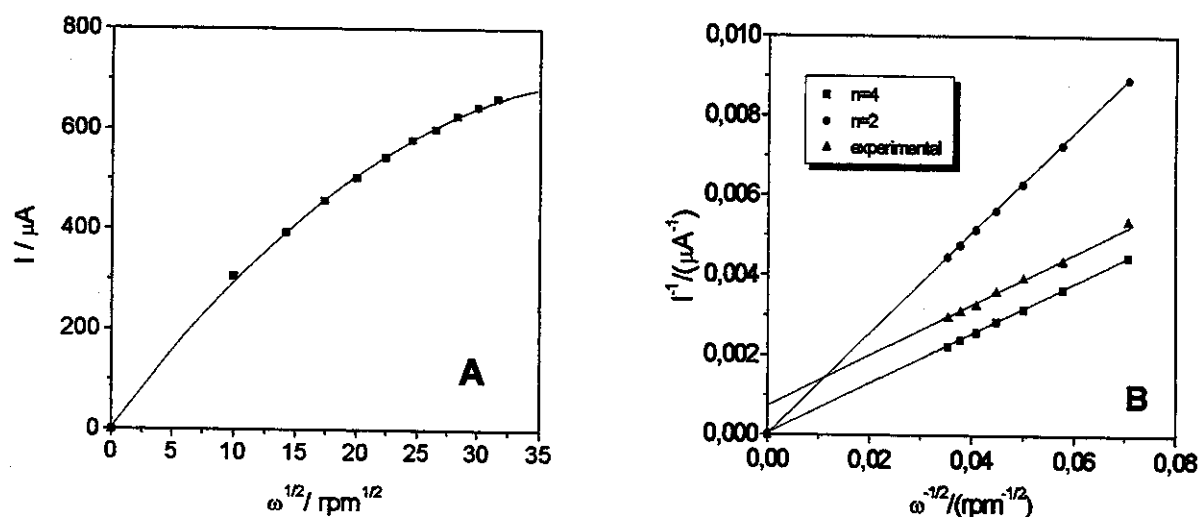


Figura 23. (A) Gráfico de Levich e (B) Gráficos de Koutecky-Levich calculados para $n=2$ e $n=4$ e experimental para o eletrodo modificado SiNb/CoHMP.

De acordo com a literatura, este mecanismo via 4 elétrons (redução direta do O_2 a H_2O) ocorre geralmente em eletrodos modificados com porfirinas diméricas ou cofaciais e porfirinas de cobalto multinucleares com complexos metálicos retrodoadores ligados ao anel porfirínico [133,134], embora resultados similares têm sido observados em eletrodos modificados com porfirinas monoméricas [97,98,135]. No caso das porfirinas monoméricas, a formação de H_2O implica que a molécula de O_2 interaja com dois centros metálicos das porfirinas, formando o estado de transição $Co-O-O-Co$. A molécula ativada pode então receber 4 elétrons, promovendo a quebra da ligação $O-O$.

Dessa forma, para que a redução do O_2 ocorra segundo este mecanismo é necessário que haja uma relativa aproximação dos centros metálicos na superfície do eletrodo.

Calculando-se os valores de rugosidade dos respectivos eletrodos modificados, através da equação: $\Gamma = Q/nFA$ (onde Q é a carga obtida integrando-se a área sobre as curvas voltamétricas), obteve-se os seguintes valores: $\Gamma(\text{SiNb/CoHMP}) = 1,1 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}$ e $\Gamma(\text{SiNb/CoPP}) = 1,8 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}$. Alguns exemplos encontrados na literatura, como o complexo de tetrametilporfirinato de cobalto (porfirina monomérica) imobilizado sobre a superfície de grafite pirolítico, que catalisa a redução de O_2 a H_2O , apresenta uma rugosidade de $\Gamma = 9 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ [98]. A porfirina de cobalto sem substituintes na posição meso do anel, a mais simples das porfirinas, imobilizada sobre grafite pirolítico que também catalisa a redução de O_2 a H_2O apresenta $\Gamma = 1,3 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ [97]. Pode ser observado que os eletrodos modificados com SiNb/CoHMP e SiNb/CoPP apresentam uma rugosidade consideravelmente maior provavelmente devido a maior área superficial e conseqüentemente maior porosidade da matriz. Deste modo, a interação entre a molécula de O_2 com dois centros metálicos formando a ligação Co-O-O-Co, modelo utilizado para explicar a redução direta de O_2 a H_2O em porfirinas monoméricas [97-99] constitui uma explicação plausível.

4.3.1.3. Estudo da potencialidade dos eletrodos modificados SiNb/CoPP e SiNb/CoHMP como sensores para O_2 dissolvido- Estudos amperométricos.

A determinação de oxigênio dissolvido em águas naturais é de extrema importância no controle ambiental. Além disto, um grande número de reações enzimáticas tem o oxigênio como substrato e a verificação do andamento destas

reações é feita justamente através do consumo do mesmo. O eletrodo de Clark é o dispositivo mais utilizado com este propósito, entretanto devido ao baixo potencial aplicado ($-0,60$ V vs Ag/AgCl e $-0,55$ V vs ECS), este necessita da utilização de uma membrana semi-permeável para evitar a interferência de outras espécies presentes no meio. Por essa razão, o desenvolvimento de um dispositivo para determinação específica de oxigênio é de grande interesse.

Com o intuito de se verificar a potencialidade de tais eletrodos modificados, SiNb/CoHMP e SiNb/CoPP, como sensores amperométricos para oxigênio dissolvido, foram realizados estudos utilizando-se a técnica de cronoamperometria.

Primeiramente, foram realizados experimentos para se verificar qual o melhor potencial a ser aplicado em ambos os eletrodos. Para tanto, foram aplicados diferentes potenciais e medidas as correntes catalíticas obtidas para uma solução saturada de oxigênio. Na Figura 24 estão mostrados os resultados destes experimentos para os dois eletrodos modificados. Pode ser observado que para o eletrodo modificado com SiNb/CoHMP, a redução do O_2 inicia-se em $-0,10$ V vs ECS, atingindo um valor constante em $-0,25$ V vs ECS. Para o eletrodo modificado, SiNb/CoPP, comportamento similar foi observado, entretanto este estabilizou-se a um potencial um pouco mais positivo, em $-0,20$ V vs ECS. Tais potenciais são consideravelmente mais positivos em relação a alguns eletrodos utilizados na redução de oxigênio, onde potenciais em torno de $-0,40$ e $-0,50$ V vs ECS necessitam ser aplicados [136,137].

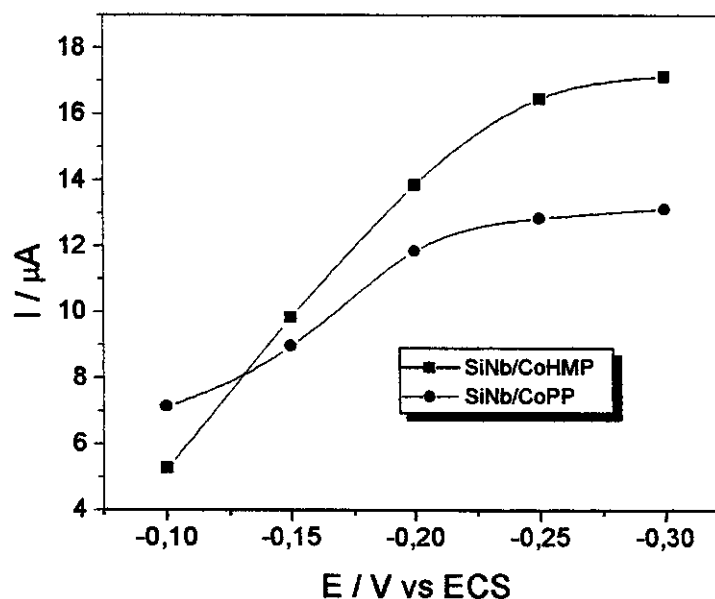


Figura 24: Relação entre a corrente e o potencial aplicado, obtida por cronoamperometria, fixando-se a concentração em $[O_2]=10 \text{ mg L}^{-1}$: SiNb/CoHMP(■) e SiNb/CoPP(●).

Dessa forma, o desempenho dos respectivos eletrodos modificados foi verificado através da técnica de cronoamperometria, fixando-se o potencial em $-0,25 \text{ V vs ECS}$ para SiNb/CoHMP e $-0,20 \text{ V vs ECS}$ para SiNb/CoPP. Neste caso, a concentração de O_2 na cela foi variada através do borbulhamento de gás e a corrente catalítica gerada nas diferentes concentrações foi então medida. As concentrações de O_2 na cela foram determinadas simultaneamente utilizando-se o eletrodo de Clark. O cronoamperograma obtido para SiNb/CoHMP está mostrado na Figura 25 (foi também obtido um

cronoamperograma para SiNb/CoPP, não mostrado). O tempo de resposta de ambos os eletrodos foi bastante curto, menor que 3s.

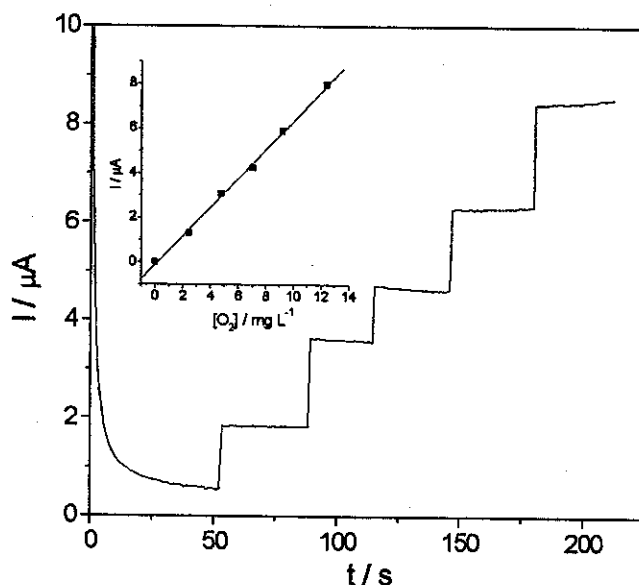


Figura 25: Cronoamperograma obtido com o eletrodo modificado SiNb/CoHMP, após sucessivas adições de O_2 , fixando-se o potencial em $-0,25 \text{ V}$ vs ECS. Figura inserida: Relação entre corrente e a concentração de O_2 em mg L^{-1} . Eletrólito suporte: KCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 6,8.

