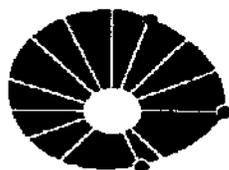


**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**



UNICAMP



1150054487



IQ

T/UNICAMP Sa59d

TESE DE DOUTORADO

***DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR
AMPEROMÉTRICO PARA ÁLCOOL, EMPREGANDO
MEDIADORES DE ELÉTRONS IMOBILIZADOS
SOBRE $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$***

Antonio de Santana Santos

Orientador: Prof. Dr. Lauro T. Kubota

Campinas, fevereiro de 2003

UNIDADE	<u>IQ</u>
Nº CHAMADA	<u>Tunicamp</u> <u>Sa 59d</u>
V	EX
TOMBO BCI	<u>64487</u>
PROC.	<u>124/03</u>
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	<u>R\$ 11,00</u>
DATA	<u>29/06/03</u>
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

SIB ID 295339

Sa59d

Santos, Antonio de Santana
Desenvolvimento de um biossensor
amperométrico para álcool, empregando
mediadores de elétrons imobilizados sobre
SiO₂/Nb₂O₅ / Antonio de Santana Santos. --
Campinas, SP: [s.n], 2003.

Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.

Tese (doutorado) – Universidade
Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Eletrodos modificados. 2. Biossensores.
3. Mediadores de elétrons e enzimas. I. Kubota,
Lauro Tatsuo. II. Universidade Estadual de
Campinas. III. Título.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a toda minha família,
especialmente aos meus pais Arlindo e Maria
pelo amor, carinho e compreensão que
sempre tiveram por mim.*

AGRADECIMENTOS

- *Ao Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota, pela orientação, apoio, competência e todo incentivo na realização deste trabalho.*
- *A Isis Luana, pelo carinho, amor e dedicação que alcançamos.*
- *Aos meus irmãos: José, Conceição, Madalena, Ana, Paulo e João por sempre me oferecerem apoio, carinho e compreensão.*
- *Aos meus grandes amigos: André, Antenor, Arnaldo César, Bruno, José Daniel, José Ricardo, Protásio, Renato, Renato Rosseto e Zé Célso pelos bons dias de alegria e diversão.*
- *Aos meus colegas de laboratório: Alaécio, Altair, Arnaldo, Bárbara, Eric, Karin, Larissa, Lucilene, Miyuki, Paulo, Percy, Pilar, Renata, Renato, Rosângela, Simone e Tânia.*
- *Ao Instituto de Química da Unicamp por possibilitar a realização deste trabalho.*
- *A todos da biblioteca do IQ por estarem sempre disponíveis.*
- *Ao pessoal da CPG pela eficiência em suas funções.*
- *A FAPESP pela bolsa e auxílios concedidos.*
- *Ao nosso bom Pai, que sempre nos protege e abriga nas horas mais difíceis.*

RESUMO

Título: “Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para álcool, empregando mediadores de elétrons imobilizados sobre $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$ ”.

Autor: Antonio de Santana Santos

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Palavras-chave: Eletrodos modificados, biossensores amperométricos, mediadores de elétrons e enzimas

Neste trabalho foi empregada a sílica gel modificada com óxido de nióbio, contendo 1,4 mmol Nb/g de material. Esta matriz foi utilizada como suporte para imobilização dos corantes orgânicos: Azul de Meldola, Azul do Nilo e Azul de Toluidina, adsorvendo, respectivamente, 55, 48 e 59 $\mu\text{mol/g}$ de material. Posteriormente, estas matrizes foram empregadas na elaboração de eletrodos a base de pasta de carbono. Com estes eletrodos foram realizados estudos das propriedades eletroquímicas e da capacidade de eletrocatalisar a oxidação do NADH. Nestes estudos observou-se que o potencial formal dos mediadores adsorvidos na matriz de sílica-nióbio não variaram numa faixa de pH entre 5 a 8. Todos os eletrodos mostraram-se como excelentes dispositivos para a detecção de NADH com alta sensibilidade e estabilidade, sendo possível realizar mais de 300 determinações de NADH com desvio padrão relativo inferior a 3 %. Destaca-se o sensor contendo o mediador Azul de Meldola que apresentou faixa de resposta linear de $1,0 \cdot 10^{-5}$ a $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para NADH e sensibilidade de $48 \text{ mA L}^{-1} \text{ mol}$, a um potencial aplicado de 0,0 mV vs ECS. Também foi estudada a cinética de transferência de elétrons entre o mediador adsorvido e o NADH, empregando-se eletrodo de disco rotatório. Estes estudos indicaram que a reação de oxidação de NADH deve acontecer através da formação de um complexo de transferência de carga entre o mediador e o NADH. O aumento na velocidade de reação, k_{obs} , com o aumento do pH da solução foi atribuído ao aumento na diferença de potencial redox entre o NADH e o mediador. Uma vez realizados estes estudos, partiu-se para o desenvolvimento de um biossensor para álcool, utilizando-se a enzima álcool desidrogenase. Com o biossensor resultante, foi determinada a concentração de etanol em diferentes bebidas, tais como: cerveja, uísque, vinho, tequila e destilados. Os resultados foram todos concordantes com o teor de álcool acusados nos rótulos destas bebidas. Também foram realizados os teste de recuperação com todas as bebidas avaliadas e os valores ficaram próximos de 100 % com desvio inferior a 3 %, demonstrando que não há interferência significativa da matriz na resposta do biossensor. Este biossensor apresentou elevada estabilidade, podendo ser utilizado por mais de 80 dias sem mudança significativa na resposta.

ABSTRACT

Title: "Development of an amperometric biosensor for ethanol employing electron mediators immobilized on SiO₂/Nb₂O₅"

Author: Antonio de Santana Santos

Adviser: Lauro Tatsuo Kubota

Keywords: Modified electrode, amperometric biosensor, electron mediators and enzyme

In this work the silica gel modified with niobium oxide, containing 1,4 mmol Nb/g of material was employed. This matrix was used as support for immobilization of organic dyes: Meldola Blue, Nile Blue and Toluidine Blue, adsorbing 55, 48 and 59 $\mu\text{mol/g}$ of material respectively. These matrices were employed on the preparation of modified carbon paste electrode. With these electrodes electrochemical investigation of their behavior were carried out as well as the electrocatalytical oxidation of NADH. The formal potential of the dyes in these electrodes were independent of the solution pH between 5 and 8. The electrodes proceeded as excellent sensors for NADH determination with high sensitivity and stability, allowing more than 300 determinations with relative standard deviation lower than 3 %. The sensor containing Meldola Blue was highlighted, showing a linear response NADH concentration range between 1.0×10^{-5} and 7.5×10^{-4} mol L⁻¹, with a sensitivity of 48 mA L⁻¹ mol at an applied potential of 0.0 mV *versus* SCE. The kinetic of the electron transfer between NADH and the electron mediators employing rotation disk electrode were also investigated. The formation of an intermediate charge transfer (CT) complex between NADH and mediator was proposed. The rate constant of the reaction, k_{obs} , increased with the solution pH, and it was assigned to the thermodynamic driving force between NADH and electron mediator. After these studies, an amperometric biosensor for ethanol was developed, employing the alcohol dehydrogenase enzyme. The ethanol was determined in different alcoholic beverages like beer, whisky, wine and spirits employing the developed biosensor. The results were in agreement with the nominal values. Recovery of about 100 % were obtained with different beverages, indicating that the matrices have no effect on the biosensor response. The biosensor showed an excellent operational stability, allowing measurements for over than 80 days, with no significant change.

2. **“Perfil sócio-econômico das famílias dos alunos de licenciatura em química ingressantes na UNICAMP em 1993”**. XVII Encontro de Debates Sobre o Ensino de Química (EDEC). Realizado no período de 23 a 25 de outubro de 1997. Local: Ijuí-RS.
3. **“Estudos da separação de alguns amino ácidos, utilizando-se sílica gel modificada com grupos aminobenzenossulfônico e fosfato”**. IX Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA). Realizado no período de 31 de agosto a 3 de setembro de 1997. Local: São Carlos-SP.
4. **“Eletrooxidação catalítica de NADH, utilizando eletrodos a base de sílica gel modificada”**. XIV Congresso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica. Realizado no período de 7 a 13 de maio de 2000, na cidade de Oaxaca, México.
5. **“Investigação do mecanismo de eletrooxidação catalítica de NADH, utilizando eletrodos a base de sílica gel modificada”**. 23^a reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, SBQ. Realizada no período de 23 a 26 de maio de 2000, na cidade de Poços de Caldas, MG.
6. Participação no seminário ministrado por Joachim Weiss. **“Novas aplicações da cromatografia iônica para a análise de bio-moléculas”**. Realizado em São Paulo em 6 de outubro de 2000.
7. **“Estudos cinéticos da eletrooxidação do NADH pelo azul de metileno imobilizado em sílica-Nb em diferentes valores de pH”**. XII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. Realizado no período de 22 a 26 de abril de 2001, na cidade de Gramado, RS.
8. **“Estudos do comportamento eletroquímico do verde de metileno adsorvido em sílica gel modificada”**. XII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. Realizado no período de 22 a 26 de abril de 2001, na cidade de Gramado, RS.
9. **“Estudo do comportamento eletroquímico e catalítico do azul de toluidina adsorvido em sílica-Nb”**. 11^a Encontro Nacional de Química Analítica. Realizado no período de 18 a 21 de setembro de 2001, na cidade de Campinas, SP.

10. Trabalho apresentado pelo co-autor Arnaldo: **“Biossensor para álcool altamente estável a base de sílica gel modificada com óxido de nióbio”**. XV Congresso da sociedade Ibero-Americana de Eletroquímica, realizado no período de 8 a 13 de Setembro de 2002, na cidade de Évora, Portugal.

3. TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS OU SUBMETIDOS

3.1. Publicados:

1. Kubota, L.T., Gambero, A., Santos, A.S., Granjeiro, J.M.; **“Study of the adsorption of some amino acids by silica chemically modified with aminobenzenesulfonic and phosphate groups”** *J. Colloid Interface Sci.*, **183** (1996) 453-457.
2. Santos, A.S., Gorton, L., Kubota, L.T.; **“Electrocatalytic NADH oxidation using an electrode based on mieldola blue immobilized on silica coated with niobium oxide”** *Electroanalysis*, **14** (2002) 805-812.
3. Santos, A.S., Gorton, L., Kubota, L.T.; **“Nile blue adsorbed onto silica gel modified with oxide for electrocatalytic oxidation of NADH”** *Electrochim. Acta*, **47** (2002) 3351-3360.
4. Santos, A.S., Pereira, A.C., Kubota, L.T.; **“Electrochemical and electrocatalytic studies of tuluidine blue immobilized on a silica gel surface coated with niobium oxide”**, *J. Braz. Chem. Soc.*, **13** (2002) 495-501.
5. Pereira, A.C., Santos, A.S., Kubota, L.T.; **“Tendências em modificações de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas”** *Quim. Nova*, **25** (2002) 1012-1021.
6. De Lucca, A.R., Santos, A.S., Pereira, A.C., Kubota, L.T.; **“Electrochemical behavior and electrocatalytic study of the methylene green coated on modified silica gel”** *J. Colloid Interface Sci.*, **254** (2002) 113-119.

3.2. Aceito para publicação

1. Santos, A.S., Freire, R.S. e Kubota, L.; **“Highly stable amperometric biosensor for ethanol based on meldonium blue adsorbed on silica gel modified with niobium oxide”** *J. Electroanal. Chem.*, Aceito para publicação.

4. PATENTES

1. Kubota, L.T., Santos, A.S. e Freire, R.S.; **“Sensor amperométrico para NADH a base de corantes orgânicos adsorvidos em sílica gel modificada com óxidos metálicos”**. PI: 0204378-5, 2002.
2. Kubota, L.T., Santos, A.S. e Freire, R.S.; **“Novo biossensor amperométrico altamente eficiente para determinação de álcoois”**. PI: 0205463-9, 2002.

Antonio de Santana Santos

ÍNDICE GERAL

	Páginas
ÍNDICE DE FIGURAS	xix
ÍNDICE DE TABELAS	xxiii
GLOSSÁRIO	xxv
I. INTRODUÇÃO	3
I.1. Sensores	6
I.2. Sensores Eletroquímicos	7
I.3. Emprego dos EQM's em Eletroanálises	8
I.3.1. Pré-concentração do Analito	8
I.3.2. Minimização de Interferentes	9
I.3.3. Amplificação de Resposta	10
1.3.3.1. Eletrocatalise da oxidação do NADH	11
I.3.4. Principais Métodos de Modificação dos EQM's	14
I.3.4.1. Imobilização por Adsorção	15
I.3.4.2. Imobilização por Ligação Covalente	15
I.3.4.3. Recobrimento com Filmes Poliméricos	16
I.3.4.4. Imobilização por Oclusão	17
I.3.4.5. Formação de Compósitos	18
I.3.5. Biossensores Eletroquímicos	21
I.3.5.1. As Enzimas NAD(P)H Dependentes	24
I.3.5.2. Mecanismo da Eletrooxidação Catalisada do NADH	27
I.3.6. Biossensor para Etanol	29
II. OBJETIVOS	33
III. PARTE EXPERIMENTAL	37
III.1. Reagentes Utilizados	37
III.2. Modificação da Superfície da Sílica Gel com Óxido de Nióbio	37
III.3. Adsorção do Mediador na Sílica Modificada	38
III.4. Caracterização do Material	38
III.5. Construção do Eletrodo de Trabalho	38
III.6. Medidas Eletroquímicas	39
III.6.1. Medidas Usando Eletrodo de Trabalho Estático	39

III.6.2. Medidas Eletroquímicas Utilizando EDR	40
III.7. Desenvolvimento e Otimização de um Biossensor para Álcool	41
III.7.1. Determinação da Atividade da Enzima ADH	41
III.7.2. Imobilização da Enzima e Construção do Biossensor	42
III.7.3. Avaliação e Otimização do Biossensor para Álcool	42
III.7.4. Determinação do Tempo de Vida do Biossensor	44
III.7.5. Aplicação do Biossensor em Amostras de Bebidas e Testes de Recuperação	44
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
IV.1. Caracterização do Material	49
IV.2. Estudo das Propriedades Eletroquímicas dos Sensores Desenvolvidos	49
IV.3. Estudo da Eletrooxidação do NADH	60
IV.4. Estudo Cinético da Eletrooxidação Catalítica do NADH	67
IV.5. Desenvolvimento de um Biossensor para Álcool	77
IV.5.1. Importância da Matriz de Sílica gel Modificada	77
IV.5.2. Mecanismo de Atuação do Biossensor Desenvolvido	78
IV.5.3. Determinação da Atividade da Enzima ADH	79
IV.5.4. Avaliação e Otimização do Biossensor	83
IV.5.4.1. <i>Importância do Mediador na Resposta do Biossensor</i>	84
IV.5.4.2. <i>Estudo da Influência dos Aditivos na Resposta do Biossensor</i>	85
IV.5.4.3. <i>Influência da Concentração do Aditivo</i>	87
IV.5.4.4. <i>Comportamento da Enzima no Biossensor Proposto</i>	87
IV.5.4.5. <i>Influência do Cofator NAD⁺ no Desempenho do Biossensor</i>	88
IV.5.4.6. <i>Influência da Solução Tampão na Performance do Biossensor</i>	90
IV.5.4.7. <i>Influência do pH na Resposta do Biossensor</i>	92
IV.5.4.8. <i>Efeito do Potencial Aplicado na Resposta do Biossensor</i>	93
IV.5.4.9. <i>Tempo de Resposta do Biossensor</i>	94
IV.5.4.10. <i>Curva Analítica para Etanol, Usando o Biossensor</i>	95
IV.5.4.11. <i>Estabilidade e Tempo de Vida do Biossensor</i>	96
IV.5.4.12. <i>Considerações Finais da Otimização do Biossensor</i>	98
IV.5.5. Aplicação do Biossensor em Análises de Bebidas Alcoólicas	99
IV.5.5.1. <i>Testes de Recuperação</i>	100
V. CONCLUSÕES GERAIS	105
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
I. INTRODUÇÃO	
Figura I.1. (A) <i>Formula estrutural da fenoxazina (X=O), fenotiazina (X=S) e fenazina (X=N), sendo (AN) Azul do Nilo, (AM) Azul de Meldola e (AT) Azul de Toluidina.</i>	13
Figura I.2. <i>Desenho esquemático dos componentes de um biossensor</i>	21
Figura I.3. <i>Estrutura molecular da coenzima NAD, em suas formas oxidada e reduzida.</i>	25
III. PARTE EXPERIMENTAL	
Figura III.1. <i>Eletrodo de trabalho construído no laboratório</i>	39
Figura III.2. <i>Representação da célula eletroquímica utilizada nos experimentos, sendo (R) o eletrodo de referência, (T) o eletrodo de trabalho e (C) o eletrodo auxiliar.</i>	40
Figura III.3. <i>Representação do eletrodo de trabalho empregado nos experimentos para a determinação dos parâmetros cinéticos da eletrocatalise do NADH.</i>	41
Figura III.4. <i>Gráfico de um cronoamperograma ilustrando como se calcula a resposta do biossensor</i>	44
IV. RESULTADOS E DICUSSÃO	
Figura IV.1. <i>Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC/SN (A) e EPC/SNAM (B), usando solução de KCl 0,5 mol L⁻¹, pH 7,0 e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹.</i>	51
Figura IV.2. <i>Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC/SN (A) e EPC/SNAN (B), usando solução de KCl 0,5 mol L⁻¹, pH 7,0 e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹.</i>	52
Figura IV.3. <i>Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC/SN (A) e EPS/SNAT (B), usando solução de KCl 0,5 mol L⁻¹, pH 7,0 e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹.</i>	52
Figura IV.4. <i>Cobertura eletroquímica obtida com os sensores EPC/SNAM, EPC/SNAN e EPC/SNAT, preparados a partir de SN contendo o mediador adsorvido em solução de diferentes concentrações. O experimento realizado em KCl 0,5 mol L⁻¹, pH 7,0 e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹</i>	54
Figura IV.5. <i>Dependência da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura obtida para os diferentes sensores. Experimento em solução de KCl 0,5 mol L⁻¹ pH 7,0.</i>	58
Figura IV.6. <i>Voltamogramas cíclicos obtidos com o EPC/SNAM na ausência (A) e na presença (B) de NADH 5,0 10⁻⁴ mol L⁻¹ pH 7,0 a velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹.</i>	61

- Figura IV.7.** Voltamogramas cíclicos obtidos com o EPC/SNAN na ausência (a) e na presença (b) de NADH $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 a velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . 62
- Figura IV.8.** Voltamogramas cíclicos obtidos com o EPC/SNAT na ausência (a) e na presença (b) de NADH $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 a velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . 62
- Figura IV.9.** Dependência da corrente electrocatalítica do NADH em função do potencial aplicado, obtida para os sensores EPC/SNAM (A), EPC/SNAN (B) e EPC/SNAT (C). Cada ponto no gráfico contém uma concentração de $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de NADH em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. 63
- Figura IV.10.** Curva analítica obtida com o sensor EPC/SNAM, com potencial aplicado de 0 mV vs ECS em solução tampão fosfato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 65
- Figura IV.11.** Curva analítica obtida com o sensor EPC/SNAN, com potencial aplicado de -200 mV vs ECS em solução tampão fosfato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 66
- Figura IV.12.** Curva analítica obtida com o sensor EPC/SNAT, com potencial aplicado de 50 mV vs ECS em solução tampão fosfato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 66
- Figura IV.13.** Voltamogramas de varredura linear obtidos para o sensor EPC/SNAM, empregando EDR, na ausência (A) e na presença (B) de $[\text{NADH}] 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 variando a velocidade de rotação de 20 a 300 rpm. 69
- Figura IV.14.** Variação da intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade de rotação. Experimento realizado em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. 70
- Figura IV.15.** Gráfico de Koutechy-Levich para o eletrodo de pasta de carbono modificado com EPC/SNAM, empregando EDR em diferentes concentrações de $[\text{NADH}]^*$. Experimento realizado em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 71
- Figura IV.16.** Gráfico de Koutechy-Levich para o eletrodo de pasta de carbono modificado com EPC/SNAN, empregando EDR em diferentes concentrações de $[\text{NADH}]^*$. Experimento realizado em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 71
- Figura IV.17.** Variação da constante k_{obs} pela $[\text{NADH}]^*$ para os sensores EPC/SNAM (A) e EPC/SNAN (B). 72
- Figura IV.18.** Variação de $1/k_{\text{obs}}$ em função da concentração de $[\text{NADH}]^*$, empregando o sensor EPC/SNAM em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. 74

- Figura IV.19.** *Varição de $1/k_{obs}$ em função da concentração de $[NADH]^+$, empregando o sensor EPC/SNAN em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0* 74
- Figura IV.20.** *Seqüência de reações para um biossensor amperométrico usando a enzima álcool desidrogenase. Neste esquema, a oxidação do NADH é facilitada pelo mediador adsorvido na matriz de SN.* 79
- Figura IV.21.** *Espectros de absorção do NAD^+ e do NADH na região do ultravioleta (UV).* 80
- Figura IV.22.** *Curvas cinéticas obtidas em função da concentração de álcool. Experimento realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8 e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.* 81
- Figura IV.23.** *Curva analítica usada para verificar a atividade da enzima ADH. Experimento em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8 e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.* 81
- Figura IV.24.** *Curva da velocidade inicial da enzima álcool desidrogenase. Experimento realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8 e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.* 82
- Figura IV.25.** *Gráfico do duplo recíproco ou de Lineweaver-Burk para a enzima álcool desidrogenase.* 83
- Figura IV.26.** *Efeito da composição da pasta na resposta do biossensor para etanol. Eletrodo de pasta de carbono modificado com ADH/NAD⁺ (A), ADH/NAD⁺/SN (B) e ADH/NAD⁺/SNAM (C). Experimento realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,8 e potencial aplicado de $0,0 \text{ mV}$ vs ECS.* 85
- Figura IV.27.** *Curvas analíticas para etanol obtidas com o biossensor usando a enzima ADH imobilizada por adsorção física (A) e imobilização por ligação cruzada com glutaraldeído/BSA (B). Experimento realizado em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,8* 86
- Figura IV.28.** *Resposta do biossensor em função da porcentagem em massa de BSA incorporado dentro da pasta de carbono. Experimento realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,8 e potencial aplicado de 0 mV e $5 \text{ } \mu\text{L}$ de solução 5 % de glutaraldeído com [etanol] de $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.* 87
- Figura IV.29.** *Efeito da quantidade de ADH na resposta do biossensor para etanol. Experimento realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,8 e potencial aplicado de 0 mV vs ECS.* 88
- Figura IV.30.** *Curvas analíticas obtidas empregando o NAD^+ incorporado na pasta (A) e livre em solução (B). Experimento realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,8 e potencial aplicado de $0,0 \text{ mV}$ vs ECS* 89

- Figura IV.31.** *Sensibilidade do biossensor em função da porcentagem em massa de NAD^+ incorporada na pasta de carbono. Experimento realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,8 e potencial aplicado de 0 mV vs ECS* 90
- Figura IV.32.** *Influência do potencial aplicado sobre a resposta do biossensor para álcool. Experimento realizado em solução tampão fosfato, pH 7,8, com $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de etanol.* 94
- Figura IV.33.** *Tempo de resposta obtido com o biossensor para etanol com potencial aplicado de $0,0 \text{ mV vs ECS}$, em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,8.* 95
- Figura IV.34.** *Curva de calibração obtida com o biossensor para álcool etílico com adições sucessivas de $0,55 \text{ mmol L}^{-1}$. O experimento foi realizado aplicando um potencial de $0,0 \text{ mV vs ECS}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,8* 96
- Figura IV.35.** *Estabilidade operacional do biossensor. Concentração de etanol de $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, potencial aplicado de $0,0 \text{ mV vs ECS}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,8.* 97
- Figura IV.36.** *Curva referente ao tempo de vida do biossensor estocado em geladeira a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, (A) em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,8 e (B) estocado a seco. Experimento realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,8, potencial aplicado de 0 mV vs SCE e concentração alcoólica de $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.* 98

ÍNDICE DE TABELAS

	Páginas
I. INTRODUÇÃO	
Tabela I.1. <i>Exemplos de determinações envolvendo EQM's com eletrocatalisadores de elétrons, com sensor base de carbono</i>	11
Tabela I.2. <i>Componentes que podem ser usados para construção de biossensores</i>	22
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
Tabela IV.1. <i>Separação de pico anódico e catódico ΔE_p (mV) obtidos em diferentes eletrólitos de suporte. Experimento realizado em velocidade de varredura de 10 mV s^{-1}, concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0.</i>	55
Tabela IV.2. <i>Potencial médio, E_m, em mV obtido com os sensores em diferentes eletrólitos suportes. Experimento realizado em velocidade de varredura de 10 mV s^{-1}, concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0</i>	56
Tabela IV.3. <i>Influência da concentração da solução do eletrólito de suporte no processo redox dos sensores. Experimento em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1}</i>	57
Tabela IV.4. <i>Corrente de pico anódico ($\mu\text{A cm}^{-2}$) após sucessivos voltamogramas, obtida para os diferentes sensores. Experimento realizado em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1}.</i>	57
Tabela IV.5. <i>Potencial médio, E_m (mV), e separação dos picos, ΔE_p (mV), em função da variação do pH da solução. Experimento realizado para os sensores desenvolvidos em velocidade de varredura de 10 mV s^{-1}</i>	59
Tabela IV.6. <i>Corrente catalítica para a oxidação do NADH ($\Delta j / \mu\text{A cm}^{-2}$) em função do pH da solução, empregando os sensores desenvolvidos. Experimento realizado na presença de $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de NADH em meio de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$</i>	64
Tabela IV.7. <i>Corrente catalítica ($\Delta j / \mu\text{A cm}^{-2}$) da eletrooxidação do NADH ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes tampões com concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0. Experimento realizado com os sensores EPC/SNAM e EPS/SNAN e EPC/SNAT.</i>	64
Tabela IV.8. <i>Condições finais da otimização dos sensores desenvolvidos para promover a eletrooxidação do NADH. Experimentos realizados em pH 7,0</i>	67

Tabela IV.9. <i>Parâmetros cinéticos e eletroquímicos da eletrooxidação do NADH em função do pH, empregando os sensores EPC/SNAM e EPC/SNAN</i>	76
Tabela IV.10. <i>Efeito da solução tampão sobre a resposta do biossensor, aplicando potencial de 0,0 mV vs ECS. Solução tampão 0,1 mol L⁻¹, pH 7,8 com 5 10⁻⁴ mol L⁻¹ de etanol.</i>	91
Tabela IV.11. <i>Dependência da resposta do biossensor para álcool em função do pH da solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, aplicando um potencial de 0 mV vs ECS com 5 10⁻⁴ mol L⁻¹ de etanol.</i>	92
Tabela IV.12. <i>Condições finais da otimização do biossensor para álcool e alguns parâmetros analíticos</i>	99
Tabela IV.13. <i>Determinação da concentração de etanol em amostra de bebidas, usando o biossensor proposto.</i>	100
Tabela IV.14. <i>Porcentagem de recuperação em diferentes amostras obtida com o biossensor</i>	101

GLOSSÁRIO

AM	- Azul de Meldola
AN	- Azul do Nilo
AT	- Azul de Toluidina
ADH	- Álcool desidrogenase – Alcohol dehydrogenase
AOD	- Álcool oxidase
BSA	- Albumina de soro bovino – Bovine serum albumin
D	- Coeficiente de difusão
E	- Potencial
E^0	- Potencial formal
EDR	- Eletrodo de disco rotatório
ECS	- Eletrodo de calomelano saturado
EQM	- Eletrodo quimicamente modificado
F	- Constante de Faraday
FAD	- Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	- Flavina mononucleotídeo
ΔE	- Potencial médio
Δj	- Densidade de corrente
I	- Corrente
K_m	- Constante de Michaelis-Menten
n	- Número de elétrons
NADH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NAD^+	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
SN	- Sílica Nióbio
VC	- Voltamograma cíclico
ν	- Viscosidade
ω	- Velocidade angular



TESE DE
DOUTORADO

I
INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

A eletroquímica é uma importante área de desenvolvimento que vem conquistando espaço nos mais diversos campos. Isto se deve ao baixo custo de operação, à enorme possibilidade em aplicações analíticas e também à sua utilização como ferramenta de estudo de inúmeros fenômenos envolvendo transferência de elétrons [1-6].

Na química analítica, a eletroquímica tem vasta atuação com o emprego dos eletrodos quimicamente modificados, EQM's [7-9]. O desenvolvimento destes dispositivos busca correlacionar detecção rápida, específica, sensível, estável e de baixo custo em amostras alimentícias, ambientais, clínicas, etc [4,10-11]. A modificação do eletrodo visa pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução como forma de alterar a reatividade e seletividade do sensor base.

Uma importante estratégia no desenvolvimento dos EQM's é através da incorporação de componentes biológicos tais como enzimas, anticorpos, bactérias e outras moléculas biológicas. Esta estratégia visa dotar o sensor da alta seletividade destas espécies por seus substratos [12-14]. Entretanto, estes componentes precisam ser acoplados a transdutores para a obtenção dos chamados biossensores [15]. Nestes acoplamentos surgem alguns problemas como a estabilidade e a eficiência do transdutor [16].

Entre os biossensores, os enzimáticos são os mais empregados. Certamente o grande número de enzimas disponíveis, as novas tecnologias de imobilização, miniaturização e o surgimento de novos materiais fazem deste campo de pesquisa um importante mecanismo de desenvolvimento de sensores para os mais variados tipos de aplicações imagináveis [9-12].

O grupo das desidrogenases, composto por mais de 450 enzimas NAD(P)H dependentes, compõe um importante campo de pesquisa. Estas enzimas necessitam da participação do cofator enzimático, a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), sem o qual não desenvolvem sua atividade [17,18]. Só que estes cofatores exigem elevado potencial de operação, o que diminui a viabilidade

do biossensor em aplicações analíticas devido à interferência de outros componentes eletroativos presentes no meio [19-20]. Na busca da redução deste potencial, faz-se uso dos mediadores de elétrons [21,22].