Construindo-se o gráfico de corrente catódica versus a concentração de O_2 dissolvido, uma correlação linear na faixa de 2 a 10 mg L^{-1} foi obtida para ambos os eletrodos. Para SiNb/CoHMP e SiNb/CoPP, as retas obtidas foram ajustadas pelas seguintes equações, respectivamente: $I_{\text{pc}} / \mu\text{A} = -0,14 + 0,55 [\text{O}_2]$ ($R=0,998$, para $n=6$) e $I_{\text{pc}} / \mu\text{A} = -0,14 + 0,37 [\text{O}_2]$ ($R=0,9979$ para $n=7$). Para testar a resposta dos eletrodos em amostras reais, foram utilizadas amostras de água potável recolhidas no Instituto de Química / UNICAMP e analisadas com os respectivos eletrodos modificados. Os

resultados obtidos foram comparados com os obtidos utilizando-se o eletrodo de Clark e estão ilustrados na Tabela 2.

Tabela 2: Medidas de O₂ dissolvido em amostras de água potável, utilizando-se o eletrodo de Clark e os eletrodos de pasta de carbono modificados com SiNb/CoHMP e SiNb/CoPP.

Amostra	Eletrodo de Clark	Eletrodos modificados
	O ₂ / mg L ⁻¹	O ₂ / mg L ⁻¹
1	4,12 ± 0,01	4,14 ± 0,05 ^[1]
2	4,45 ± 0,01	4,50 ± 0,06 ^[2]

[1] SiNb/CoHMP, [2] SiNb/CoPP

Os resultados obtidos (média de 3 determinações) encontram-se com um nível de confiança de 95% e estão próximos aos valores obtidos utilizando-se o eletrodo de Clark. Tais resultados mostram a potencialidade da utilização de tais eletrodos como sensores amperométricos para O₂ dissolvido em meio aquoso.

4.3.2. Estudo da oxidação eletrocatalítica da hidrazina sobre o eletrodo modificado SiNb/CoTCPP.

O eletrodo de pasta de carbono modificado com a tetracarboxifenilporfirina de cobalto quando na presença de oxigênio, apresentou um pico irreversível em - 0,35 V vs ECS, potencial bastante próximo ao da redução direta do O₂ em eletrodos de grafite [51]. Tal fato deve ocorrer provavelmente devido a própria estrutura da porfirina a qual apresenta grupos substituintes volumosos na posição meso (carboxifenil), diferentemente da hematoporfirina e protoporfirina. Estes grupos além de serem relativamente volumosos podem sofrer rotação, dificultando a formação do aduto entre o oxigênio e o cobalto presente na estrutura das porfirinas.

Neste caso então, testou-se a atividade eletrocatalítica do eletrodo modificado com SiNb/CoTCPP para a oxidação eletroquímica da hidrazina (NH₂-NH₂).

A hidrazina é uma molécula altamente reativa que pode ser oxidada via quatro elétrons a nitrogênio. Esta possui dois pares de elétrons localizados sobre átomos de nitrogênio com hibridização sp³. Tais características conferem a esta molécula alta afinidade por centros metálicos [138].

A importância no desenvolvimento de um sensor para hidrazina justifica-se pela ação toxicológica desta classe de compostos, já que estas interagem com o DNA por ligações covalentes e inúmeros compostos hidrazínicos são lançados ao meio ambiente pela indústria. Conseqüentemente, o controle dos níveis desta substância é de grande importância biológica.

4.3.2.1. Estudos de voltametria cíclica

Na Figura 26 estão os voltamogramas cíclicos obtidos após adições sucessivas de hidrazina utilizando-se o eletrodo modificado com SiNb/CoTCPP. Observou-se, após adição de hidrazina, a formação um pico irreversível bem definido em aproximadamente 0,40 V vs ECS. Este potencial de oxidação da hidrazina é considerado relativamente baixo uma vez que a mesma é oxidada em eletrodos de platina em potenciais em torno de 1,16 V [139].

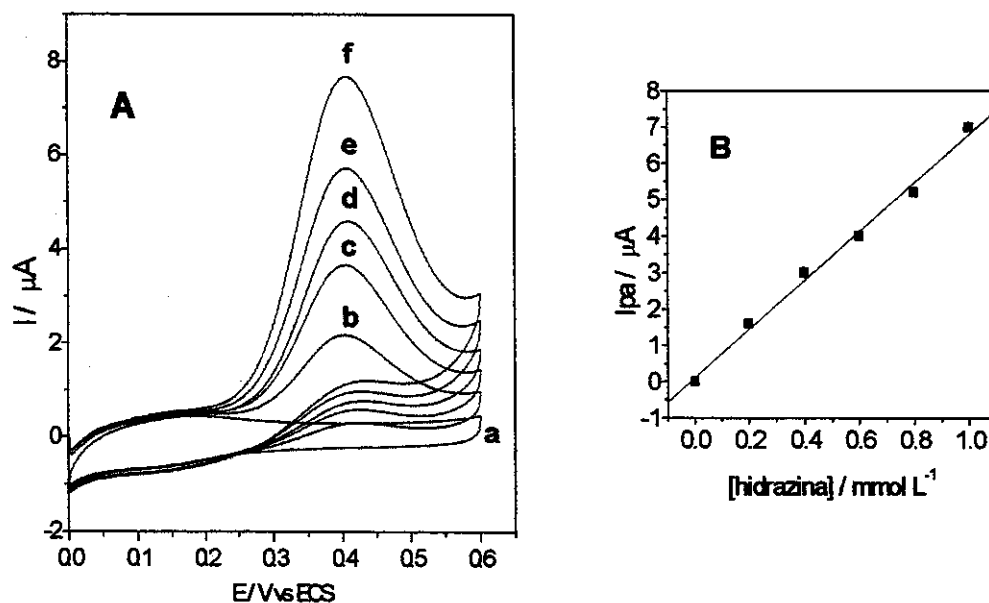


Figura 26. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se o eletrodo modificado SiNb/CoTCPP na ausência e após adições sucessivas de hidrazina. Concentrações de hidrazina (mol L^{-1}): a= 0, b= $2,0 \times 10^{-4}$, c= $4,0 \times 10^{-4}$, d= $6,0 \times 10^{-4}$, e= $8,0 \times 10^{-4}$, f= $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em KCl 0,5 mol L^{-1} , $v=20 \text{ mVs}^{-1}$ e (B) Relação entre a corrente de pico anódica, I_{pa} , e a concentração de hidrazina.

Para confirmar se a porfirina metalada é realmente a responsável pela eletrocatalise da oxidação da hidrazina, realizou-se medidas utilizando-se o eletrodo modificado com a porfirina não metalada na ausência e presença da hidrazina na solução do eletrólito suporte (Figura 27). Neste caso, observou-se após a adição da hidrazina apenas um pequeno aumento da corrente em aproximadamente 0,60 V vs ECS, indicando que apenas a porfirina metalada com Co(II) eletrocatalisa a reação de oxidação da hidrazina.

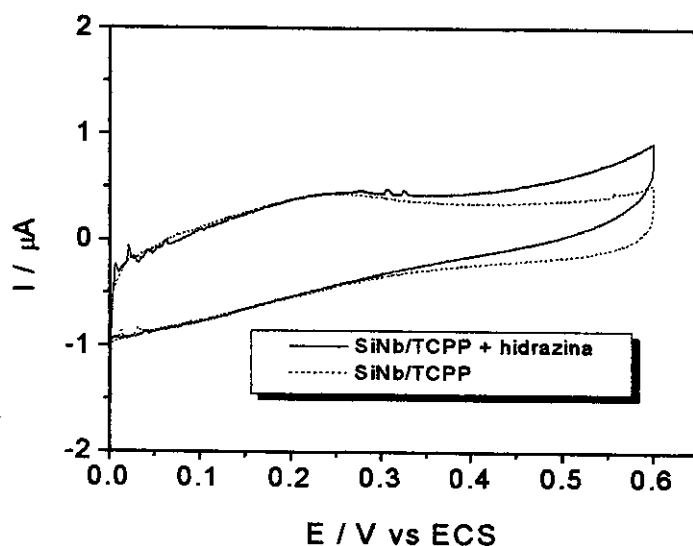


Figura 27. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se o eletrodo de pasta de carbono modificado com SiNb/TCPP na ausência e presença de hidrazina ([hidrazina] = 1×10^{-3} mol L⁻¹). Eletrólito suporte: KCl 0,5 mol L⁻¹, $v = 20$ mVs⁻¹.

4.3.2.2. Estudos amperométricos

Estudos em diferentes pHs da solução do eletrólito suporte mostraram que embora o potencial de oxidação da hidrazina não se desloque com o pH (mantendo-se na faixa 0,35-0,40V), a corrente decresce de maneira significativa a medida que varia-se o pH de 7 a 2, como pode ser observado na Figura 28. A melhor eficiência catalítica (melhor resposta de corrente) foi observada em pH 7. Abaixo deste pH a corrente de pico anódica tende a diminuir significativamente. Em pHs menores que 3, praticamente não há resposta de corrente. Este comportamento foi observado para outros eletrodos modificados com complexos metálicos, sendo atribuído a baixa afinidade entre a hidrazina protonada e o centro metálico [26, 79, 140].