Neste sentido, materiais que possibilitam a imobilização eficiente de espécies mediadoras e moléculas biológicas são de grande potencial para o desenvolvimento de sensores e biossensores [23-25]. Alguns trabalhos empregando zeólita, cerâmica e sílica gel estão publicados [26-28], mas ainda pouco explorados. A sílica gel em particular apresenta algumas características interessantes, tais como: grande área superficial, rigidez, porosidade e estabilidade química.

A sílica também apresenta grande possibilidade de modificação de sua superfície [29,30], porém pouco utilizada para a imobilização de mediadores de elétrons com a finalidade de construção de biossensores eletroquímicos. Alguns trabalhos utilizando sílica gel modificada no desenvolvimento de sensores e biossensores evidenciam o grande potencial deste material em EQM's [31,32].

A utilização de mediadores imobilizados pode servir como ponte para os elétrons via uma reação redox com o NADH [20-22]. Nesta função, algumas exigências devem ser satisfeitas por um mediador no emprego em EQM's. Além de possuir um potencial formal, E° , baixo ou compatível ao potencial ótimo na eletrooxidação do NADH, o mediador deve exibir rápida velocidade de reação com ambos, eletrodo e NADH e ser quimicamente estável em qualquer estado de oxidação.

Blaedel e Jenkins [33] descobriram que o pré-tratamento de superfícies de eletrodos, especialmente eletrodos de carbono, afeta o processo redox da reação de oxidação do NADH, tornando-o mais rápido; conseqüentemente, diminuindo o potencial necessário para a eletrooxidação do NADH, que é um dos maiores obstáculos à sua utilização. Esta habilidade foi atribuída aos grupos quinóides ou derivados contendo oxigênio presentes na superfície pré-tratada do eletrodo.

Em virtude desta descoberta, o-quinonas, benzoquinonas e posteriormente fenazinas, fenoxazinas e fenotiazinas passaram a ser usados

como mediadores de eletrodos na reação de oxidação do NADH, empregando eletrodos quimicamente modificados, EQM's [34-36].

Tais estruturas poliaromáticas adsorvem em eletrodos de grafite e pasta de carbono, para formar os eletrodos quimicamente modificados [21,36,37]. O mediador adsorvido resulta no deslocamento do potencial formal para valores mais positivos cerca de 50-150 mV, comparado com o valor em solução [24]. Mudanças no pK_a , tanto na forma reduzida como oxidada do mediador adsorvido, também foram observados nestes sistemas [21,38].

Por outro lado, muitos estudos são conduzidos na tentativa de elucidar o mecanismo de reação da transferência de elétrons da oxidação eletrocatalítica do NAD(P)H e do mediador adsorvido ou ligado quimicamente. O conhecimento deste mecanismo é muito importante, haja visto o grande número de enzimas NAD(P)H dependentes [21]. Nesta direção, a determinação dos parâmetros cinéticos desta reação é imprescindível para uma melhor compreensão deste mecanismo.

Além destes fatores citados até o momento, alguns outros pontos relacionados à enzima são também fundamentais no desenvolvimento dos biossensores. Fatores como a estabilidade da enzima no suporte utilizado, o procedimento de imobilização, o tipo de amostra, a presença de ativadores e/ou inibidores acabam exercendo grande influência na eficiência do biossensor e são objeto de intenso estudo [13,19,39].

Sobre o processo ótimo de imobilização, não existe uma regra geral, e sempre se faz uma aproximação empírica. Cada enzima é única em suas características e isso influenciará na escolha do procedimento de imobilização. O tipo de ligação, o material de suporte, o uso de aditivos e o método de imobilização podem ter efeitos pronunciados na constante de ligação do substrato, na velocidade máxima de reação, no pH ótimo, na sensibilidade e estabilidade do sistema.

Muitas vezes são usadas combinações das técnicas de imobilização para minimizar problemas envolvidos nos métodos individuais, como por exemplo, em estudos utilizando-se biossensores a base de enzimas desidrogenases [40], em

que a enzima é adsorvida sobre grafite em pó. Neste caso, ocorre adsorção e oclusão na pasta de carbono. Entretanto, ainda falta estabilidade ao sistema, que pode ser alcançada misturando o grafite em pó com carbodiimida, facilitando a formação de ligações covalentes aos grupos hidroxilas ou carboxilas sobre a superfície de grafite, podendo ainda adicionar glutaraldeído para formação de ligação cruzada.

Como visto, muitos estudos são realizados na área dos EQM's, gerando um grande número de publicações anuais. Neste contexto, muitos avanços foram conquistados, hoje estes sensores são empregados com sucesso em praticamente todas as áreas. A respeito dos biossensores, as conquistas não foram menores, mas ainda há muito por fazer. O grupo das desidrogenases representa um campo enorme de desenvolvimento e é nesta área que se concentra a linha de pesquisa desta tese.

1.1. Sensores

Sensores são dispositivos sensíveis a variações associadas a fenômenos físicos ou químicos de reconhecimento. São formados por três partes: a fase sensora propriamente dita (reconhecedora), capaz de "sentir" alterações relacionadas a fenômenos físicos ou químicos; a fase transdutora ou amplificadora, a qual torna o sinal do reconhecimento em algo mensurável e a fase condutora, que transporta o sinal para o instrumento de medida. Deste modo, os sensores podem ser reunidos em dois grupos principais, os físicos e os químicos.

Os sensores físicos respondem a fenômenos como variações de temperatura, pressão, campo magnético e força, [41-43]. Já os sensores químicos apresentam uma interface (reconhecedora) onde ocorrem fenômenos químicos. Esta interface está ligada ao transdutor que transforma uma informação química, oriunda de um sistema (analito), em um sinal analítico útil. A informação obtida no instrumento de medida pode estar relacionada a uma reação química ou mesmo a uma propriedade química do analito [44-46].

Os sensores químicos apresentam três partes básicas: o *receptor*, região reconhecadora onde ocorre a reação química seletiva; o *transdutor*, que traduz o sinal químico gerado pela reação em um sinal mensurável e o *condutor*, que transporta o sinal para a instrumentação de medida.

De acordo com o tipo de transdutor utilizado, os sensores podem ser classificados como: *ópticos* (absorção, fluorescência, reflectância), *piezelétricos* (alteração de massa), *calorimétricos* (calor), *eletroquímicos* (corrente, condutividade, potencial), etc [47-51]. Dependendo do tipo de transdutor utilizado, será empregado um amplificador de sinal diferente.

Os sensores eletroquímicos baseiam-se em reações de transferência de carga (processos faradaicos), ou em fenômenos de migração de cargas (processos não faradaicos). Dependendo da natureza da fase receptora, podem ser classificados em sensores ou biossensores, podendo ser: potenciométricos [52], condutométricos [53], amperométricos [54] e voltamétricos [55]

1.2. Sensores Eletroquímicos

Os sensores eletroquímicos fazem uso dos eletrodos como dispositivo transdutor de sinal. No entanto, o uso dos eletrodos na sua forma original, sem agregar nenhum outro componente, limita muito seu uso por motivos de sensibilidade, estabilidade, seletividade e uma série de outros problemas. Por isso, pensando na melhoria das características dos sensores eletroquímicos, surgiram os eletrodos quimicamente modificados (EQM) [56].

O termo eletrodo quimicamente modificado foi introduzido no jargão eletroquímico por Murray e colaboradores na década de 70 [57], para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas na superfície dos eletrodos, com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução.

A modificação deliberada da superfície do eletrodo é uma forma de impor e controlar sua reatividade e/ou seletividade, possibilitando o desenvolvimento de eletrodos para vários propósitos e aplicações.

Os primeiros EQM's estudados foram construídos a partir da modificação da superfície de eletrodos tidos como inertes tais como ouro, platina e carbono, sobre os quais foram depositados óxidos e polímeros, que conferiam novas propriedades a estes eletrodos [56]. Estas modificações podiam ser alcançadas por meios de adsorção, ligação covalente, recobrimento com membranas permeáveis ou por formação de compósitos [58-59].

Atualmente, os EQM's são extensamente empregados em aplicações analíticas envolvendo principalmente técnicas voltamétricas ou amperométricas. Entretanto, também são empregados como eletrodos de íon seletivos.

I.3. Emprego dos EQM's em Eletroanálises

Do ponto de vista analítico, a sensibilidade e/ou a seletividade de uma determinação deve aumentar com a utilização de um EQM's para que seu uso seja justificado. Isto pode ser alcançado através dos fenômenos de pré-concentração, eletrocatalise e exclusão de interferentes.

Em geral, a obtenção de sensibilidades mais altas ocorre por pré-concentração da espécie de interesse ou por eletrocatalise, sendo que a aplicação de qualquer destes princípios resulta em inerente aumento da seletividade. Ganhos adicionais podem ser alcançados pela utilização de recobrimento com membranas poliméricas que bloqueiam o acesso de espécies interferentes à superfície do eletrodo.

A seguir, é feita uma breve descrição das principais estratégias de modificação dos EQM's, na busca da melhoria em seletividade, sensibilidade, estabilidade e na performance em geral.

I.3.1. Pré- concentração do Analito

Nos EQM's a pré-concentração dar-se-á através de complexação, troca iônica ou por ligação covalente entre a espécie de interesse e um modificador imobilizado na superfície do eletrodo [58]. Este agente modificador apresenta

particular afinidade pela espécie de interesse, o que confere seletividade à medida [60-62]. Atualmente, a utilização de sílica-gel em processos de pré-concentração vem despertando grande interesse em aplicações analíticas [63]. A adsorção sobre esta matriz, ou em uma de suas diversas formas modificadas com objetivo de pré-concentrar analitos, é muito simples e útil, justificando seu emprego nesta área.

I.3.2. Minimização de Interferentes

A presença de interferentes, os quais podem inibir ou mascarar a resposta eletroquímica da espécie de interesse, pode ocorrer em geral devido aos seguintes fenômenos:

- a) À passivação do eletrodo, ou seja, adsorção do interferente à superfície do eletrodo, o que impede o acesso da espécie de interesse;
- b) Competição do interferente com a espécie de interesse pelos sítios ligantes existentes à superfície do eletrodo;
- c) Eletrólise do interferente, pré-concentrado na superfície do eletrodo ou em solução, em valor de potencial próximo ao potencial de eletrólise da espécie de interesse.

O recobrimento da superfície do eletrodo com uma membrana polimérica que possa, com base na carga e/ou tamanho, bloquear o acesso do interferente, sendo permeável à espécie de interesse, é a principal maneira de diminuir o grau de interferência por meios físicos [58,64-66].

Filmes, tais como acetato de celulose ou Nafion, são muito utilizados para este fim. Nafion é um polieletrólito aniônico que é capaz de repelir espécies aniônicas enquanto permite a passagem de cátions. Por sua vez, os filmes de acetato de celulose atuam com base no tamanho das espécies envolvidas. Outra maneira de excluir interferentes com base em interações eletrostáticas pode ser através do recobrimento da superfície do eletrodo com monocamadas, como no caso dos eletrodos auto-organizados. Por exemplo, pode-se promover a incorporação de uma monocamada de fosfolipídio a um eletrodo de mercúrio,

conferindo-lhe aumento na permeabilidade devido à presença dos grupos hidrofóbicos na camada fosfolipídica. Por outro lado, a incorporação de compostos biológicos ativos a esta membrana pode levar a um aumento considerável na seletividade deste sensor [67].

I.3.3. Amplificação de Resposta

A eletrocatalise consiste na redução da energia de ativação de transferência de elétrons numa célula eletroquímica. O processo redox de um substrato que apresenta uma cinética de transferência de elétrons lenta na superfície do eletrodo é mediada por um sistema que leve a uma troca de elétrons mais rápida com o eletrodo e o substrato. Isto acarreta redução do sobrepotencial de ativação em processos que podem ser eletroquímico-químico ou na ordem inversa, químico-eletroquímico [20,21,46].

O sobrepotencial de ativação consiste na aplicação de um potencial adicional a E^0 necessário para que o processo redox do sistema possa acontecer. A redução deste sobrepotencial aumenta a seletividade das medidas, uma vez que reduz a possibilidade de que os potenciais de eletrólise de espécies interferentes presentes sejam atingidos.

Várias espécies químicas são utilizadas com o objetivo de diminuir o sobrepotencial, com destaque para os mediadores redox, os quais podem ser espécies tais como: quinonas, tetratiofulvaleno, tetracianoquinodimetano; compostos organometálicos (ferrocenos, ftalocianinas, óxidos de rutênio, metaloporfirinas, etc.) ou enzimas. Estas espécies atuam em solução ou no caso de EQM's, imobilizadas no eletrodo. A **Tabela 1.1** ilustra alguns exemplos de determinações voltamétricas e amperométricas, envolvendo EQM's com mediadores redox.

Dentre as inúmeras reações que se busca diminuir a energia de ativação, a eletrocatalise do NADH é muito investigada, isto porque a maioria das enzimas desidrogenases dependem deste cofator para desenvolverem suas atividades, e quando se pensa em aplicações eletroanalíticas, é fundamental a aplicação de

baixos potenciais. Dentro deste contexto, será dada uma abordagem maior a este tema, visto que um dos objetivos deste trabalho é o desenvolvimento de biossensores usando enzimas desidrogenase.

Tabela I.1. Exemplos de determinações envolvendo EQM's com eletrocatalisadores de elétrons, com sensor base de carbono

Sensor Base	Forma de Modificação	Analito	Ref.
Carbono vítreo	Eletrodo modificado com poli(4-vinilpiridina) contendo $\text{Mo}(\text{CN})_6^{4-}$	Ácido ascórbico	68
Pasta de carbono	Eletrodo modificado com sílica/fosfato de zircônio contendo diferentes mediadores	NADH	69
Carbono vítreo	Filme de polipirrol dopado com $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	Ácido ascórbico	70
Pasta de carbono	Eletrodo modificado com sílica/óxido de titânio/ ftalocianina de níquel tetrassulfonada	Hidrazina	71
Pasta de carbono	Eletrodo modificado com sílica/óxido de zircônio/ $[\text{Ru}(\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA})\text{H}_2\text{O}]$	O_2	72
Carbono vítreo	Eletrodo modificado com acetato de celulose contendo 2,6-diclorofenolindofenol	S^{2-}	73
Grafite espectroscópico	Adsorção de Riboflavina sobre a superfície do eletrodo	Hemoglobina	74
Grafite espectroscópico	Adsorção de Riboflavina sobre a superfície do eletrodo	O_2	75

1.3.3.1. Eletrocatalise da oxidação do NADH

A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) é um cofator bastante estudado devido à grande quantidade de enzimas desidrogenases que dependem do processo redox deste cofator, e devido a sua importância como transportador de elétrons em células vivas. Atualmente sabe-se que existem cerca de 250 enzimas que dependem da NAD(H) e 150 do NAD(P) [18,21].

O emprego do NADH em biossensores amperométricos foi por muitos anos limitado, uma vez que era necessária a presença do NADH dissolvido em solução. O maior problema da utilização de enzimas desidrogenases em biossensores é a dificuldade de regeneração do NADH.