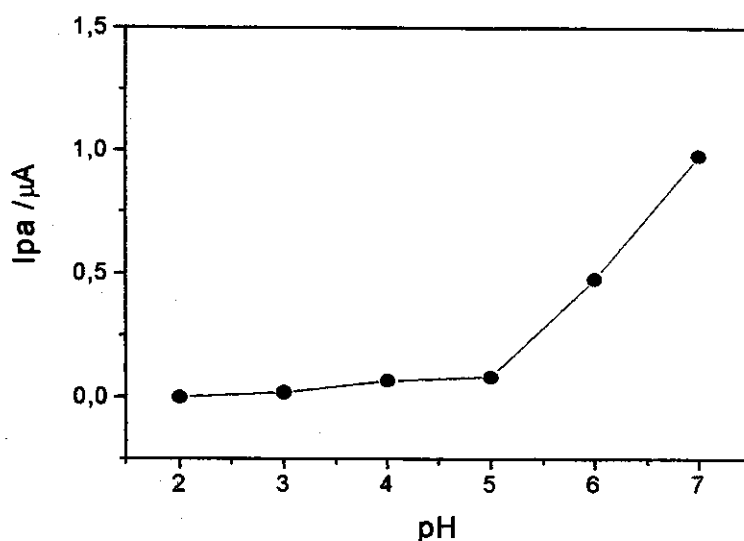


Figura 28: Influência do pH da solução do eletrólito suporte na resposta do eletrodo SiNb/CoTCPP para hidrazina. Potencial aplicado: 0,40 V vs ECS e [hidrazina] = 2×10^{-4} mol L⁻¹.

Através da amperometria, aplicando-se diferentes potenciais ao eletrodo modificado com SiNb/CoTCPP, foi observado que a reação catalítica inicia-se em 0,20 V vs ECS. Acima deste potencial, a resposta de corrente tende a aumentar até aproximadamente 0,40 V vs ECS, atingindo então um patamar, como pode ser observado na Figura 29.

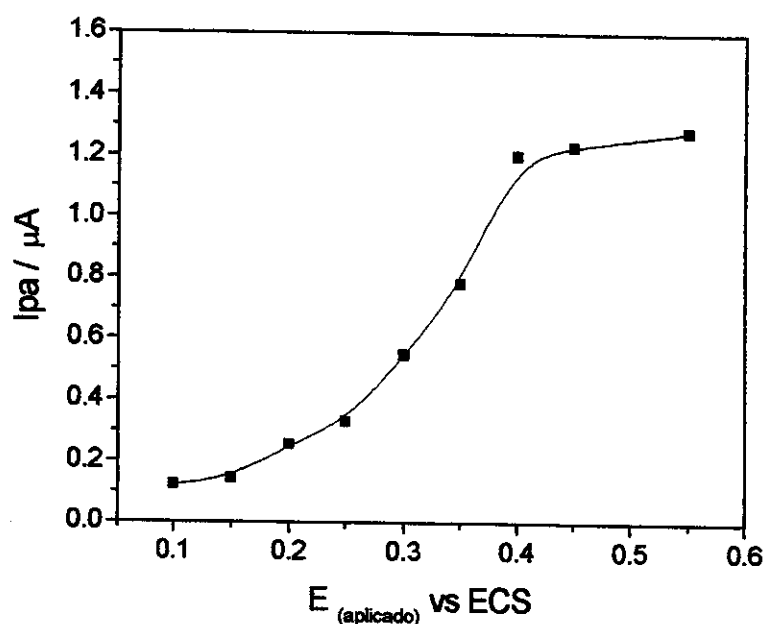


Figura 29: Relação entre a corrente e o potencial aplicado, obtida por cronoamperometria, para o eletrodo modificado com SiNb/CoTCPP. ([hidrazina] = 2×10^{-4} mol L⁻¹, pH 7).

Dessa forma, todos os estudos subsequentes foram realizados aplicando-se um potencial de 0,40 V vs ECS em pH 7 (tampão tris). Nestas condições, uma resposta linear de corrente foi obtida entre 1×10^{-5} a 5×10^{-4} mol L⁻¹ de hidrazina,

ajustada pela seguinte equação da reta: $I = 0,032 + 4,32 [\text{hidrazina}]$ ($R = 0,999$), onde I é expressa em μA e a concentração de hidrazina em mmol L^{-1} . Na Figura 30A e 30B estão mostrados respectivamente o cronoamperograma obtido após adições sucessivas de hidrazina e a relação entre a corrente e a concentração. O tempo de resposta do eletrodo (Figura 30 inserida) foi bastante rápido, de apenas 1s, o qual é de grande importância, pois possibilita o seu uso em sistemas em fluxo.

O eletrodo apresentou-se estável por um longo tempo de uso contínuo (no mínimo 15 dias) sugerindo que os produtos de oxidação da hidrazina não ficaram adsorvidos na superfície do eletrodo.

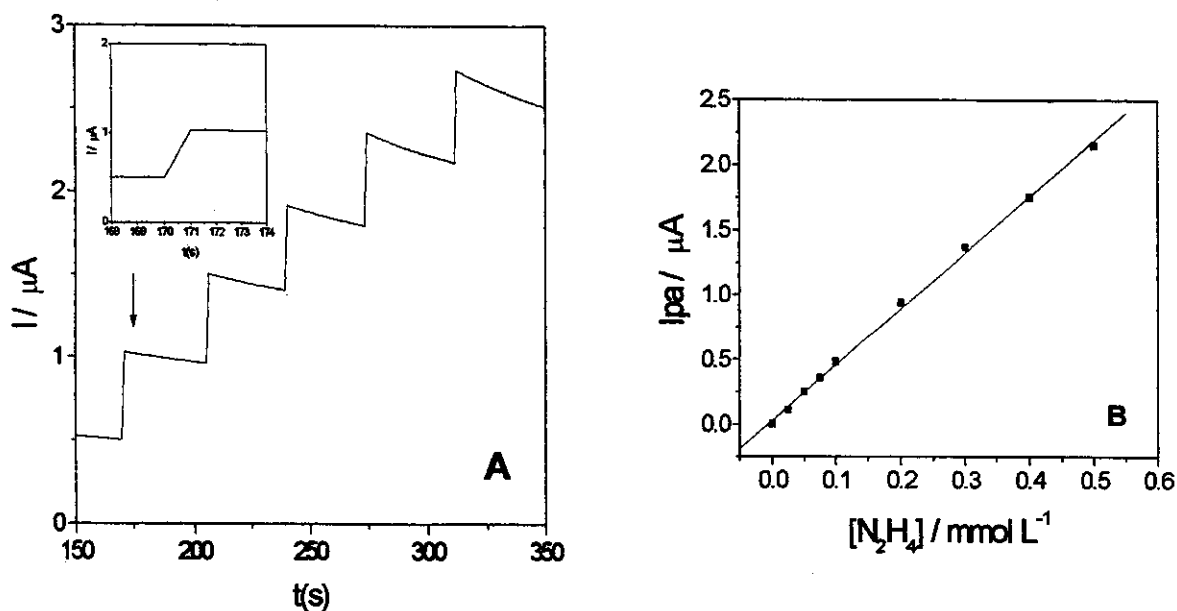


Figura 30. (A) Cronoamperograma obtido após adições sucessivas de hidrazina, fixando-se o potencial em 0,40 V vs ECS. Figura inserida: Tempo de resposta do eletrodo. **(B)** Relação entre a corrente anódica e a concentração de hidrazina na faixa de 1×10^{-5} a $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão tris 0,1 mol L^{-1} / KCl 0,1 mol L^{-1} .

A dependência logarítmica da corrente de pico e a concentração de hidrazina (mostrada na Figura 31) foi linear na faixa de 1×10^{-5} a 5×10^{-4} mol L⁻¹, com uma inclinação de aproximadamente 1, indicando que a reação catalítica obedece uma cinética de 1^a ordem com relação a concentração de hidrazina em solução. Tal resultado foi similar ao obtido para um eletrodo de pasta de carbono modificado com complexo de ródio utilizado para eletrocatalisar a reação de oxidação de hidrazina [140].

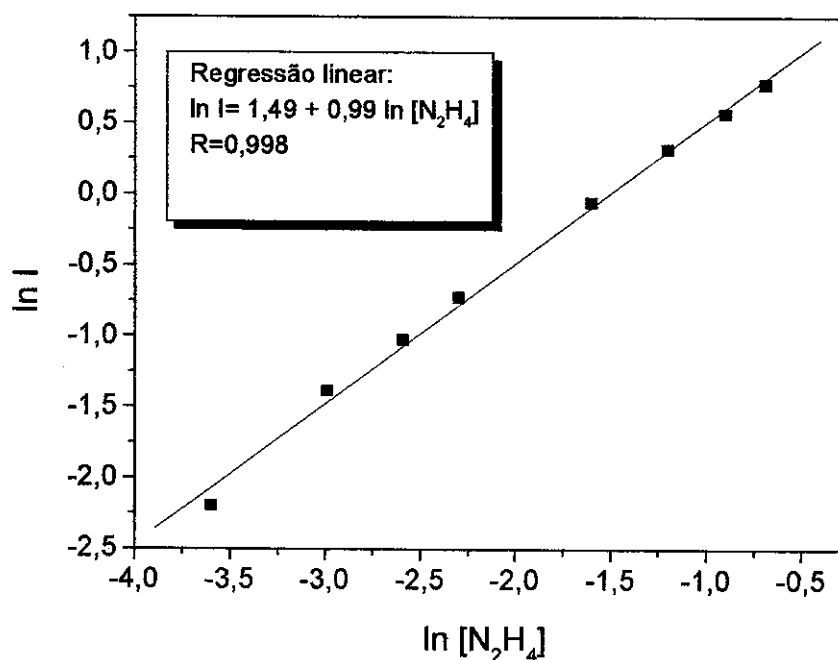


Figura 31. Dependência logarítmica da corrente de pico anódica e a concentração de hidrazina.

4.4. Imobilização do ácido ferroceno monocarboxílico sobre a SiNb

O ácido ferroceno monocarboxílico foi também imobilizado sobre a sílica modificada com o óxido de nióbio, SiNb, com o intuito de se desenvolver um novo eletrodo modificado de pasta de carbono. A sua imobilização deve ocorrer de maneira similar a das porfirinas [126].

A quantidade de ferroceno imobilizado sobre a SiNb determinada através da análise elementar foi de $0,12 \text{ mmol g}^{-1}$.