Problemas como oxidação, substâncias interferentes e envenenamento do eletrodo eram comumente observados em eletrodos contendo enzimas desidrogenases devido à necessidade de aplicação de potenciais elevados. Uma das estratégias usadas para diminuir o potencial aplicado foi a utilização de mediadores redox imobilizados sobre a superfície do eletrodo.

Um mediador de elétrons para atuar de forma eficiente deve satisfazer algumas exigências: além de possuir um potencial formal, E° , baixo ou compatível ao potencial ótimo na detecção do NADH, o mediador deve exibir elevada velocidade de reação, tanto com o eletrodo quanto com o NADH, e também ser quimicamente estável em qualquer estado de oxidação.

A reação do mediador deve envolver, preferencialmente, 2 elétrons e 1 próton, possibilitando uma rápida transferência de elétrons na forma similar de hidreto numa reação homogênea com o NADH [21]. Compostos orgânicos contendo estrutura quinóide reagem prontamente com NADH em soluções aquosas. Miller e colaboradores [76] encontraram que N,N-dialquilfenilendiamina melhora de maneira considerável a velocidade de reação com o NADH. Contudo, os processos redox de tais compostos incluem reações secundárias que ocasionam o envenenamento do eletrodo.

Um aumento substancial na estabilidade dos estados de oxidação é observado com a estrutura básica p-fenilendiamina incorporada junto a uma fenoxazina ou fenotiazina (**Figura I.1**). Observa-se também, uma diminuição do valor de E° destes compostos em cerca de 300-400 mV, comparado com a estrutura livre da p-fenilendiamina [77].

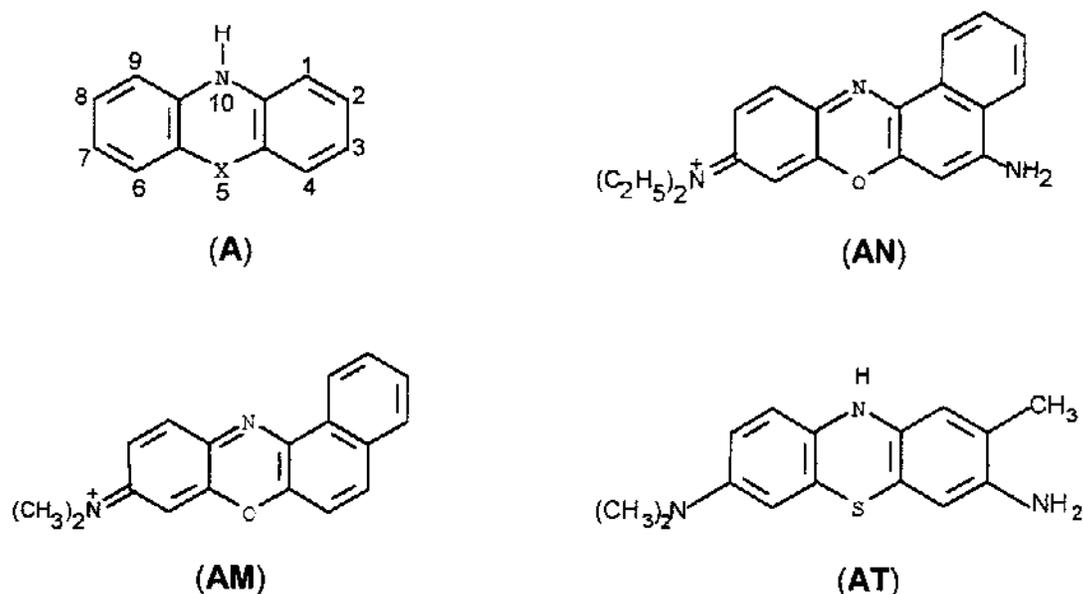


Figura I.1. (A) *Formula estrutural da fenoxazina (X=O), fenotiazina (X=S) e fenazina (X=N), sendo (AN) Azul do Nilo, (AM) Azul de Meldola e (AT) Azul de Toluidina.*

Desta forma, os EQM's contendo mediadores de elétrons para a eletrooxidação do NADH tornaram-se uma importante ferramenta para o estudo do mecanismo da reação envolvendo a transferência de elétrons do NADH. Gorton e colaboradores têm realizado extenso trabalho nesta área, com relevantes contribuições [21,36,38].

Na maioria dos casos, os mediadores são imobilizados por adsorção sobre a superfície do eletrodo ao nível de monocamadas por eletropolimerização, ligação covalente ou, no caso de eletrodos de pasta de carbono, podem ser também incluídos na pasta.

O maior obstáculo encontrado no desenvolvimento deste EQM's nesta área é o tempo de vida e a falta de seletividade na oxidação do NADH. Sendo assim, ainda existe um grande interesse em encontrar novos materiais ou alternativas para serem utilizados na eletrooxidação do NADH. Por outro lado, a compreensão da interação dos diferentes mediadores com o NADH é necessária para o desenvolvimento de novos tipos de configurações de biossensores a base de enzimas desidrogenases na busca de melhor eficiência dos mesmos.

Como visto, muitas estratégias são utilizadas para obtenção de EQM's com as mais variadas funções e características, conferindo-lhes enorme campo de aplicação. No mais, é importante que se conheça o sistema que se queira aplicar o EQM, qual o mecanismo de reação que envolve o analíto, as matrizes onde serão realizadas as medidas, a sensibilidade e seletividade que se busca, etc. Todos estes fatores deverão ser levados em consideração durante a elaboração do EQM.

Em paralelo às estratégias de modificação dos EQM's, é necessário que se avalie qual o melhor material para a construção do eletrodo e como será alcançada a modificação do eletrodo. É importante saber se as mudanças serão somente na superfície do eletrodo base ou se na constituição total, como no caso dos materiais compósitos; certamente é preciso avaliar todas estas variáveis.

Dentro desta ótica, a seguir é feita uma descrição dos principais métodos de preparação dos EQM's.

1.3.4. Principais Métodos de Modificação dos EQM's

Os principais agentes modificadores podem atuar tanto na variação das propriedades da superfície do eletrodo como implementar variações estruturais na elaboração dos EQM's. Os métodos mais importantes utilizados para a introdução de um agente modificador sobre a superfície do eletrodo base consistem na adsorção direta, na ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo e no recobrimento com filmes poliméricos [56]. Também é possível implementar modificações através da imobilização por oclusão em materiais compósitos, entre outras alternativas.

Para pensar em modificação da superfície do eletrodo para fins eletroanalíticos, é preciso que se conheçam as características físico-químicas do eletrodo de trabalho, bem como o comportamento físico-químico do composto de interesse e de seus interferentes.

1.3.4.1. Imobilização por Adsorção

A adsorção é o processo pioneiro e mais simples de se fixar um modificador no eletrodo base. Consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado, e na exposição, em geral por imersão, do eletrodo a esta solução. Pode também envolver a deposição desta solução, por exemplo, com o auxílio de uma micropipeta, sobre a superfície a ser modificada, com posterior evaporação do solvente [78-79].

Embora os primeiros estudos envolvendo adsorção tenham utilizado eletrodos de platina, a maioria dos trabalhos subseqüentes com adsorção, foram realizados com eletrodos de grafite e carbono vítreo. Eletrodos de carbono apresentam uma particular capacidade de adsorver reagentes que possuam sistemas de elétrons π estendidos, como por exemplo, compostos orgânicos aromáticos. Esta adsorção é devida à forte interação entre o plano basal do eletrodo de carbono e o sistema de elétrons π da molécula aromática.

A modificação da superfície do eletrodo por adsorção, embora simples e rápida, apresenta a desvantagem de produzir EQM's com no máximo uma camada do modificador imobilizado, o que pode limitar a faixa de resposta linear. Além disso, o fenômeno de adsorção é um processo de equilíbrio, podendo ocorrer dessorção do modificador para o meio durante sua utilização, o que resulta em perda de reprodutibilidade e diminuição da vida útil do EQM's preparado desta forma [58].

1.3.4.2. Imobilização por Ligação Covalente

Outro método de promover a modificação da superfície do eletrodo é através da formação de ligação covalente [80]. A maioria dos eletrodos metálicos, quando oxidados em meio ácido, são recobertos com uma camada fina de óxido bastante reativa em relação aos grupos silanos. Portanto, um metal, após ser oxidado, pode ser silanizado e, posteriormente, reagir com outra molécula

contendo o grupo funcional que se queira imobilizar. O silano atuará como um tipo de ponte para fixar um grupo funcional específico à superfície do eletrodo.

Superfícies de carbono, por exemplo, apresentam grupos funcionais contendo oxigênio, tais como álcoois (fenóis), ácidos carboxílicos, cetonas (quinonas) e anidridos, resultantes da oxidação de átomos de carbono do plano vertical passíveis de derivatização. A modificação de superfícies de carbono, via ligação covalente, tem sido em grande parte baseada na manipulação da reatividade destes grupos funcionais frente a reagentes como aminas, organossilanos, cloreto de tionila, cloreto cianúrico, entre outros [80].

Os eletrodos modificados via ligação covalente são mais estáveis em relação aos obtidos pelos demais métodos; entretanto, são mais difíceis de serem preparados. Da mesma forma que a modificação por adsorção, esta metodologia também gera cobertura com no máximo uma monocamada imobilizada. Este método é de especial interesse na imobilização de enzimas, sendo amplamente empregado nesta área [58,80].

1.3.4.3. *Recobrimento com Filmes Poliméricos*

Outra técnica bastante atrativa para a preparação de eletrodos modificados é o recobrimento da superfície do eletrodo com filmes poliméricos. Estes filmes devem ser condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte ou à espécie de interesse. Ao contrário da modificação por adsorção ou por formação de ligação covalente, este método permite a imobilização de muitas camadas (1 a 2000) da espécie ativa na superfície do eletrodo. Isto pode resultar na ampliação da resposta eletroquímica.

Filmes poliméricos são muito empregados em EQM's com vários objetivos, tais como: proteger a superfície dos eletrodos de impurezas, bloquear interferentes, imobilizar biocomponentes, incorporar mediadores e também para melhorar a biocompatibilidade do sensor [81-83]

Devido à grande variedade das características dos polímeros, pode-se explorar suas propriedades conforme o interesse. Dessa forma, polímeros

eletroativos (eletrocatalise), quimicamente ativos (propriedades ligantes ou de troca-iônica para pré-concentração) e inertes (apenas exclusão de interferentes) são freqüentemente utilizados. No geral, os filmes poliméricos podem ser condutores, de troca-iônica, não-condutores e de membranas compostas.

Filmes poliméricos condutores são amplamente usados devido à característica de aumentar a velocidade de transferência de elétrons. Geralmente os filmes poliméricos de troca-iônica possuem um componente redox ativo, o qual é um contra-íon de um filme poliônico como polivinilpiridina, polipirrol, polianilina, Nafion, etc.

Os polímeros não-condutores são freqüentemente usados por sua característica permisseletiva. Este tipo de filme polimérico é empregado em biossensores para prevenir interferentes, impurezas sobre a superfície do eletrodo, imobilizar biocomponentes e mediadores, de tal forma que estes não sejam lixiviados para a solução. A espessura típica para estes filmes formados por eletropolimerização é de cerca de 10 nm.

Membranas compostas oferecem características de se combinar efetivamente mais que um filme, embora exista a possibilidade de se obter filmes com as mesmas propriedades utilizando-se outras classes de filmes poliméricos. A literatura mostra um trabalho desenvolvido por Koopal *et al* [84], onde este procedimento é empregado na preparação de um biossensor para glicose.

A utilização de polímeros no desenvolvimento dos EQM's não se limita apenas aos filmes poliméricos. Atualmente, polímeros condutores são usados para imobilização de moléculas, até mesmo as enzimas, tanto na superfície como oclusas no interior das matrizes poliméricas, originando sensores com ampla faixa de aplicação [85,86].

1.3.4.4. Imobilização por Oclusão

Outro caminho muito utilizado para a imobilização de agentes modificadores é através da oclusão em gel [87-88], o qual é baseado em acoplar os mais diversos componentes em rede de uma matriz polimérica, ou inserindo-os

em membranas semipermeáveis. Materiais como enzimas, células complexas, organelas e outros biocatalisadores são bastante apropriados para serem imobilizados através desta metodologia.

Este método apresenta a vantagem do componente biológico não se ligar à matriz, o que pode ser muito importante para evitar possível diminuição da atividade enzimática devido ao processo de imobilização. As desvantagens deste método estão na possibilidade da enzima se lixiviar da rede polimérica (gel), nas propriedades não condutoras do gel, além da dificuldade da difusão do substrato.

1.3.4.5. Formação de Compósitos

Os materiais compósitos, como o próprio nome indica, são formados pela combinação de duas ou mais fases de diferente natureza. Cada fase mantém suas características individuais, mas a mistura pode apresentar novas características físicas, químicas ou biológicas [89]. Compósitos com características condutoras são utilizados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos com excelentes resultados [90].

As técnicas de preparação de compósitos são adequadas para modificação de eletrodos à base de carbono em pó (grafite, negro de carbono, etc), tais como: Eletrodo de pasta de carbono, de grafite-epóxi, "screen-printed" e pastilhas.

Os eletrodos preparados a base de pasta de carbono apresentam baixa corrente de fundo, baixo ruído, modificação conveniente, renovabilidade da superfície e possibilidade de miniaturização. Estas qualidades dos eletrodos a base de pasta de carbono os mantêm em extensivo uso em eletroanalítica [89-91], apesar da falta de estabilidade estrutural que esta matriz semi-sólida apresenta.

As pastas de carbono são elaboradas da mistura de grafite em pó e um líquido imiscível em soluções aquosas, em geral óleo mineral. O óleo serve para dar consistência à pasta, atuando como aglutinante e mantendo o grafite firme no eletrodo, bem como preencher cavidades vacantes entre as partículas de grafite e isolar o grafite do contato direto com soluções aquosas [91].

A grande vantagem deste tipo de matriz para a construção de sensores é a flexibilidade na modificação da composição da pasta, ou seja, percentuais de grafite, óleo, mediador, catalisador, coadjuvantes (polímeros condutores, tensoativos) podem ser facilmente alterados na busca da melhor composição da pasta [9,40,92,93]. Mas também é importante frisar que compósitos a base de pasta de carbono apresentam alguns problemas, principalmente relacionados a perda gradual do modificador para a solução de medida, prejudicando a estabilidade do eletrodo.

Em vista destes problemas, novas matrizes e tecnologias de imobilização vêm sendo incorporadas, visando o melhoramento dos materiais compósitos. Dentre estes avanços, destaca-se a utilização de novas matrizes, tais como: óxidos metálicos, alumina, sílica gel e sol-gel, zeólitas, entre outros tipos, [26,29,30,32].

A sílica gel, devido à características de sua superfície, proporciona um grande potencial para aplicação em eletroquímica [29,30]. A sílica pode ser modificada com uma enorme variedade de grupos funcionais, enriquecendo consideravelmente suas propriedades de superfície. A alta área superficial das sílicas sintéticas associado à grande possibilidade de modificação de sua superfície, tornam este material útil como suportes para vários catalisadores com elaboração de importantes sensores e biossensores a base de materiais compósitos.