4.4.1. Estudos eletroquímicos utilizando-se o eletrodo modificado com SiNb/FeCp₂COOH- Estudos de voltametria cíclica.

Estudos eletroquímicos do ferroceno monocarboxílico imobilizado foram primeiramente realizados através da técnica de voltametria cíclica. O voltamograma cíclico obtido utilizando-se o eletrodo de pasta de carbono modificado apenas com a sílica nióbio, SiNb, não apresentou resposta redox. Entretanto, ao se utilizar o eletrodo modificado com o material, SiNb/FeCp₂COOH, um par de picos bem definidos foi observado, com um potencial médio $E_M = 0,30 \text{ V vs ECS}$, referente ao processo redox, [FeCp₂COOH]/[FeCp₂COOH]⁺. Este potencial é similar ao observado para o ferroceno monocarboxílico imobilizado sobre a sílica-titânio [28] e um pouco mais positivo em relação ao observado em solução ($E_M = 0,281 \text{ V vs ECS}$), provavelmente devido a interação com a matriz [101].

Na Figura 32 estão mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura para o eletrodo modificado, SiNb/FeCp₂COOH. A separação

entre os potenciais de pico foi cerca de 20 mV e esta não variou com a velocidade de varredura, indicando que o processo de transferência de elétrons entre o ferroceno imobilizado e o material do eletrodo é bastante eficiente.

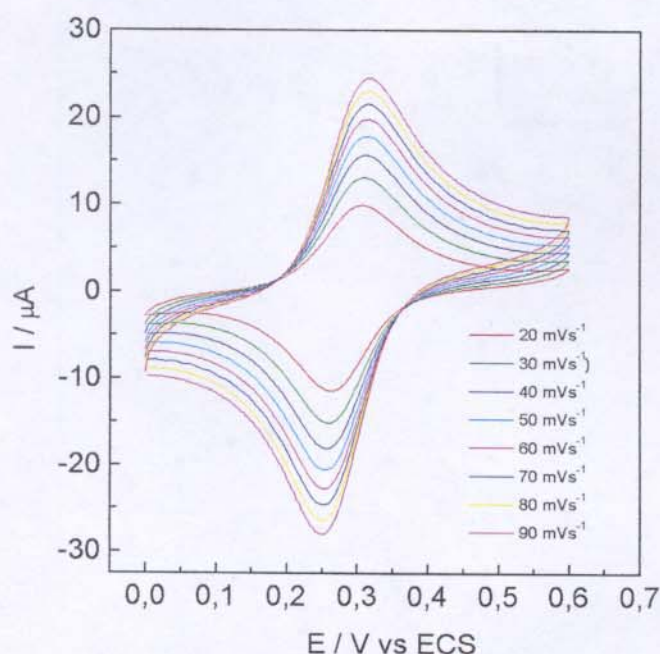


Figura 32. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura para o eletrodo de pasta de carbono modificado com SiNb/FeCp₂COOH. Eletrólito suporte: KCl 0,5 mol L⁻¹ e pH 6,8.

As correntes de pico apresentaram uma relação linear com a raiz quadrada velocidade, I_p vs $v^{1/2}$ (Figura 33), indicando um comportamento similar ao difusional e não de espécie adsorvida (relação linear entre I_p e v). Tal comportamento poderia levar a conclusão de que a espécie está sendo lixiviada da superfície da matriz durante o processo redox.

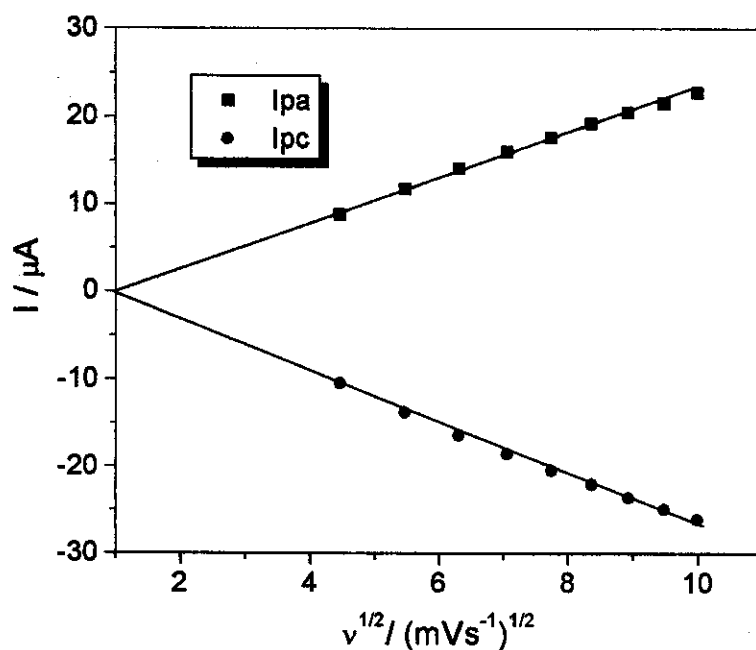


Figura 33. Relação entre as correntes de pico anódico e catódico (I_{pa} e I_{pc}) e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

Entretanto, submetendo-se o eletrodo a cerca de 100 ciclos redox em KCl 1 mol L^{-1} , apenas um pequeno decréscimo de corrente foi observado, indicando que a espécie apresenta-se fortemente adsorvida na superfície da matriz (Figura 34). Dessa forma, a linearidade da corrente com a raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 33) deve ser decorrente do movimento dos íons do eletrólito suporte através da interface eletrodo-solução durante o processo redox para compensação de carga. Este comportamento foi observado para a maioria dos eletrodos modificados com sílica com espécies eletroativas adsorvidas [26].

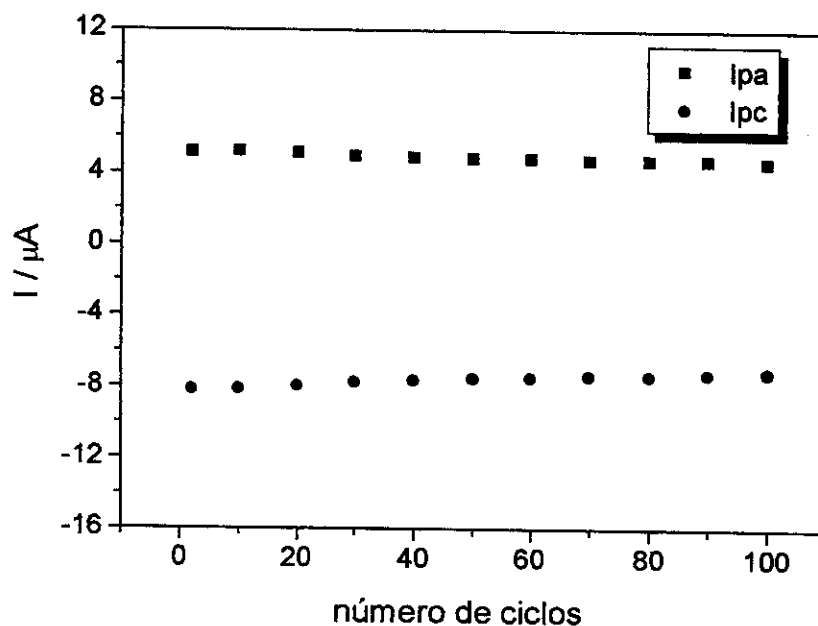


Figura 34. Estabilidade do eletrodo: relação entre as correntes de pico e o número de ciclos em KCl 1,0 mol L⁻¹ e $v=20$ mVs⁻¹.

A natureza do cátion e ânion do eletrólito suporte não afetou de maneira significativa o potencial médio, E_M , o qual permaneceu praticamente constante em aproximadamente 0,29 V vs ECS, como pode ser observado através dos dados da Tabela 3. Isto indica que estes difundem livremente através da interface eletrodo-solução e não interagem com as espécies imobilizadas sobre a SiNb. Tal comportamento pode ser atribuído a natureza da sílica gel utilizada, a qual apresenta um diâmetro médio de poros de 10 nm e, portanto, maior que o tamanho dos íons hidratados.

Tabela 3: Potenciais médios, E_M vs ECS, obtido para o eletrodo modificado SiNb/FeCp₂COOH em diferentes íons do eletrólito suporte 0,5 mol L⁻¹, $v=20$ mVs⁻¹.

Íons	E_M (V)	ΔE (V)	Íons	E_M (V)	ΔE (V)
Cl ⁻	0,294	0,046	Na ⁺	0,282	0,044
NO ₃ ⁻	0,290	0,041	K ⁺	0,285	0,041
SO ₄ ²⁻	0,287	0,042	NH ₄ ⁺	0,286	0,039

Para os ânions estudados, os respectivos sais de sódio foram utilizados, enquanto que para os cátions foram utilizados os cloretos.

O efeito do pH da solução do eletrólito na resposta eletroquímica foi também investigado e está mostrado na Figura 35. Observou-se que na faixa de pH 1 a 7,5, não houve variação significativa nos valores dos potenciais médios. Estes permaneceram praticamente constantes em torno de $0,30 \pm 0,02$ V vs ECS.

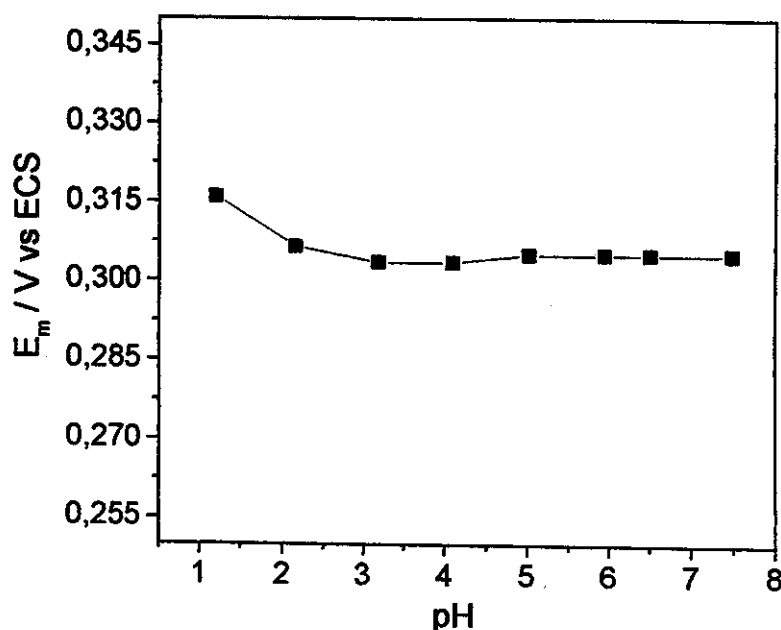


Figura 35. Influência do pH no potencial médio, E_m , do eletrodo modificado, SiNb/FeCp₂COOH.