Os óxidos mistos também têm atraído considerável atenção dos pesquisadores em aplicações como novos materiais para uso em EQM's. Estas matrizes são do tipo SiO_2/MO_2 (onde M é um metal de transição), que permite introduzir altas concentrações do metal nestes materiais, promovendo homogeneidade na matriz, e gerando propriedades interessantes. Por exemplo, a adição de titânio ou zircônio promove interações nos óxidos mistos SiO_2/MO_2 a nível molecular que causam o aparecimento de sítios ácidos na superfície, não encontrados sobre os óxidos puros.

Assim, os sistemas binários são ativos para reações catalisadas por ácidos. Além disso a alta concentração do metal nos óxidos mistos pode promover

o aparecimento de propriedades trocadoras de íons e estruturais interessantes, podendo desta forma ser facilmente modificado e utilizado em desenvolvimento de sensores a base de materiais compósitos [28,94,95].

Outra classe a ser destacada envolve a utilização de zeólitas e matrizes correlatas, incorporando as espécies eletroativas por mecanismo de troca-iônica [96,97]. Estas matrizes são empregadas para o estudo do mecanismo de transferência de elétrons envolvidos em processos redox para espécies imobilizadas por esta matriz inorgânica.

As matrizes a base de zeólitas, com sua estrutura tridimensional, podem proporcionar melhoria na seletividade dos sensores baseadas no tamanho e na estrutura dos reagentes, bem como apresentar características eletrocatalíticas interessantes. As zeólitas estão sendo empregadas em detecção amperométrica para vários analitos gasosos, íons metálicos, além de substâncias orgânicas como glicose, hidrazina, fenol, dopamina, entre outras [98-100].

Como visto, o desenvolvimento dos EQM's encontra-se em plena expansão, com avanços nos métodos de modificação não se restringindo à imobilização de espécies na superfície dos eletrodos, mas também na sua elaboração, como no caso dos materiais compósitos. Todo esse desenvolvimento acaba por aumentar a versatilidade e as possibilidades de aplicação destes dispositivos.

De certo, todos estes avanços incorporados aos EQM's asseguram-lhes um papel de destaque, tornando sua utilização cada vez mais acessível, haja visto o emprego destes sensores em análises clínicas, ambientais ou mesmo nos laboratórios de pesquisas.

Dentro desta ótica, a continuidade no desenvolvimento dos EQM's parece certa e, uma área em especial merece destaque: a dos biossensores. Isto devido à comprovada eficiência dos biossensores, ao grande número de enzimas disponíveis e também pelo potencial desta área ainda não explorada. Assim, será feita uma descrição mais detalhada desta área dos EQM's.

I.3.5. Biossensores Eletroquímicos

O termo biossensor é aplicado a sistemas que empregam como componente de reconhecimento um composto biológico incorporado ao transdutor, sendo uma das suas principais características a seletividade, a qual provém do biorreconhecedor na interação com o analito [46]. Tal propriedade faz com que haja muitos estudos no sentido do desenvolvimento dos biossensores para as mais diversas aplicações, com grande interesse econômico, clínico e ambiental.

O emprego de biossensores tem grande importância nas áreas médicas (análises clínicas), farmacêutica e industrial, pois permitem uma redução do custo e diminuição de resíduos gerados durante uma análise. Os biossensores são constituídos por um reconhecedor, um transdutor e um amplificador de sinal, conforme representado na **Figura I.2**.

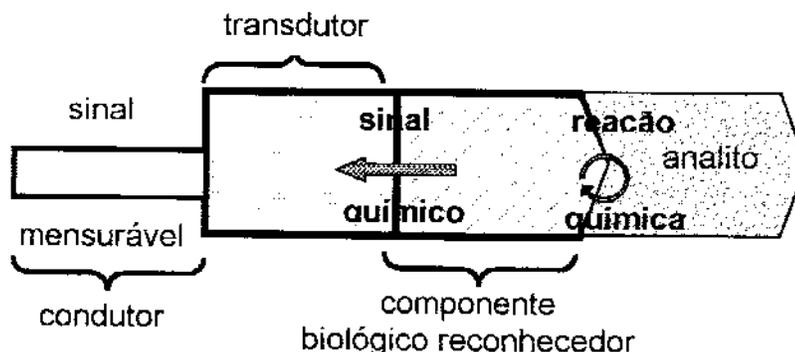


Figura I.2. Desenho esquemático dos componentes de um biossensor

Nos biossensores, o componente biológico incorporado junto ao transdutor é o responsável pelo reconhecimento do analito. Os diferentes componentes que podem ser usados para construir biossensores são mostrados na **Tabela I.2**. Estes componentes devem estar imobilizados no transdutor, sendo esta etapa realizada de diversas maneiras, tais como: adsorção, oclusão em gel, ligação cruzada ou covalente. A possibilidade de reutilizar o componente biológico tem despertado o interesse no desenvolvimento desses sensores, visto que este processo diminui o custo das análises.

Tabela I.2. Componentes que podem ser usados para construção de biossensores

Elemento biológico	Transdutor
Ácidos nucleicos	Acústico
Anticorpos	Amperométrico
Células	Calorimétrico
Enzimas	Conducométrico
Membranas	Mecânico
Moléculas orgânicas	Molecular Eletrônico/FET
Organelas	Óptico
Organismos	Potenciométrico
Receptores	
Tecidos	

O primeiro biossensor surgido na década de 60, desenvolvido por Updike e Hichs [101], utilizava a enzima glicose oxidase imobilizada em uma membrana de acrilamida. A enzima no seu ciclo catalítico transforma a glicose em ácido glicônico e peróxido de hidrogênio, com o consumo de oxigênio do meio. O sistema de resposta quantificava a variação da concentração de oxigênio, que por sua vez é proporcional à concentração de glicose. Estes biossensores nos quais a variação da concentração de um dos substratos da enzima ou dos produtos da reação enzimática é detectada diretamente sobre um eletrodo são chamados de biossensores de primeira geração [102].

Embora os biossensores de primeira geração apresentam boas respostas no caso das oxidases em que a resposta é função da redução do oxigênio ou do H_2O_2 , o potencial aplicado é muito alto, implicando em um elevado número de interferentes e/ou no envenenamento da superfície do eletrodo [19-21]. Uma alternativa para resolver esses problemas, da qual originou os biossensores de segunda geração, foi a imobilização conjunta de mediadores redox e enzimas. Isto possibilitou a regeneração da enzima ou a diminuição do potencial aplicado para detecção dos produtos da reação enzimática, minimizando os interferentes [21,22].

Apesar da diminuição do número de interferentes com a adição de mediadores, a interação enzima/mediador não é tão simples, dependendo ainda da proximidade dos dois para que ocorra a transferência de elétrons [46]. Assim, a orientação durante o processo de imobilização é um passo fundamental na procura por sistemas mais simples e eficientes para a construção dos biossensores de segunda geração. Atualmente, tem-se buscado biossensores cuja resposta seja referente à regeneração direta da enzima pelo eletrodo, sem a necessidade da inclusão de mediadores (terceira geração).

Dentre os biossensores desenvolvidos, os enzimáticos são os mais utilizados. Isto se deve ao grande número de enzimas disponíveis que podem ser empregadas na elaboração dos biossensores. Só as desidrogenases constituem um grupo com mais de 450 enzimas NAD(P)H dependentes, com grandes possibilidades de exploração.

É bem verdade que o emprego do cofator NADH acarreta sérios problemas devido ao seu elevado potencial de oxidação, chegando a aproximadamente 1 V vs ECS nos eletrodos de platina, carbono e ouro [21,103,104]. Nestas condições, é comum a geração de reações laterais envolvendo radicais, o que pode ocasionar o envenenamento do eletrodo, e também, neste valor de potencial, é muito mais fácil a interferência de outros compostos eletroativos presentes no meio [18-21,105-107].

Como se sabe, um caminho viável para a diminuição do sobrepotencial da oxidação do NADH pode ser obtido através da imobilização de mediadores de elétrons. Estes compostos têm a função de melhorar a transferência de elétrons entre o NADH e o eletrodo, tornando o processo de oxidação mais fácil e possibilitando o desenvolvimento de biossensores a base de enzimas desidrogenases. Porém, mesmo com os avanços conquistados na área de novos materiais, novos mediadores e novas técnicas de imobilização, muito ainda há por fazer no desenvolvimento dos biossensores [108-110].

Desta forma, o aprofundamento nos estudos de mecanismo de reação envolvendo o cofator NADH é de extrema importância, não só para o

desenvolvimento de biossensores, como também para o entendimento das transferências de elétrons em sistemas biológicos.

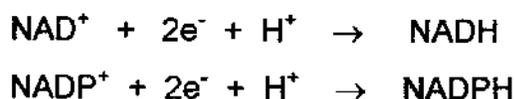
1.3.5.1. As Enzimas NAD(P)H Dependentes

A maioria das células possui enzimas que catalisam a oxidação de centenas de diferentes compostos. Essas enzimas canalizam os elétrons retirados dos seus substratos em alguns tipos de transportadores universais de elétrons [111,112].

Os nucleotídeos NAD^+ , NADP^+ , FMN e a FAD são cofatores hidrossolúveis que sofrem processos redox reversíveis em muitas das reações de transferência de elétrons do metabolismo. Sua redução em processos catabólicos resulta na conservação da energia livre liberada pela oxidação do substrato. Os nucleotídeos NAD^+ e NADP^+ movem-se facilmente de uma enzima para a outra, porém os nucleotídeos de flavina, FMN e FAD são fortemente ligadas às enzimas, chamadas de flavoproteínas, para as quais eles servem como grupos prostéticos.

A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+ na sua forma oxidada) e o seu análogo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP^+) são compostos de dois nucleotídeos unidos através dos seus grupos fosfato por uma ligação de anidrido de ácido fosfórico, **Figura 1.3**. Como os anéis de nicotinamida lembram a piridina, esses compostos são algumas vezes chamados de nucleotídeos de piridina. A vitamina niacina fornece a porção nicotinamida para a síntese dos nucleotídeos de piridina [112].

Ambas as coenzimas sofrem redução reversível do anel nicotinamida, **Figura 1.3**. Como uma molécula de substrato sofre oxidação, a forma oxidada do nucleotídeo (NAD^+ ou NADP^+) recebe um íon hidreto ($:\text{H}^-$, o equivalente de um próton e dois elétrons) e é transformada na sua forma reduzida (NADH ou NADPH). A meia-reação para cada nucleotídeo é:



Nas abreviações NADH e NADPH, o H representa este íon hidreto adicionado à forma oxidada.

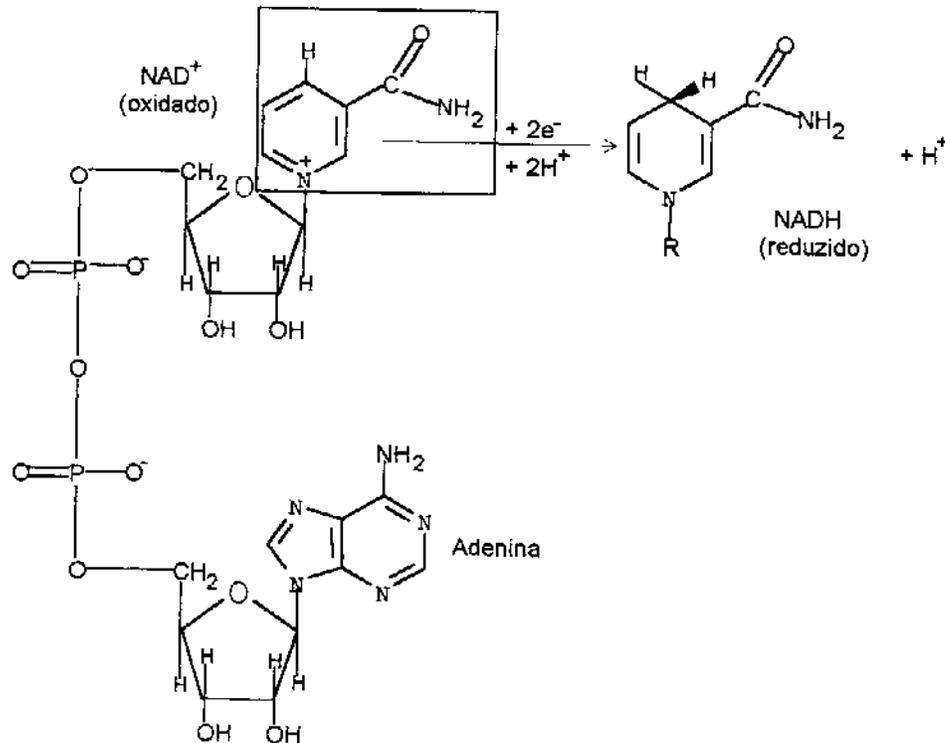
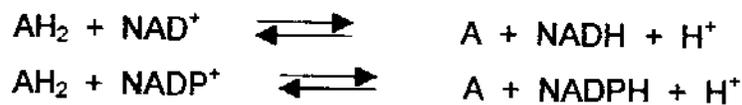


Figura I.3. Estrutura molecular da coenzima NAD, em suas formas oxidada e reduzida.

Um ponto importante nos sistemas biológicos é que poucas enzimas empregam qualquer um dos cofatores e a maioria revela uma preferência muito forte por um ou outro. Esta especialização funcional permite à célula manter dois conjuntos distintos de transportadores de elétrons no mesmo compartimento celular [112].

Mais de 450 enzimas são conhecidas por catalisar reações nas quais NAD⁺ ou NADP⁺ aceitam um íon hidreto do mesmo substrato reduzido, ou NADH ou NADPH doam um íon hidreto para um substrato. As reações gerais são:

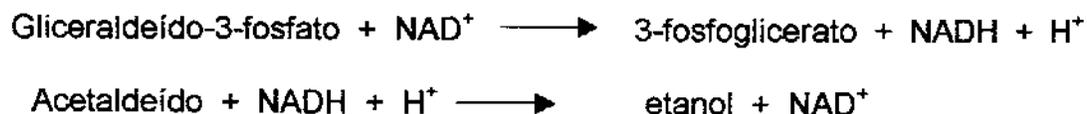


Onde AH_2 é o substrato reduzido e A o substrato oxidado. O nome geral para enzimas desse tipo é oxidorreductase, também comumente chamadas de **desidrogenases**. Por exemplo, a enzima álcool desidrogenase catalisa o primeiro passo do catabolismo do etanol, nele, o etanol é oxidado a acetaldeído:



Note que um dos átomos de carbono do etanol sofreu a perda de hidrogênio e foi oxidado da função álcool para a função aldeído.

É importante ressaltar também que a associação entre uma dada desidrogenase e o NAD ou NADP é relativamente fraca; o cofator difunde facilmente da superfície de uma dessas enzimas para a outra, atuando como um transportador hidrossolúvel de elétrons de um substrato metabólico para o outro. Por exemplo, na produção de álcool durante a fermentação da glicose por células de levedura, um íon hidreto é removido do gliceraldeído-3-fosfato para uma enzima (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e transferido para o NAD^+ . O NADH assim produzido deixa então a superfície da enzima e difunde-se para outra enzima, a álcool desidrogenase, com transferência de um íon hidreto do NADH para o acetaldeído, produzindo etanol:



Note que na reação global, não há produção líquida ou consumo de NAD^+ ou NADH; os cofatores funcionam cataliticamente, sendo repetidamente reciclados sem que ocorra uma mudança líquida na concentração de NAD^+ ou NADH.