4.4.2. Oxidação eletrocatalítica do NADH

A determinação de NADH é de grande interesse na construção de biossensores amperométricos baseados em enzimas desidrogenases (enzimas NAD⁺ dependentes). No entanto, como a oxidação direta do NADH em eletrodos sólidos (Pt, C) requer a aplicação de altos sobrepotenciais [109-110], torna-se necessária a utilização de mediadores de elétrons. Dentre os mediadores mais utilizados na oxidação de NADH estão o ferroceno e seus derivados [116-117].

Dessa forma, a atividade eletrocatalítica do ácido ferroceno monocarboxílico imobilizado sobre a SiNb, SiNb/FeCp₂COOH, foi então verificada utilizando-se NADH como substrato.

A Figura 36 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos na ausência (Figura 36B) e presença (Figura 36C) de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NADH na solução do eletrólito KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 6,8. Pode ser observado que na presença da coenzima NADH ocorre um aumento da corrente de pico anódica em torno de $0,30 \text{ V}$ vs ECS, indicando que o ferroceno imobilizado eletrocatalisa a reação de oxidação do NADH (a oxidação direta do NADH no grafite ocorre em torno $0,55\text{-}0,60 \text{ V}$ vs ECS [109,111]).

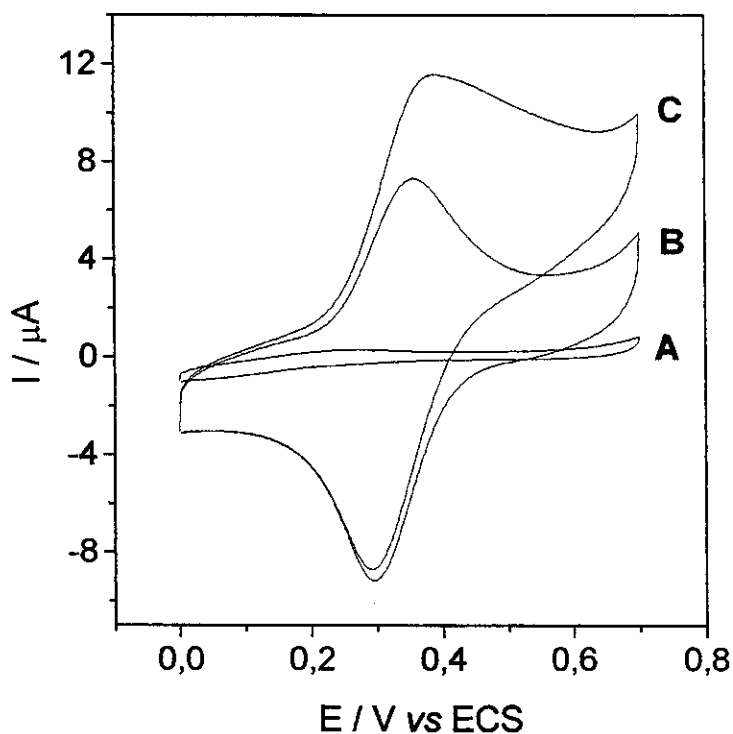


Figura 36. Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com (A) SiNb, (B) SiNb/FeCp₂COOH na ausência de NADH e (C) o mesmo que B na presença de NADH, em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,8 e $v=20 \text{ mVs}^{-1}$.

4.4.2.1. Estudos amperométricos

Estudos utilizando-se a técnica de cronoamperometria foram realizados com o intuito de se estudar quais as melhores condições para a oxidação da coenzima NADH sobre o eletrodo. Primeiramente, verificou-se a resposta do eletrodo, SiNb/FeCp₂COOH, para uma concentração fixa de NADH, no caso 1×10^{-3} mol L⁻¹, em diferentes potenciais aplicados (Figura 37). Observou-se que a oxidação da coenzima sobre o eletrodo inicia-se em 0,20 V vs ECS com uma pequena variação de corrente, que aumenta consideravelmente a partir de 0,30 V e estabiliza-se em 0,45 V vs ECS. Para estudos posteriores, fixou-se o potencial em 0,35 V vs ECS, potencial onde há uma variação significativa de corrente e a contribuição da oxidação direta da coenzima sobre o grafite é menor do que a potenciais mais altos.

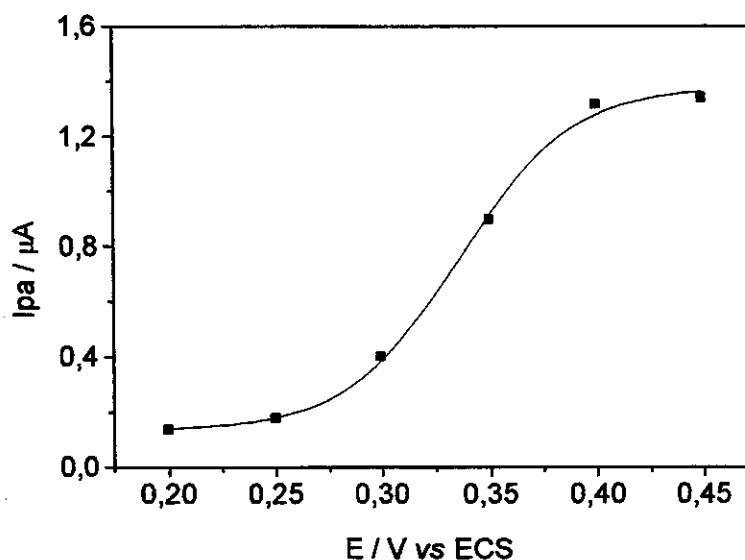


Figura 37. Resposta do eletrodo para 1×10^{-3} mol L⁻¹ NADH em diferentes potenciais aplicados, obtida pela técnica de cronoamperometria.

A resposta do eletrodo para NADH foi também investigada em diferentes valores de pH, como mostrado na Figura 38. Maiores valores de corrente foram observados entre pH 5 e 7, para uma mesma concentração de NADH. Em soluções com pH menores que 5 e maior que 7, um decréscimo da corrente foi observado. Este comportamento pode ser explicado baseado no fato que em meios muito ácidos ocorre uma maior desestabilização da coenzima reduzida (mais estável em meios alcalinos [141]) e em pH maior que 7, pode ocorrer a lixiviação do mediador pois a superfície da sílica fica carregada negativamente. Ambos os fatores acima citados podem levar a uma diminuição na corrente de oxidação da coenzima.

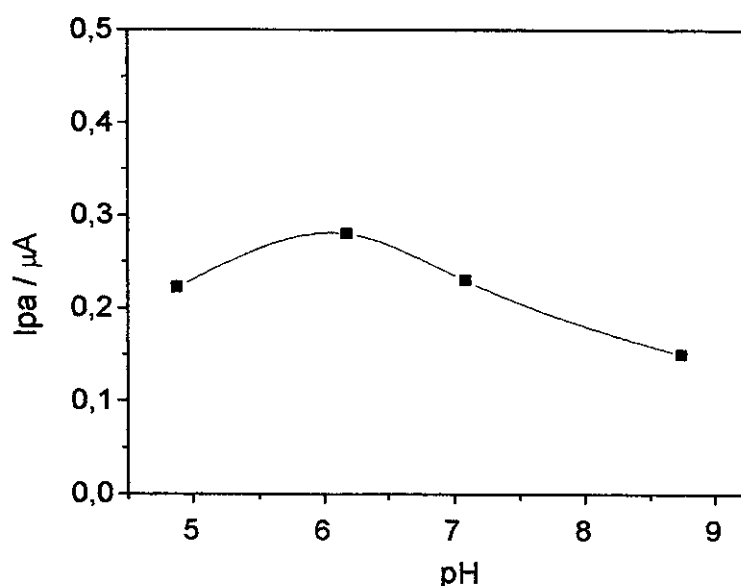


Figura 38. Resposta do eletrodo para $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NADH em função do pH.

Potencial aplicado $E_{(\text{aplicado})} = 0,35 \text{ V vs ECS}$.

Curvas de calibração foram obtidas fixando-se o potencial em 0,35 V vs ECS a pH 7, em diferentes soluções tampão (PIPES, TRIS e tampão fosfato) utilizando-se o mesmo eletrodo, mostradas na Figura 39. Uma faixa de resposta linear foi obtida entre $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ a $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em todos os tampões utilizados, entretanto um pequeno decréscimo na sensibilidade do eletrodo foi observado ao se utilizar o tampão TRIS. Nos demais tampões, PIPES e fosfato, as respostas apresentadas foram bastante similares. Em nenhum dos tampões utilizados foi observado variação no potencial médio, E_M , do mediador. As equações das retas obtidas para um mesmo eletrodo nos três tampões utilizados, TRIS, fosfato e PIPES foram respectivamente: $I/\mu A = 0,02 + 1,59[NADH]$ ($r=0,999$), $I/\mu A = 0,193 + 1,75[NADH]$ ($r=0,998$) e $I/\mu A = 0,196 + 1,75[NADH]$ ($r=0,999$).