Como visto, as desidrogenases e seus cofatores formam um grupo de enzimas com extrema importância, participando do metabolismo de inúmeras substâncias. A utilização destas enzimas em sistemas de análises é objeto de muitos estudos com excelentes resultados [19,20,23,46].

Na eletroquímica, o emprego das enzimas desidrogenases no desenvolvimento de biossensores já é uma realidade. Vários avanços foram alcançados com a introdução de novos materiais, novas técnicas de imobilização e também com o emprego de mediadores de elétrons, pois a oxidação direta do NAD(P)H na superfície de eletrodos exige elevado potencial, dificultando o emprego do biossensor como instrumento de análise [21].

Buscando entender ainda mais o mecanismo de reação da eletrooxidação do NADH, esta reação é objeto de intensa investigação na comunidade científica [18-21], tendo em vista que quanto maior o entendimento na atuação desta molécula, maior será o aproveitamento de suas qualidades catalíticas e, conseqüentemente, melhores biossensores serão produzidos.

1.3.5.2. Mecanismo da Eletrooxidação Catalisada do NADH

O primeiro experimento em laboratório sugerindo que a oxidação electrocatalítica do NADH era possível, foi conduzido por Blaedel e Jenkins [33]. Eles mostraram que o pré-tratamento do eletrodo, principalmente eletrodos à base de carbono, poderia baixar o sobrepotencial da oxidação do NADH.

Este fenômeno foi atribuído à formação de quinóides (equivalente a O-quinonas) ou derivados, contendo oxigênio na superfície pré-tratada. Como conseqüência, várias ortoquinonas e benzoquinonas foram usadas para efetuar a oxidação do NADH. Posteriormente, seguiu-se o uso de corantes orgânicos, como as fenoxazinas, fenotiazinas e fenazinas (**Figura I.1**), o que já foi relatado nesta introdução.

O mecanismo de oxidação por estes mediadores tem sido estudado tanto em solução quanto com o mediador imobilizado na superfície do eletrodo [21,22,34]. Através da cinética do processo redox dos corantes orgânicos atuando como mediadores de elétrons [21,113] sugere-se a formação de um complexo mediador-NADH, que é provavelmente o passo limitante da velocidade de reação.

Embora a teoria do complexo intermolecular seja aceita para explicar o processo de oxidação do NADH por corantes redox poliaromáticos, estudos da

reação de NADH com orto e para quinonas e algumas diaminas aromáticas mostram que com estes oxidantes a reação procede através da transferência de hidreto.

Mesmo no mecanismo mediado da oxidação do NADH, a regeneração do mediador no eletrodo e a reversibilidade (química e eletroquímica) desta reação não é tão simples. Estes fenômenos podem ser fontes de várias reações paralelas adicionais, limitando a eficiência e o tempo de vida de um sensor para NADH e/ou seu subsequente biossensor à base de enzimas desidrogenases.

A estabilidade do mediador também influencia as condições de catálise do NADH. Mesmo um mediador quimicamente estável não há garantias que ele não possa interagir com os intermediários do produto da oxidação de NADH, especialmente se estes intermediários puderem conter radicais livres e requererem participação de prótons do solvente.

No estudo da cinética mediada da oxidação eletrocatalítica do NADH, dois principais parâmetros cinéticos parecem ser de crucial importância na investigação da oxidação eletrocatalítica do NADH. Um destes parâmetros relata a cinética de transferência de elétrons entre o mediador adsorvido ou ligado quimicamente e o substrato do eletrodo. Para uma boa performance da oxidação eletrocatalítica do NADH, busca-se uma rápida transferência de elétrons.

Outro parâmetro cinético importante é a constante da velocidade da reação redox entre o NADH e o mediador. A velocidade desta reação depende da diferença de potencial eletroquímico da reação/catálise em ambos os pares redox.

Neste sentido, a investigação do comportamento da eletrooxidação catalítica do NADH frente a estas matrizes modificadas com diferentes mediadores é de muita importância, bem como um aprofundamento no estudo do mecanismo desta reação, usando estes sensores e empregando as metodologias dos estudos de cinética de reação.

I.3.6. Biossensor para Etanol

O álcool etílico desempenha papel fundamental em vários campos de atuação. Ele é o componente principal da indústria de bebida alcoólica e tem grande importância na indústria farmacêutica, de cosméticos e perfumaria, além de ser uma droga tóxica em níveis elevados, que o torna de grande interesse em análises clínicas [114-120].

O etanol também está envolvido diretamente nos casos de medicina-legal sendo a causa mais freqüente em acidentes de trânsito. Vários efeitos farmacológicos do etanol são observados quando sua concentração na corrente sanguínea alcança aproximadamente 10 mmol L^{-1} , sendo que a 10 vezes este nível, o etanol passa a ser uma droga letal [121-123].

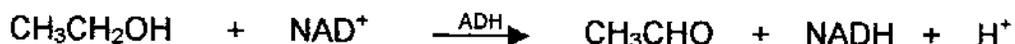
Do ponto de vista econômico, a determinação da concentração de etanol é um passo importante em processos de fermentação. Em vários campos das indústrias de alimentos e bebidas, sua determinação tem de ser realizada "on line", sendo particularmente importante no controle de qualidade na produção de bebidas [114,115,117,118]. O poder público também é um grande interessado pela determinação rápida e eficiente de etanol, pois taxas e regulamentações são muitas vezes impostas com base no teor de álcool de determinado produto.

Muitos métodos são utilizados para a determinação de etanol, tais como a cromatografia, análises espectrométricas e destilação [121,124-128]. Contudo, estes métodos são relativamente caros, demorados, complexos e exigem pré-tratamento da mostra. Desta forma, há uma grande demanda por métodos baratos, rápidos e confiáveis para a determinação de etanol.

Técnicas eletroquímicas, especialmente aquelas empregando biossensores amperométricos, são particularmente eficientes neste tipo de análise [115-119,129-132]. Estes dispositivos apresentam várias características analíticas favoráveis, tais como: sensibilidade, seletividade, rapidez, baixo custo, portabilidade e possibilidades de miniaturização [133-134].

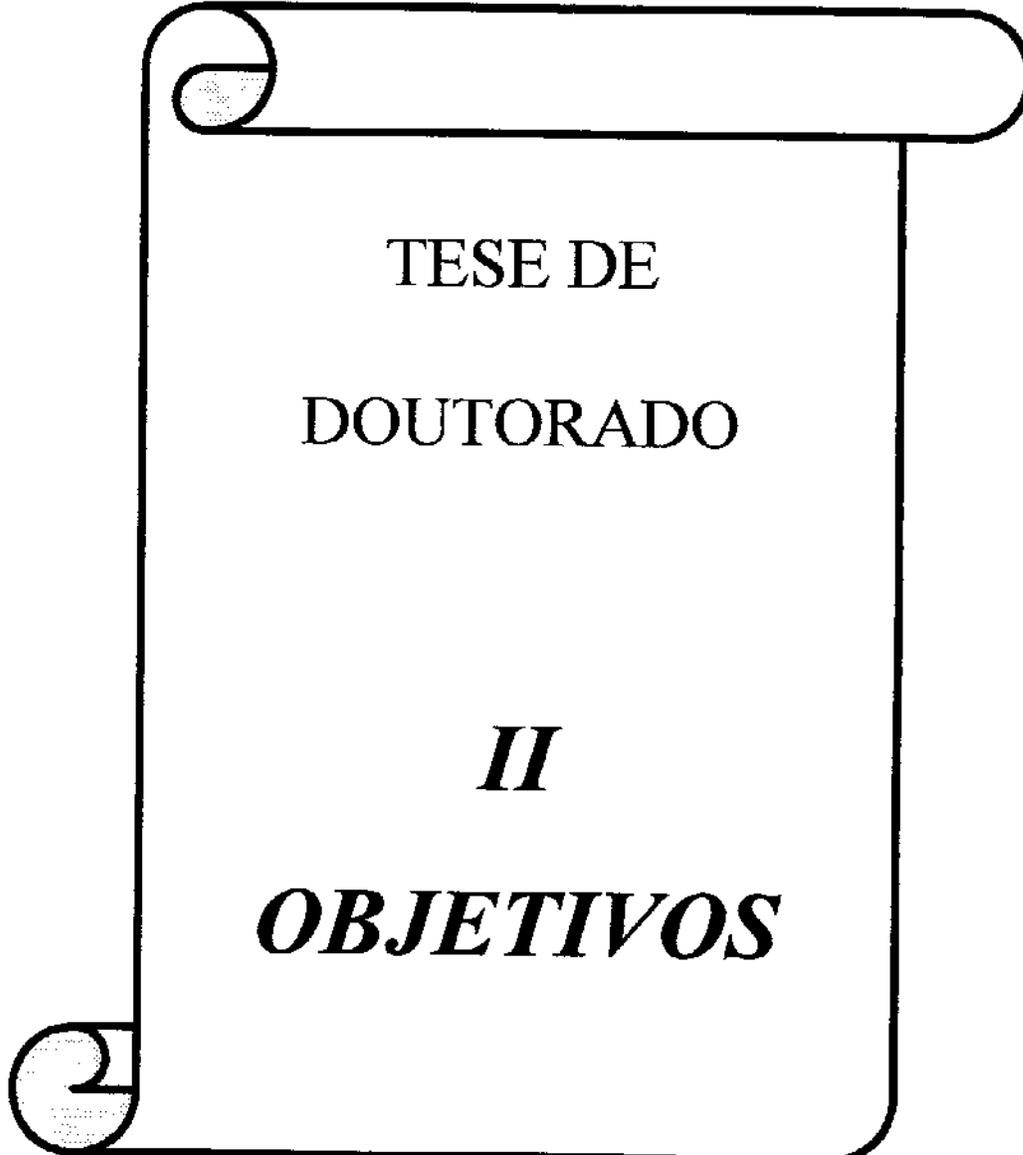
As enzimas utilizadas para o desenvolvimento de biossensores amperométricos visando a determinação de álcool etílico são a álcool oxidase

(AOD) e a álcool desidrogenase (ADH). Nos biossensores empregando AOD, o consumo de O_2 ou a produção de H_2O_2 são monitorados. Já nos biossensores empregando ADH, a enzima catalisa a oxidação do etanol a acetaldeído na presença do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), enquanto o NADH gerado na reação pode ser monitorado amperometricamente de acordo com a seguinte reação:



Este mecanismo de atuação apresenta algumas características importantes na determinação de etanol, como a não dependência do oxigênio molecular e a alta seletividade para etanol. No entanto, os biossensores amperométricos dependentes de NADH também apresentam algumas desvantagens, principalmente relacionadas à instabilidade [18-21] e problemas com a oxidação electrocatalítica do NADH, que exigem alto sobrepotencial de oxidação, como já foi discutido [21].

Desta forma, seria muito interessante o desenvolvimento de biossensores NADH-dependentes que pudessem incorporar as novas tecnologias de elaboração de EQM's. Os avanços alcançados empregando-se os novos materiais e as novas técnicas de imobilização de mediadores e enzimas certamente permitirão a elaboração de melhores biossensores, que poderão ser aplicados nos mais diversos fins, como para a detecção do etanol em diferentes tipos de amostras.



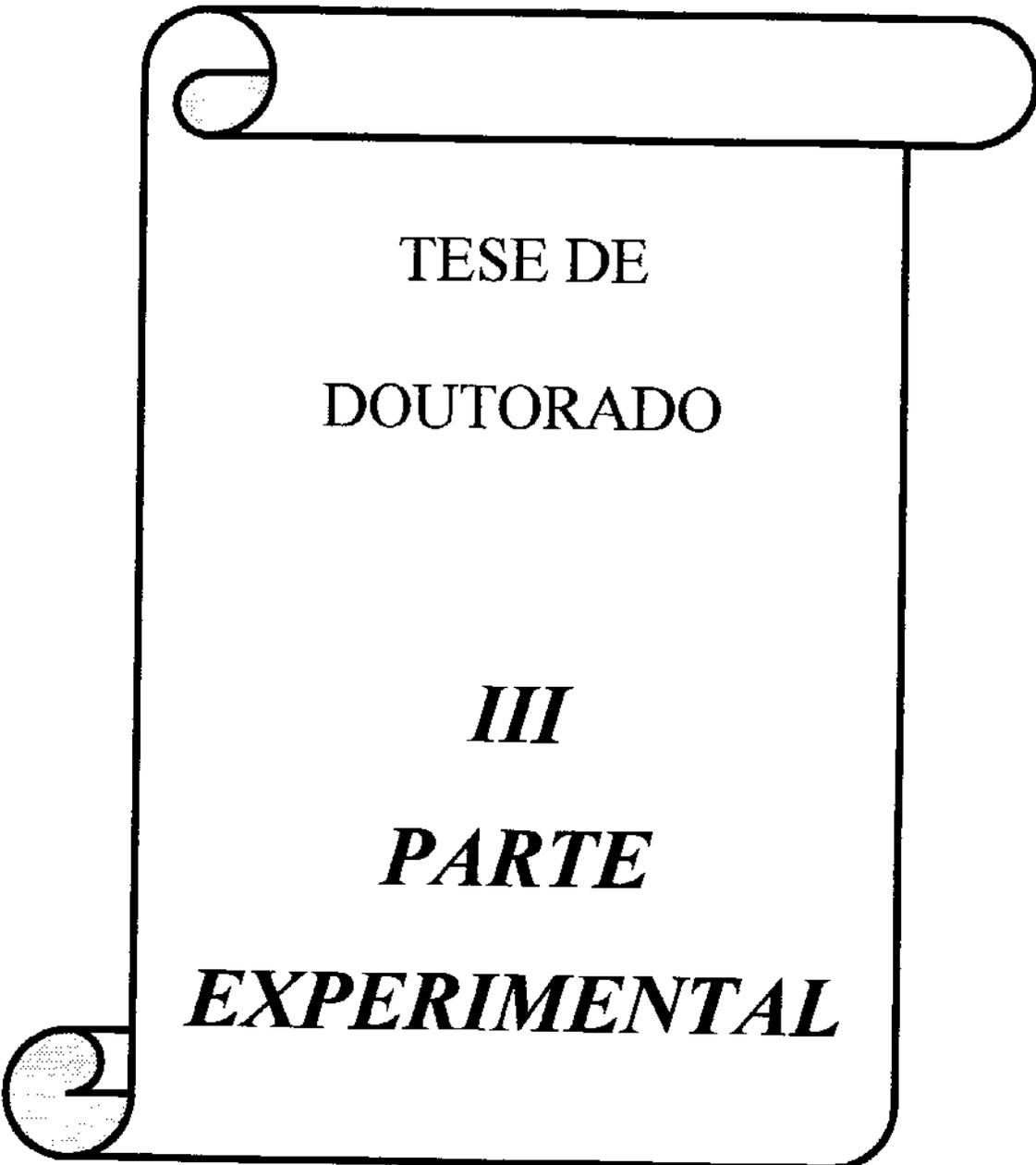
TESE DE
DOUTORADO

II
OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

O projeto teve como finalidade o desenvolvimento de um biossensor para álcool com elevada sensibilidade, seletividade e estabilidade. Para que estes objetivos fossem alcançados fez-se necessário o estudo do comportamento eletroquímico e eletrocatalítico de alguns mediadores de elétrons imobilizados sobre a matriz de $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$, bem como o emprego da enzima álcool desidrogenase (NADH dependente) na elaboração de um biossensor enzimático a base de pasta de carbono. Desta forma, o projeto teve os seguintes objetivos:

- i) Promover a modificação da sílica gel com óxido de nióbio.
- ii) Estudar o comportamento eletroquímico dos sensores a base de Azul de Meldola (AM), Azul do Nilo (AN) e Azul de Toluidina (AT) adsorvidos na matriz de sílica nióbio e misturados em pasta de carbono.
- iii) Estudar a oxidação eletrocatalítica do NADH, usando os eletrodos modificados.
- iv) Determinar os parâmetros cinéticos da oxidação eletrocatalítica do NADH frente a estes sensores, usando eletrodo de disco rotatório.
- v) Desenvolver um biossensor empregando a enzima álcool desidrogenase.
- vi) Realizar os estudos de otimização do biossensor.
- vii) Aplicar o biossensor em amostras de bebidas alcoólicas, como por exemplo, uísque, cerveja, vinho, tequila, etc.



TESE DE
DOUTORADO

III
PARTE
EXPERIMENTAL

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Reagentes Utilizados

- Sílica gel (Fluka) com diâmetro médio dos poros de 6 nm; área superficial específica de $520 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e com tamanho de partículas entre 0,05 e 0,2 mm, previamente ativada a $150 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 2 horas.
- Pó de grafite 99,9% (BDH).
- Óleo mineral (Aldrich).
- Pentacloroeto de Nióbio (Aldrich).
- Azul de Meldola (Sigma).
- Azul do Nilo (Aldrich).
- Azul de Toluidina (Aldrich).
- Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida, NADH (Sigma).
- Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada, NAD^+ (Sigma).
- (N-[2-hidroxietil] Piperazina-N,N'-bi[2-Ácido etanossulfônico]), Hepes (Sigma).
- Piperazina-N,N'-bi[2-Ácido etanossulfônico], Pipes (Sigma).
- Hidroximetil Amino Metano, Tris (Nuclear).
- Albumina de soro bovino, BSA (Sigma).
- Álcool desidrogenase, ADH (EC 1.1.1.1), 356 U/mg (Sigma).
- Glutaraldeído (Sigma).
- Os demais reagentes usados foram de grau analítico.

III.2. Modificação da Superfície da Sílica Gel com Óxido de Nióbio

Para esta modificação 22 g de NbCl_5 (0,081 mol) foram lentamente dissolvidos em 40 mL de etanol anidro, em seguida foram adicionados 300 mL de tetracloreto de carbono a esta solução. Após esta etapa, foram adicionados cerca de 50 g de sílica previamente ativada e a mistura resultante foi refluxada por 20 horas sob agitação constante [135].

O produto da reação foi filtrado, lavado com tetracloreto de carbono e etanol

anidro e, então, seco por 5 h à temperatura de 140 °C. O material seco foi imerso em água bidestilada por várias horas. O produto final, denominado **SN**, foi então seco a temperatura de 100 °C, por quatro horas.

III.3. Adsorção do Mediador na Sílica Modificada

Após a modificação da sílica gel, partiu-se para a adsorção dos corantes orgânicos (mediadores de elétrons) na superfície de SN. Para tanto, 500 mg de SN foram adicionados a 20 mL de uma solução aquosa 0,1% (m/V) do mediador desejado, permanecendo em contato durante 3 horas sob agitação periódica. Após este período, a sílica nióbio adsorvida com o mediador foi exaustivamente lavada com água destilada e seca à temperatura ambiente. O produto desta reação foi denominado de **SNAM**, **SNAN** e **SNAT**, respectivamente para a sílica nióbio adsorvida com AM, AN e AT.

III.4. Caracterização do Material

A quantificação de nióbio suportado na superfície da sílica gel foi determinada através da técnica de fluorescência de raio-X, utilizando um Espectrômetro Spectrace - 5000.

A área superficial da sílica gel modificada foi determinada pelo método BET de multipontos, usando um Micromeritics FlowSorb II 2300. A quantificação do mediador adsorvido na superfície da sílica modificada foi determinada por análise elementar, usando um Analisador Elementar Perkin Elmer-2400

III.5. Construção do Eletrodo de Trabalho

O eletrodo de trabalho utilizado foi construído no próprio laboratório de pesquisa. Este dispositivo é basicamente um tubo de vidro de 15 cm de comprimento contendo uma cavidade inferior com 4 mm de diâmetro interno e 1 mm de profundidade (**Figura III.1**). Esta cavidade possui uma placa de Pt

localizada na extremidade superior a qual está ligada a um fio de níquel/crômio responsável pelo contato elétrico do eletrodo. Nesta cavidade é depositada a pasta de carbono modificada conforme descrito abaixo:

Toma-se 10 mg de SN adsorvida com o mediador desejado e 10 mg de grafite em pó, misturando-os por aproximadamente 15 minutos; após esta etapa adicionam-se gotas de óleo mineral, misturando-os até completa homogeneização e formação de uma pasta consistente. Esta pasta é colocada na cavidade inferior do tubo de vidro representado na Figura 1, obtendo-se desta forma o eletrodo de pasta de carbono modificado, EPC/SNAM, EPC/SNAN e EPC/SNAT, respectivamente para AM, AN e AT.

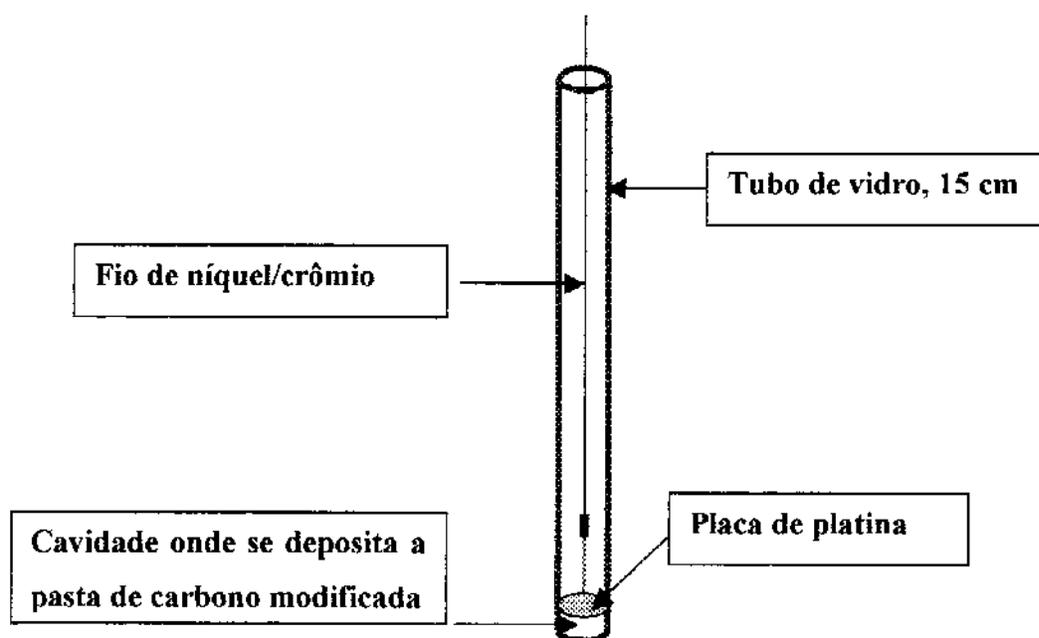


Figura III.1. Eletrodo de trabalho construído no laboratório

III.6. Medidas Eletroquímicas

III.6.1. Medidas Usando Eletrodo de Trabalho Estático

As medidas eletroquímicas estáticas foram realizadas num potenciostato modelo PGSTAT10 da Autolab com o emprego de uma célula eletroquímica de 3

eletrodos (**Figura III.2**). O eletrodo saturado de calomelano é empregado como referência, uma espiral de fio de platina como o eletrodo auxiliar e o dispositivo descrito no item III.5 como eletrodo de trabalho.

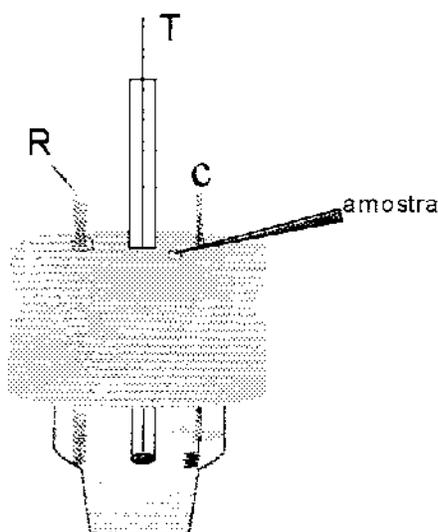


Figura III.2. Representação da célula eletroquímica utilizada nos experimentos, sendo (R) o eletrodo de referência, (T) o eletrodo de trabalho e (C) o eletrodo auxiliar.

III.6.2. Medidas Eletroquímicas Utilizando EDR

Para a realização das medidas visando o estudo cinético do processo electrocatalítico do NADH envolvendo variação da velocidade de rotação do eletrodo, foi empregado um eletrodo de disco rotatório (EDR), conforme representado na **Figura III.3**.

Este eletrodo foi construído na oficina mecânica do Instituto de Química da UNICAMP, sendo constituído de um bastão de PVC cilíndrico de 13 mm de diâmetro, contendo uma cavidade na parte inferior com fundo de grafite pirolítico, que por sua vez é ligado internamente à parte superior do tubo por uma mola de metal. Esta parte superior metálica faz contato elétrico e mecânico com o sistema rotatório do aparelho, prendendo-se por um parafuso lateral. Este eletrodo foi acoplado a um aparelho de rotação controlada, modelo 101 Industrial da Pine Instrument Company.

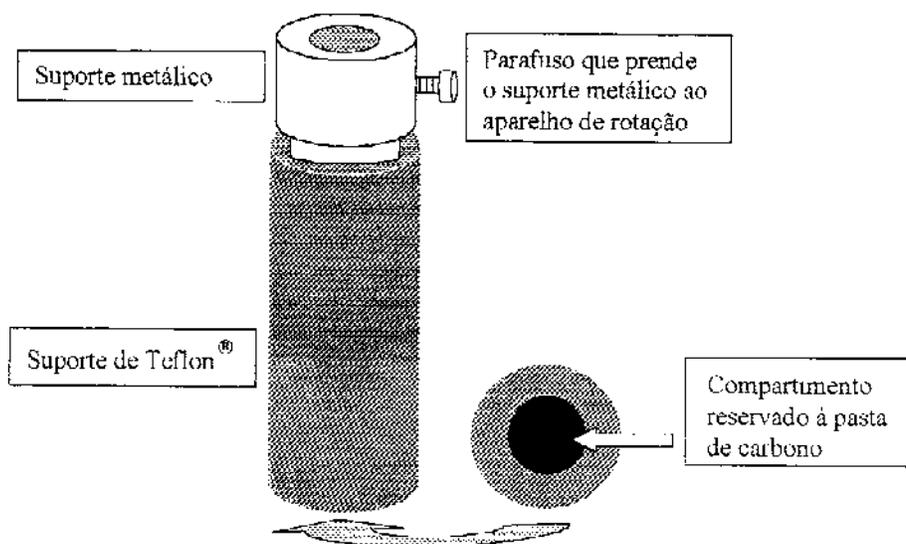


Figura III.3. Representação do eletrodo de trabalho empregado nos experimentos para a determinação dos parâmetros cinéticos da eletrocatalise do NADH.

III.7. Desenvolvimento e Otimização de um Biossensor para Álcool

III.7.1. Determinação da Atividade da Enzima ADH

Para a determinação da atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH), utilizou-se o método espectrofotométrico. Curvas de absorbância em função do tempo e da concentração de álcool foram registradas usando um espectrofotômetro UV/Visível da Pharmacia Biotech (Ultrospec 2000), provido de unidade de controle de temperatura. Para este experimento foram utilizadas cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico e 3,0 mL de solução.

Com os dados obtidos destes experimentos, foi construído o gráfico de Lineweaver-Burk do duplo recíproco [111], para calcular a atividade da enzima em estudo. O parâmetro monitorado na determinação espectrofotométrica da atividade da enzima foi a intensidade de luz absorvida a 340 nm, que é o λ de máxima adsorção do NADH formado durante o ensaio descrito a seguir.

Para a realização deste experimento foram misturados na cela espectrofotométrica 1,00 mL de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $0,01$

mol L⁻¹ NAD⁺, 1,50 mL de solução contendo 2,5 10⁻³ g de enzima e 500 µL de solução contendo o álcool. todas as soluções foram feitas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0. Neste estudo a concentração de álcool na cela esteve na faixa entre 3 10⁻⁴ e 8 10⁻⁴ mol L⁻¹.

III.7.2. Imobilização da Enzima e Construção do Biossensor

A enzima álcool desidrogenase, ADH, foi imobilizada na superfície do grafite em pó por adsorção. Para tanto, em 20 mg de grafite em pó os reagentes, dissolvidos em solução tampão fosfato pH 8, foram adicionados na seguinte ordem: 5 µL de glutaraldeído 5 % (v/v); 80 µL de solução contendo 2 mg de NAD⁺; 80 µL de solução contendo 1 mg de albumina de soro bovino, BSA, e 100 µL de solução aquosa contendo 1 mg de ADH. Esta mistura foi agitada mecanicamente por 15 minutos e seca na geladeira por aproximadamente 15 h.

Após a etapa de imobilização da enzima, adicionaram-se ao composto obtido 20 mg de SNAM e 30 µL de óleo mineral, misturando-os até completa homogeneização da pasta resultante a qual foi depositada na cavidade inferior do dispositivo representado na **Figura III.1**, obtendo-se o biossensor de trabalho.

III.7.3. Avaliação e Otimização do Biossensor para Álcool

Inicialmente o próprio procedimento de imobilização da enzima exigiu grande atenção, pois a ordem de adição dos reagentes resultou em respostas diferentes do biossensor. Portanto, nesta primeira fase é importante que cada reagente seja adicionado isoladamente e de preferência na ordem apresentada no item anterior. Quanto à quantidade de óleo mineral adicionado na pasta, também exigiu muita observação, pois quantidades menores desse reagente resultaram em um aumento de ruído do sistema e uma quantidade muito grande dificultou a reação na interface eletrodo-solução.

O comportamento do sistema foi estudado através de técnicas eletroquímicas, principalmente a cronoamperometria. Alguns fatores que

influenciam a resposta do biossensor foram avaliados, tais como: a composição da solução tampão, o potencial aplicado, o pH da solução, a quantidade de NAD^+ e a quantidade de enzima, entre outros fatores.