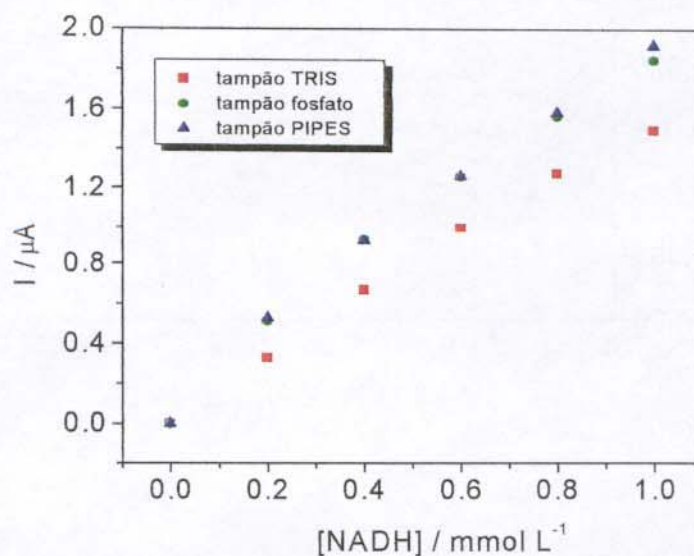


Figura 39. Curvas de calibração para NADH obtidas utilizando-se o eletrodo modificado SiNb/FeCp₂COOH, em diferentes soluções tampão (TRIS, PIPES e fosfato 0,1 molL⁻¹ e pH 7).

4.4.2.2 Estudos com eletrodo de disco rotatório- Estudo da cinética da reação entre o ferroceno imobilizado e o NADH

Um estudo mais detalhado da reação de oxidação eletrocatalítica da coenzima NADH sobre o eletrodo SiNb/FeCp₂COOH foi realizado, utilizando-se o eletrodo de disco rotatório. Na Figura 40 estão mostrados os gráficos de Koutecky-Levich ($1/i$ vs $1/\omega^{1/2}$), em diferentes concentrações de NADH.

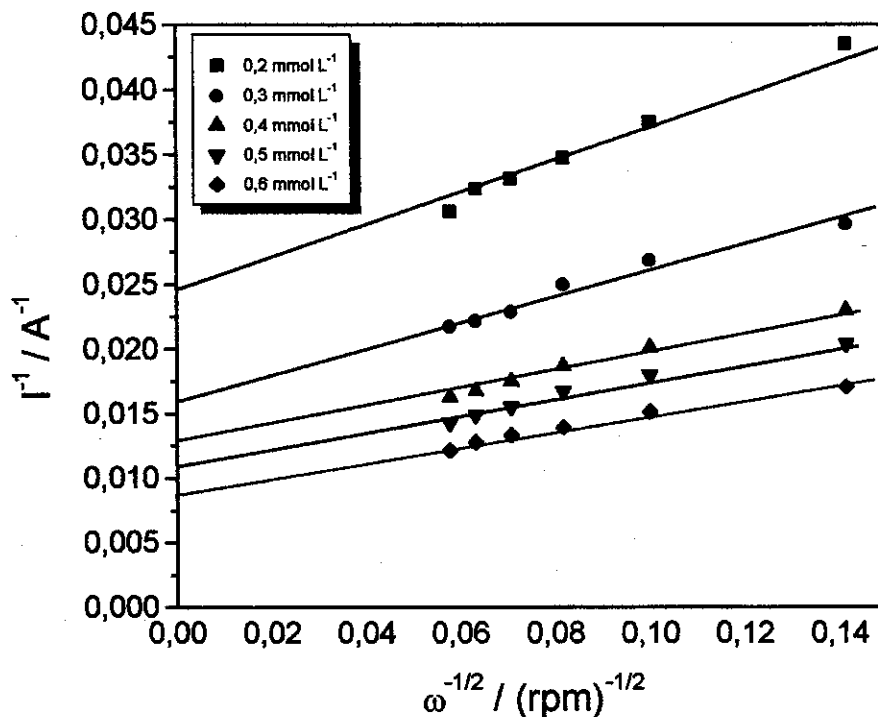
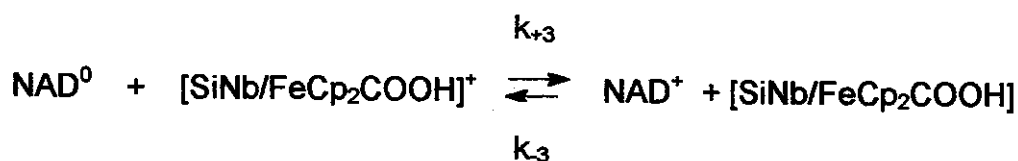
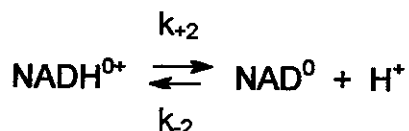
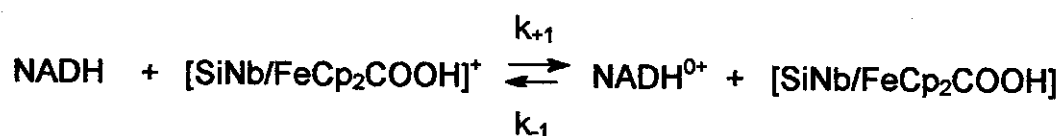
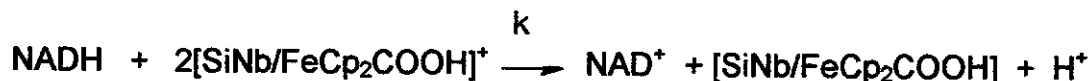


Figura 40. Gráficos de Koutecky-Levich ($1/i$ vs $1/\omega^{1/2}$) obtidos em diferentes concentrações de NADH.

Através da inclinação dos gráficos de Koutecky-Levich é possível calcular o número de elétrons que participam da reação. O número de elétrons calculado através dos dados experimentais obtidos foi de aproximadamente 0,75, o qual indica que apenas um elétron é inicialmente transferido do NADH para o ferroceno. Tais resultados são similares aos obtidos por Carlson [142,143] e Matsue [116] para uma série de derivados de ferroceno. Eles propuseram que a reação entre o NADH e o íon ferroceno ocorre em várias etapas, onde o íon ferroceno aceita primeiramente um elétron do NADH dando origem ao radical NADH^{0+} , o qual é desprotonado e, então, oxidado por um segundo íon ferroceno, de acordo com o mostrado através das equações abaixo:



Reação global:



Através do intercepto do gráfico de Koutecky-Levich, foram calculados os valores de k em diferentes concentrações de NADH. Estes apresentaram valores decrescentes

com o aumento da concentração de NADH. Devido à dependência da constante k com a concentração, esta se torna inadequada para comparação com outros sistemas catalíticos. Por esta razão, foi proposto o uso do valor da constante calculada extrapolando-se concentração a zero, $k_{\text{NADH} \rightarrow 0}$ [115, 144]. Construindo-se o gráfico de k^{-1} vs NADH, foi obtida uma reta, ajustada pela equação: $k = 1,81 \times 10^{-3} + 1,99 [\text{NADH}]$, $R = 0,999$. Extrapolando-se para $[\text{NADH}] = 0$, pode ser obtido $k_{\text{NADH} \rightarrow 0}$. O valor encontrado foi de $k_{\text{NADH} \rightarrow 0} = 512 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor é menor em relação aos obtidos utilizando-se como mediadores corantes do tipo fenoxazinas e fenotiazinas (eficientes mediadores da oxidação eletrocatalítica do NADH) em eletrodos de grafite e imobilizados em suportes inorgânicos [112, 145]. Entretanto, comparando-se com derivados similares de ferroceno com potencial médio, E_M , próximo ao do ferroceno monocarboxílico, o valor de $k_{\text{NADH} \rightarrow 0}$ obtido é bastante razoável [116].

5. CONCLUSÕES

A sílica modificada com o óxido de nióbio, SiNb, mostrou uma grande afinidade por compostos que apresentam grupos carboxílicos em sua estrutura, tais como a hematoporfirina IX, a protoporfirina IX, a tetracarboxifenilporfirina e o ácido ferroceno monocarboxílico. A imobilização destes compostos sobre a SiNb deve ocorrer provavelmente através da formação da ligação -COO-Nb , conferindo aos eletrodos de pasta de carbono preparados utilizando-se tais materiais uma considerável estabilidade.

As porfirinas imobilizadas sobre a SiNb foram facilmente metaladas com Co(II) , o que pode ser confirmado através dos espectros de UV-Vis, os quais apresentaram uma diminuição no número de bandas Q, de quatro para duas bandas, após a metalação.

Os eletrodos de pasta de carbono modificados com a hematoporfirina e a protoporfirina de cobalto imobilizadas apresentaram a capacidade de eletrocatalisar a redução de O_2 dissolvido em potenciais mais positivos (em torno de $-0,20 \text{ V vs ECS}$) em relação a outros eletrodos não modificados, em pH neutro, numa faixa de concentração de 2 a 12 mg L^{-1} .

Diferentemente do comportamento apresentado por porfirinas metálicas imobilizadas diretamente sobre eletrodos de grafite ou em solução, foi observado que os potenciais de redução do oxigênio nos eletrodos modificados com SiNb/CoPP e SiNb/CoHMP permaneceram praticamente constantes entre pH 2 e 7. Este fato pode ser atribuído ao caráter ácido da matriz SiNb, permitindo que o processo seja

praticamente independente do pH do meio. Tal propriedade dos respectivos eletrodos modificados é de grande importância pois permite trabalhar com estes em uma extensa faixa de pH sem que haja um deslocamento do potencial de redução do O_2 .

Estudos utilizando-se eletrodo de disco rotatório indicaram que a redução do O_2 em tais eletrodos ocorre segundo um mecanismo envolvendo quatro elétrons, no qual o oxigênio é reduzido diretamente à água.

A relação linear entre a corrente catódica e a concentração de oxigênio tornam os eletrodos modificados com SiNb/CoPP e SiNb/CoHMP potencialmente úteis como sensores para a determinação de oxigênio dissolvido em água.

A tetracarboxifenilporfirina de cobalto imobilizada sobre a SiNb (descrita como SiNb/CoTCPP), diferentemente das outras duas porfirinas, não eletrocatalisou com eficiência a redução de oxigênio. Esta, entretanto, apresentou a propriedade de eletrocatalisar a oxidação de hidrazina, a um potencial relativamente baixo, em 0,40 V vs ECS. Estudos utilizando-se a técnica de amperometria, indicaram que melhores respostas de corrente são obtidas em pH 7, havendo um decréscimo significativo desta com a diminuição do pH, provavelmente devido a pequena afinidade da molécula de hidrazina com o centro metálico da porfirina em meios mais ácidos.

Aplicando-se um potencial de 0,40 V vs ECS ao eletrodo modificado com SiNb/CoTCPP, em pH neutro, este apresentou um intervalo de resposta linear na faixa de concentração de hidrazina de 1×10^{-5} a 5×10^{-5} mol L⁻¹ e um curto tempo de resposta (~ 1,0 s).

O ácido ferroceno monocarboxílico foi também imobilizado sobre tal matriz, apresentando-se bastante estável. O eletrodo modificado com este material,

SiNb/FeCp₂COOH, foi utilizado como um sensor para a coenzima NADH. Estudos realizados utilizando-se eletrodo de disco rotatório indicaram que a reação entre o ferroceno imobilizado e o NADH ocorre com a formação de um intermediário radicalar, NADH⁰⁺, numa reação similar a observada na literatura para derivados de ferroceno imobilizados em eletrodos de grafite. No entanto, em virtude da formação do radical NADH⁰⁺, a estabilidade deste tipo de eletrodo para utilização prática como mediador para enzimas desidrogenases (que envolvem a coenzima NADH) é bastante baixa. Contudo, do ponto de vista fundamental é de grande interesse o estudo do mecanismo e cinética da reação entre o NADH e mediadores imobilizados em diferentes suportes sólidos.

6. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Como propostas para trabalhos futuros sugere-se:

- Utilização dos eletrodos modificados com SiNb/CoPP e SiNb/CoHMP como sensores para outros substratos tais como peróxido de hidrogênio e hidrazina.

- Devido a afinidade do óxido de nióbio por grupos carboxílicos, a SiNb oferece uma boa possibilidade como matriz para imobilização de enzimas (as quais apresentam estes grupos nos resíduos de aminoácidos terminais) e utilização na construção de biossensores. Estudos em andamento realizados pela pós-doutora Simone S. Rosatto têm demonstrado que a SiNb é eficiente na imobilização da peroxidase de raiz forte (HRP). Este estudo abre caminho para imobilização de outras enzimas, tais como a lacase e a tirosinase, para o desenvolvimento de sensores para fenóis e também peróxido de hidrogênio.

- Uma outra possibilidade seria imobilizar juntamente com o ferrocenomonocarboxílico a enzima glicose oxidase, para a construção de um novo sensor para glicose.

- O fosfato de nióbio sobre a sílica pode ser obtido através da reação da SiNb com H_3PO_4 , obtendo-se dessa forma um bom trocador catiônico. Com isso, há a

possibilidade de imobilização de espécies catiônicas, tais como corantes do tipo das fenoxazinas e fenotiazinas, além de porfirinas, possibilitando assim o desenvolvimento de uma série de novas configurações de eletrodos, os quais podem ser utilizados como sensores para substratos como O_2 , H_2O_2 , hidrazina, NADH, dentre outros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] O. H. Ellestad, U. Blindheim, *J. Mol. Catal.* **1985**, 33, 275.
- [2] M. Nishimura, K. Asakura, Y. Iwasawa, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 1660.
- [3] K. Asakura, Y. Iwasawa, *Chem. Lett.* **1986**, 859.
- [4] M. Nishimura, K. Asakura, Y. Iwasawa, *Chem. Lett.* **1986**, 1457.
- [5] G. C. Bond, S. Flamerz, S. Shukri, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1989**, 87, 65.
- [6] E. E. Getty, R. S. Drago, *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 1186.
- [7] N. Ichikuni, K. Asakura, Y. Iwasawa, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 112.
- [8] K. Asakura, Y. Iwasawa, *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 1711.
- [9] M. Shirai, K. Asakura, Y. Iwasawa, *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 9999.
- [10] L.T. Kubota, Y. Gushikem, S.C. Castro, J. C. Moreira, *Colloids Surf.* **1991**, 57, 11.
- [11] R. S. Drago, S. C. Petrosius, C. W. Chronister, *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 367.
- [12] Y. Inoue, H. Yamazaki, Y. Kimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, 116, 281.
- [13] T. Riis, I. M. Dahl, O. H. Ellestad, *J. Mol. Catal.* **1983**, 18, 203.
- [14] M. Baltes, O. Collart, P. Van der Voort, E. F. Vansant, *Langmuir* **1999**, 15, 5841.
- [15] O. Collart, P. Van der Voort, E. F. Vansant, E. Gustin, A. Bowen, D. Schoemaker, R. R. Rao, B. M. Weckhuysen, R. A. Schoonheydt, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, 1, 4099.
- [16] S. Damyanova, P. Grange, B. Delmon, *J. Catal.* **1997**, 168, 421.

- [17] X. Gao, J. L. G. Fierro, I. E. Wachs, *Langmuir* **1999**, 15, 3169.
- [18] J. R. Sohn, H. J. Jang, *J. Mol. Catal.* **1991**, 64, 349.
- [19] R. S. Drago, E. E. Getty, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 3311.
- [20] S. Naito, M. Tanimoto, *J. Catal.* **1995**, 154, 306.
- [21] L. T. Kubota, Y. Gushikem, J. C. Moreira, *Analyst* **1991**, 116, 281.
- [22] C. R. M. Peixoto, Y. Gushikem, N. Baccan, *Analyst* **1992**, 117, 1029.
- [23] S.S. Rosatto, L.T. Kubota, G. Oliveira Neto, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 390, 65.
- [24] S. Bachmann, L.F.C. Melo, R.B. Silva, T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, K. E. Collins, C. H. Collins, K. Albert, *Chem. Mat.* **2001**, 13, 1874.
- [25] R. B. Silva, K. E. Collins, C. H. Collins, *J. Chromatogr. A* **2000**, 869, 137.
- [26] L. T. Kubota, Y. Gushikem, J. Perez, A. A. Tanaka, *Langmuir* **1995**, 11, 1009.
- [27] C. R.M. Peixoto, L. T. Kubota, Y. Gushikem, *Anal. Proc.* **1995**, 32, 503,
- [28] B. G. Milagres, L. T. Kubota, G. de Oliveira Neto, *Electroanalysis* **1996**, 8, 489.
- [29] C. A. B. Garcia, G. Oliveira Neto, L. T. Kubota, L. A. Grandim, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 418, 147.
- [30] D. Brown, "In The Chemistry of Niobium and Tantalum", Comprehensive Inorganic Chemistry Series; J.C. Bailar et al, Eds. Pergamon Press, Oxford, vol.3, p.553.
- [31] K. Tanabe, S. Okazaki, *Appl. Catal. A* **1995**, 133, 191.
- [32] S. Okazaki, T. Okuyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, 56, 2159.
- [33] T. Iizuka, K. Ogazawara, K. Tanabe, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, 56, 2927.
- [34] J-M. Jehng, I. E. Wachs, *Catal. Today* **1993**, 16, 417.
- [35] I. Nowak, M. Ziolek, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 3603.

- [36] S. Denofre, Y. Gushikem and C. U. Davanzo, *Eur. J. Solid State Inorg. Chem.* **1991**, 28, 1295.
- [37] E. I. Ko, R. Bafrali, N. T. Nuhfer, N. J. Wagner, *J. Catal.* **1995**, 95, 260.
- [38] P.A. Burke, E. I. Ko, *J. Catal.* **1991**, 129, 38.
- [39] N. Ichikuni, Y. Iwasawa, *Catal. Today* **1993**, 16, 427.
- [40] T. Tanaka, H. Nojima, H. Yoshida, H. Nakagawa, T. Funabiki, S. Yoshida, *Catal. Today* **1993**, 16, 297.
- [41] H. Yoshida, T. Beutel, V. Siborov, B. Tesche, H. Knözinger, *J. Catal.* **1997**, 167, 379.
- [42] M. Shirai, N. Ichikuni, Y. Iwasawa, *Catal. Today* **1990**, 8, 57.
- [43] T. Ikeya, M. Senna, *J. Non-Cryst. Solid.* **1988**, 105, 243.
- [44] S. Denofre, Y. Gushikem, S. C. Castro, Y. Kawano, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1993**, 89, 1057.
- [45] P. R. Moses, P. Wier, R. W. Murray, *Anal. Chem.* **1975**, 47, 1882.
- [46] A. M. O. Brett, C. Brett, "*Eletroquímica - Princípios, Métodos e Aplicações*", Almedina, Coimbra, 1996.
- [47] A. J. Bard, *J. Chem. Educ.* **1983**, 60, 302.
- [48] S. A. Wring, J. P. Hart, *Analyst* **1992**, 117, 1215.
- [49] C. Kang, Y. Xie, F. C. Anson, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 413, 165.
- [50] F. Arifuku, K. Mori, T. Muratani, H. Kurihara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, 65, 1491.
- [51] C. Shi, F. C. Anson, *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 4298.
- [52] S. Zecevis, B. S. Glavaski, E. Yeager, *J. Electroanal. Chem.* **1985**, 196, 339.

- [53] B. Böttger, U. Schindewolf, J. L. Avila, R. R. Amaro, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 432, 139.
- [54] A. Ryabov, V. S. Kurova, V. N. Goral, M. D. Reshetova, J. Razumiene, R. Simkus, V. Laurinavicius, *Chem. Mat.* **1999**, 11, 600.
- [55] Y. Okawa, M. Nagano, S. Hirota, H. Kobayashi, T. Ohno, M. Watanabe, *Biosen. Bioelectron.* **1999**, 14, 229.
- [56] S. Koide, K. Yokoyama, *J. Electroanal. Chem.* **1999**, 468, 193.
- [57] L. R. Rover, J. C. B. Fernandes, G. de Oliveira Neto, L. T. Kubota, *J. Electroanal. Chem.* **2000**, 481, 34.
- [58] S. Cosnier, *Biosen. Bioelectron.* **1999**, 14, 443.
- [59] W. Oungpipat, P. W. Alexander, P. Southwell-Keely, *Anal. Chim. Acta* **1995**, 309, 35.
- [60] P. C. Pandey, S. Upadhyay, H. C. Pathak, C. M. D. Pandey, *Anal. Lett.* **1998**, 31, 2327.
- [61] A. Malinauskas, T. Ruzgas, L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.* **2000**, 484, 55.
- [62] M. K. Halbert, R. P. Baldwin, *Anal. Chem.* **1985**, 57, 591.
- [63] A. M. Tolbert, R. P. Baldwin, L. M. Santos, *Anal. Lett.* **1989**, 22, 683.
- [64] J. Kulys, L. Gorton, E. Dominguez, J. Emnéus, H. Jarskog, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, 372, 49.
- [65] L. Gorton, *Electroanalysis* **1995**, 7, 23.
- [66] K. Kalcher, *Electroanalysis* **1990**, 2, 419.
- [67] P. T. Kissinger, *Electroanalysis* **1992**, 4, 359.
- [68] A. Walcarius, *Electroanalysis* **1998**, 10, 1217.

- [69] G.A.P. Zaldivar, Y. Gushikem, L. T. Kubota, *J. Electroanal. Chem.* **1991**, 318, 247.
- [70] L.T. Kubota, Y. Gushikem, *Electrochim. Acta* **1992**, 37, 2477.
- [71] G.A.P. Zaldivar, Y. Gushikem, *J. Electroanal. Chem.* **1992**, 165, 337.
- [72] L.T. Kubota, Y. Gushikem, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, 362, 219.
- [73] L.T. Kubota, F. Gouvea, A.N. Andrade, B.G. Milagres, G. de Oliveira Neto, *Electrochim. Acta* **1996**, 41, 1465.
- [74] L.T. Kubota, B.G. Milagres, F. Gouvea, G. Oliveira Neto, *Anal. Lett.* **1996**, 29, 893.
- [75] Y. Gushikem, C. R. M. Peixoto, U.P. Rodrigues Filho, L.T. Kubota, E. Stadler, *J. Coll. Interface Sci.* **1996**, 184, 236.
- [76] R. F. Rocha, S. S. Rosatto, R. E. Bruns, L.T. Kubota, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 433, 73.
- [77] E. F. Perez, L. T. Kubota, A.A. Tanaka, G. de Oliveira Neto, *Electrochim. Acta* **1998**, 43 (1998) 1665.
- [78] E.I.S. Andreotti, Y. Gushikem, L.T. Kubota, *J. Braz. Chem. Soc.* **1992**, 3, 21.
- [79] E. F. Perez, G. de Oliveira Neto, A. A. Tanaka, L.T. Kubota, *Electroanalysis* **1998**, 10, 111.
- [80] D. A. Schiavo, E. F. Perez, L. T. Kubota, *Quím. Nova* **2000**, 23, 832.
- [81] E. F. Perez, G. D. Neto, L. T. Kubota, *Sensors and Actuators B- Chemical* **2001**, 72, 80.
- [82] L.R. D. Silva, Y. Gushikem, L.T. Kubota, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **1996**, 6, 309.
- [83] R. N. Gupta, B. Ken, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1975**, 37, 1548.

- [84] J. E. Falk, *"Porphyrins and Metalloporphyrins"*, Elsevier, New York, 1975.
- [85] A. D. Adler, F. R. Longo, F. Kampas, J. Kim, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1970**, 32, 2443.
- [86] F. D'Souza, R. G. Deviprasad, Y. Hsieh, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 411, 167.
- [87] X. Wu, Y. Li, B. Gründig, N-T. Yu, R. Renneberg, *Electroanalysis* **1997**, 9, 1288.
- [88] S. Dong, B. Liu, J. Liu, A. Tobard, R. Guillard, *Electroanalysis* **1995**, 7, 537.
- [89] K. Araki, L. Angnes, C. M. N. Azevêdo, H. E. Toma, *J. Electroanal. Chem.* **1995**, 397, 205.
- [90] F. Bediou, S. Trevin, V. Albin, M. Villegas, J. Dewynek, *Anal. Chim. Acta* **1997**, 341, 177.
- [91] A. V. Kashevskii, A. Y. Safronov, O. Ikeda, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 510, 86.
- [92] S. Nakagaki, C. R. Xavier, A. J. Wosniak, A. S. Mangich, F. Wypych, M. P. Cantão, I. Denicoló, L. T. Kubota, *Colloids and Surf. A* **2000**, 168, 261.
- [93] S. V. Guerra, C. R. Xavier, S. Nakagaki, L. T. Kubota, *Electroanalysis* **1998**, 10, 462.
- [94] C-L. Ni, F.C. Anson, *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 4754.
- [95] R. R. Durand, F. C. Anson, *J. Electroanal. Chem.* **1982**, 134, 273.
- [96] B. Steiger, F. C. Anson, *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 5767.
- [97] C. Shi, B. Steiger, M. Yuasa, F. C. Anson, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 4294.
- [98] C. Shi, F. C. Anson, *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 1037.
- [99] E. Song, C. Shi, F. C. Anson, *Langmuir* **1998**, 14, 4315.

- [100] L.R. Milgrom, *"The Colours of Life"*, Oxford University Press, New York, 1997, p.85.
- [101] R. Antiochia, I. Lavagnini, F. Magno, *Electroanalysis* **1999**, 11, 129.
- [102] A. Badia, R. Carlini, A. Fernandez, F. Battaglini, S.R. Mikkelsen, A. M. English, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7053.
- [103] S. Koide, K. Yokoyama, *J. Electroanal. Chem.* **1999**, 468, 193.
- [104] S. L. Chut, J. Li, S. N. Tan, *Analyst* **1997**, 122, 1431.
- [105] Y. Okawa, M. Nagano, S. Hirota, H. Kobayashi, T. Ohno, M. Watanabe, *Biosens. Bioelectron.* **1999**, 14, 229.
- [106] A. Ryabov, V. S. Kurova, V. N. Goral, M. D. Reshetova, J. Razumiene, R. Simkus, V. Laurinavicius, *Chem. Mat.* **1999**, 11, 600.
- [107] S. J. Sadegui, G. Gilardi, A. E. G. Cass, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, 12, 1191.
- [108] A. Heller, *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 3579.
- [109] J. Moiroux, P. J. Elving, *Anal. Chem.* **1978**, 50, 1056.
- [110] H. Jaegfeldt, *J. Electroanal. Chem.* **1980**, 110, 295.
- [111] A. Tortensson, L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.* **1981**, 130, 199.
- [112] L. Gorton, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1986**, 82, 1245.
- [113] I. Katakis, E. Dominguez, *Mikrochim. Acta* **1997**, 126, 11.
- [114] Q-J. Chi, S-J. Dong, *J. Mol. Catal. A: Chemical* **1996**, 105, 193.
- [115] I. C. Popescu, E. Dominguez, A. Narvaez, V. Pavlov, I. Katakis, *J. Electroanal. Chem.* **1999**, 464, 208.
- [116] T. Matsue, M. Suda, I. Uchida, T. Kato, U. Akiba, T. Osa, *J. Electroanal. Chem.* **1987**, 234, 163.

- [117] M. Tian, S. Dong, *Electroanalysis* **1995**, 11, 1063.
- [118] R. W. Murray, A. J. Bard (Ed.), *"Electroanalytical Chemistry"*, vol. 13, New York, p. 191.
- [119] P. T. Kissinger, W. R. Heineman, *J. Chem. Educ.* **1983**, 60, 702.
- [120] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *"Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications"*, John Wiley & Sons, New York, 1980.].
- [121] P. H. Rieger, *"Electrochemistry"*, Chapman & Hall Inc., New York, 1994, p. 208.
- [122] J. A. Plambeck, *"Electroanalytical Chemistry: Basic Principles and Applications"*, John Wiley & Sons, New York, 1982.
- [123] R. K. Iler, *"The Chemistry of Silica"*, Wiley & Sons, New York, 1979.
- [124] C. E. Kibbey, M. E. Meyerhoff, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2189.
- [125] A. P. Filipov, G. A. Karpenko, *Theor. Exp. Chem.* **1978**, 14, 333.
- [126] E. A. Campos, Y. Gushikem, *J. Braz. Chem. Soc.* **1998**, 9, 273.
- [127] R. Jiang, S. Dong, *J. Electroanal. Chem.* **1990**, 291, 11.
- [128] M. Yuasa, T. Nagaiwa, M. Kato, I. Sekine, S. Hayashi, *J. Electrochem. Soc.* **1995**, 142, 2612.
- [129] R. J. H. Chan, Y. O. Su, T. Kuwana, *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 3777.
- [130] S. M. Golabi, J. B. Raoof, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 416, 75.
- [131] E. S. Ribeiro, Y. Gushikem, *Electrochim. Acta* **1999**, 44, 3589.
- [132] A. M. Castellani, *J. Colloid Interf. Sci.* **2000**, 230, 195.
- [133] F. C. Anson, C. Shi, B. Steiger, *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 437.
- [134] B. Steiger, C. Shi, F. C. Anson, *Inorg. Chem.* **1993**, 32, 2107.
- [135] C. Shi, F. C. Anson, *Inorg. Chem.* **1992**, 31, 5078.

- [136] J. Litong, J. Ping, Y. Jiannon, F. Yuzhi, *Talanta* **1992**, 39, 145.
- [137] J-M. Zen, C-B. Wang, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, 368, 251.
- [138] J. H. Zagal, S. Lira, S. Ureta Zañartu, *J. Electroanal. Chem.*, 210 (1986) 95.
- [139] M. D. Garcia, M. L. Marcos, J. G. Velasco, *Electroanalysis* **1996**, 8, 267.
- [140] E. S. Gil, L. T. Kubota, *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, 11, 304.
- [141] L. Rover, J. C. B. Fernandes, G. de Oliveira Neto, L. T. Kubota, E. Katekawa, S. H. P. Serrano, *Anal. Biochem.* **1995**, 260, 50.
- [142] B. W. Carlson, L. L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 7453.
- [143] B. W. Carlson, L. L. Miller, P. Neta, J. Grodkowsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 7233.
- [144] L. Gorton, A. Torstensson, H. Jaegfeldt, G. Johansson, *J. Electroanal. Chem.* **1984**, 161, 103.
- [145] F. D. Munteanu, L. T. Kubota, L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 509, 2.