Conhecendo-se as melhores condições de trabalho do biossensor, partiu-se para obtenção da curva concentração versus resposta, a qual fornece informações importantes tais como: sensibilidade, intervalo de resposta linear e limite de detecção.

A calibração do biossensor foi feita pela adição de soluções padrão do analito, medindo-se a resposta de corrente em estado estacionário. Cada experimento foi iniciado com o registro da corrente em função do tempo, num dado potencial aplicado, na presença apenas do tampão até a corrente alcançar um valor constante. Esta corrente é chamada de corrente de fundo ou corrente residual. Neste ponto, o substrato foi adicionado e com o auxílio de um agitador magnético, fez-se a homogeneização da solução por 10 s, após esse tempo registrou-se a variação da corrente em função do tempo.

As respostas foram calculadas comparando-se cada corrente de estado estacionário com a corrente de fundo na ausência de substrato, como mostra a **Figura III.4**. Foram feitas adições sucessivas de substrato, sendo que cada adição corresponde a uma concentração conhecida de álcool, que fornece um valor de Δj . Desta forma, somando-se as variações em densidade de corrente para as demais adições, foram construídos os gráficos de ΔI vs Concentração.

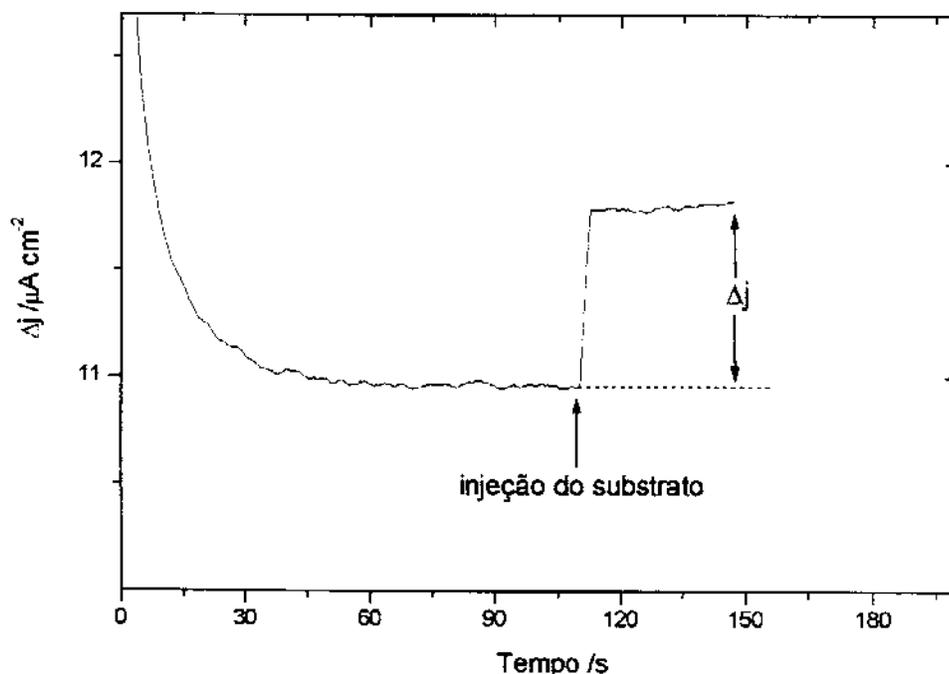


Figura III.4. Gráfico de um cronoamperograma ilustrando como se calcula a resposta do biossensor

III.7.4. Determinação do Tempo de Vida do Biossensor

Para a determinação do tempo de vida do biossensor, realizou-se o monitoramento da resposta do biossensor para álcool, dia após dia, usando sempre o mesmo eletrodo de trabalho.

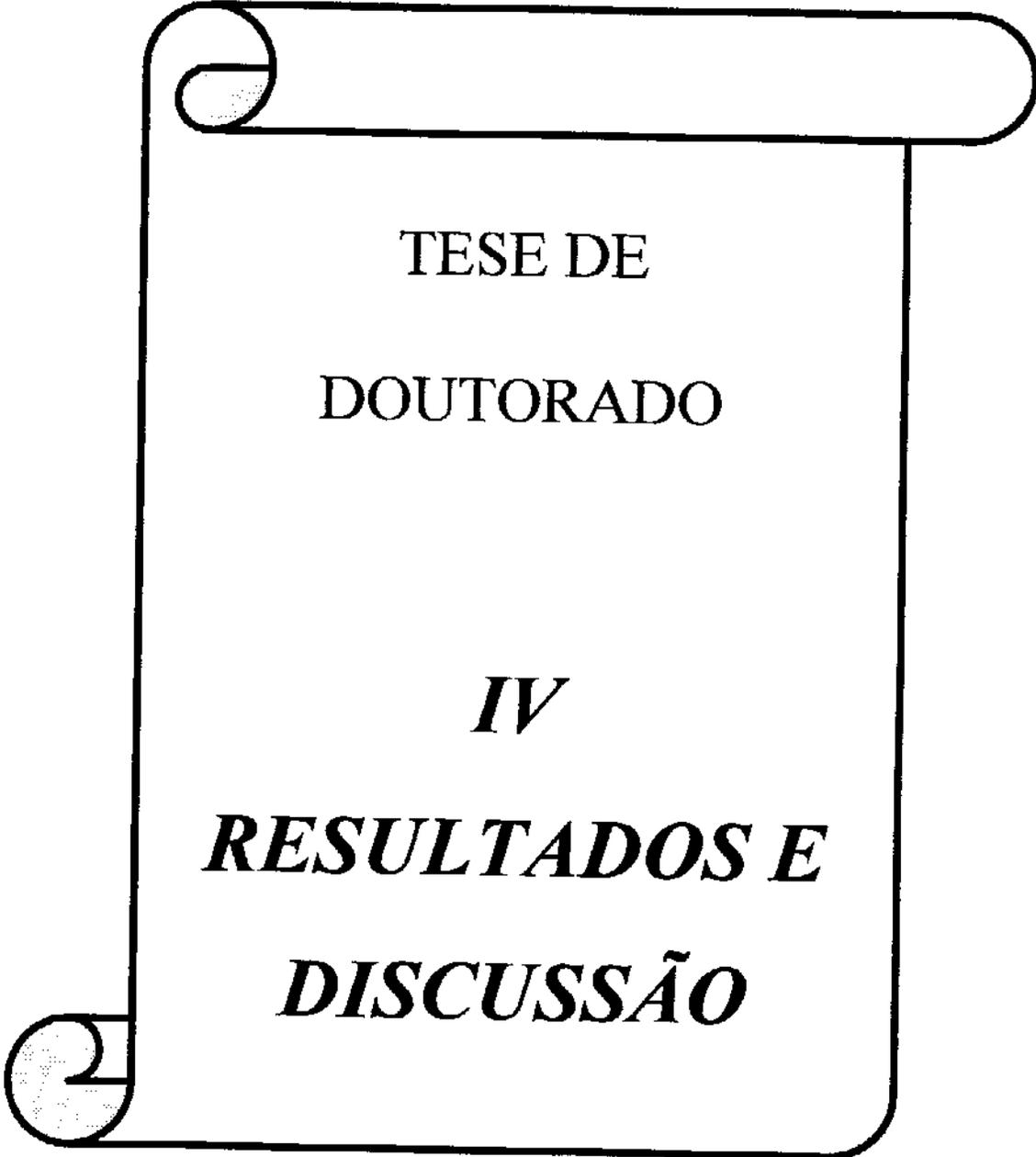
Durante a avaliação do tempo de vida do biossensor, a estocagem foi feita em geladeira a 4 °C, de duas maneiras: ou o biossensor foi estocado a seco ou em contato com uma solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 7,8.

III.7.5. Aplicação do Biossensor em Amostras de Bebidas e Testes de Recuperação.

As análises com amostras de bebidas foram conduzidas da seguinte forma: quando necessário, a amostra era diluída em água para que a concentração de álcool presente estivesse “dentro” da faixa linear de resposta previamente obtida,

e pudesse ser determinada pelo biossensor desenvolvido. Para os cálculos de concentração de álcool nas amostras, utilizou-se a curva analítica obtida com o biossensor nas mesmas condições experimentais.

Os testes de recuperação do biossensor foram realizados da seguinte maneira: em uma célula eletroquímica contendo solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,8, fez-se uma adição de solução padrão de álcool através do qual obteve-se um sinal de corrente proporcional a esta concentração (Δj_1). Em seguida, adicionou-se uma alíquota da amostra em estudo e obteve-se um outro sinal de corrente (Δj_2). Finalmente, fez-se uma nova adição de padrão sobre a amostra, (mesma concentração) e obteve-se o sinal de corrente (Δj_3). O cálculo da recuperação do biossensor para todas as amostras estudadas foi feito através da relação: $(\Delta j_3/\Delta j_1) \times 100$, levando-se em consideração o fator de diluição.



TESE DE
DOUTORADO

IV
RESULTADOS E
DISCUSSÃO

IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1. Caracterização do Material

A modificação da superfície da sílica gel com óxido de nióbio seguiu procedimento descrito na literatura [135]. Nesta reação, o pentacloreto de nióbio foi dissolvido em álcool etílico, pois o mesmo não é solúvel em tetracloreto de carbono usado como solvente da reação.

A quantidade de óxido de nióbio imobilizado na superfície da sílica gel foi de 1,4 mmol Nb/g de material. Esta quantidade é elevada quando comparada com outros resultados disponíveis na literatura [135].

Após a modificação da superfície da sílica gel ocorreu uma pequena diminuição na área superficial da sílica, pois inicialmente a área era de $520 \pm 8 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e, posteriormente, passou para $496 \pm 7 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Esse efeito é atribuído à coalescência de alguns poros ou o bloqueio dos poros menores durante a reação de modificação da sílica gel [136].

A quantidade de mediadores de elétrons imobilizados na superfície de SN foi determinada por análise elementar, obtendo-se 55, 48 e 59 $\mu\text{mol/g}$ de sílica, respectivamente para Azul de Meldola, Azul do Nilo e Azul de Toluidina. Estes valores são semelhantes a outros sistemas similares descritos na literatura [137].

Uma vez realizada com sucesso a modificação da sílica gel com óxidos de nióbio e a imobilização do mediador na superfície desta sílica modificada, partiu-se para o estudo do comportamento eletroquímico dos eletrodos de pasta de carbono gerados a partir destas matrizes.

IV. 2. Estudo das Propriedades Eletroquímicas dos Sensores Desenvolvidos

Os estudos das propriedades eletroquímicas dos sensores foram conduzidos empregando o eletrodo de pasta de carbono modificado com a matriz de SN imobilizada com o corante orgânico. Este procedimento deu origem a três

sensores, EPC/SNAM, EPC/SNAN e EPC/SNAT, respectivamente quando Azul de Meldola, Azul do Nilo e Azul de Toluidina foi adsorvido na matriz de SN.

A **Figura IV.1(A)** mostra o voltamograma cíclico do EPC/SN, sendo que nenhum pico de corrente foi observado, enquanto na **Figura IV.1(B)** o voltamograma cíclico do EPC/SNAM apresenta um par redox do mediador adsorvido com potencial médio (E_m) de - 50 mV vs ECS ($E_m=(E_{pa} + E_{pc})/2$), onde E_{pa} é o potencial de pico anódico e E_{pc} é o potencial de pico catódico [138].

Comparando o potencial médio do AM neste sistema com o do AM livre em solução, -120 mV vs ECS, observa-se um deslocamento de 70 mV para valor mais positivo [76]. Este comportamento pode ser atribuído à interação da matriz de SN e o AM, estabilizando a forma reduzida do mediador.

Uma explicação para este fenômeno é que a matriz de SN tem considerável acidez, o que proporciona melhores interações com centros básicos, por isso a maior interação com a forma reduzida (mais básico que a forma oxidada), estabilizando-a devido às interações ácido-base [139]. Como consequência deste comportamento, para que ocorra a oxidação das espécies reduzidas (mais estáveis), é preciso que se aplique um potencial de oxidação maior, deslocando o potencial formal do par redox para valor mais positivo.

Similar comportamento foi verificado para fenoxazinas, fenotiazinas e fenazinas adsorvidas sobre fosfato de zircônio [36] e fosfato de titânio [140].

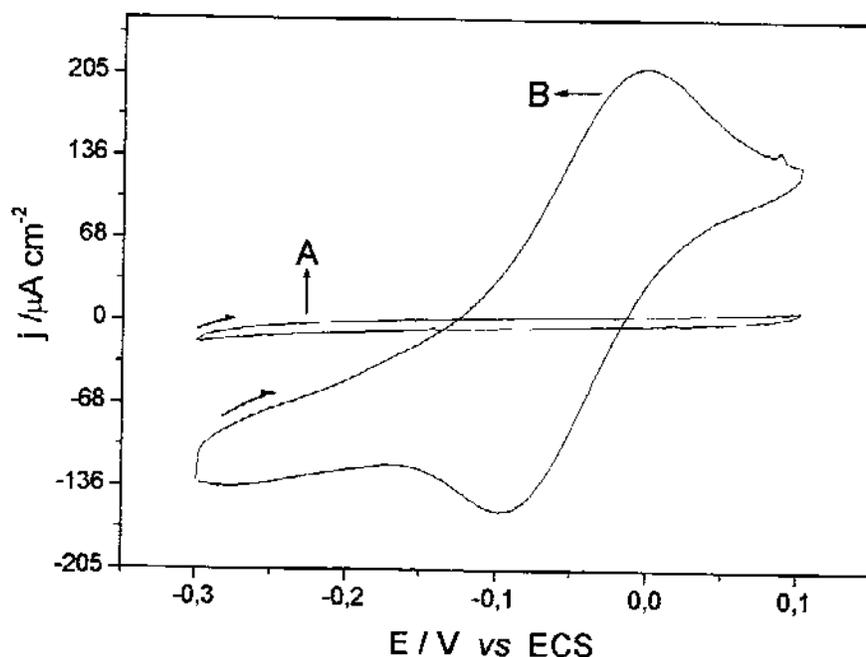


Figura IV.1. Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC/SN (A) e EPC/SNAM (B), usando solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

Na Figura IV.2(B), referente ao experimento realizado com o sensor EPC/SNAN, observa-se claramente o processo redox do mediador AN adsorvido na matriz de SN através das correntes de pico anódico e catódico. Este sistema apresenta um potencial médio próximo de -230 mV vs ECS . Comparando este valor com o potencial médio de -300 mV vs ECS obtido para o Azul do Nilo livre em solução tem-se um deslocamento de 70 mV para valor mais positivo [76]. Este deslocamento no potencial formal para valor mais positivo também sugere maior interação entre a forma reduzida do AN com a matriz ácida de SN.

Quando este experimento foi realizado com o sensor EPC/SNAT, Figura IV.3(B), o potencial formal foi observado em -98 mV vs ECS . Este valor é 112 mV mais positivo comparando ao potencial formal do AT livre em solução, -210 mV vs ECS [76]. Nota-se também um deslocamento do potencial formal quando comparado ao AT incorporado em pasta de carbono, -200 mV vs ECS [37].

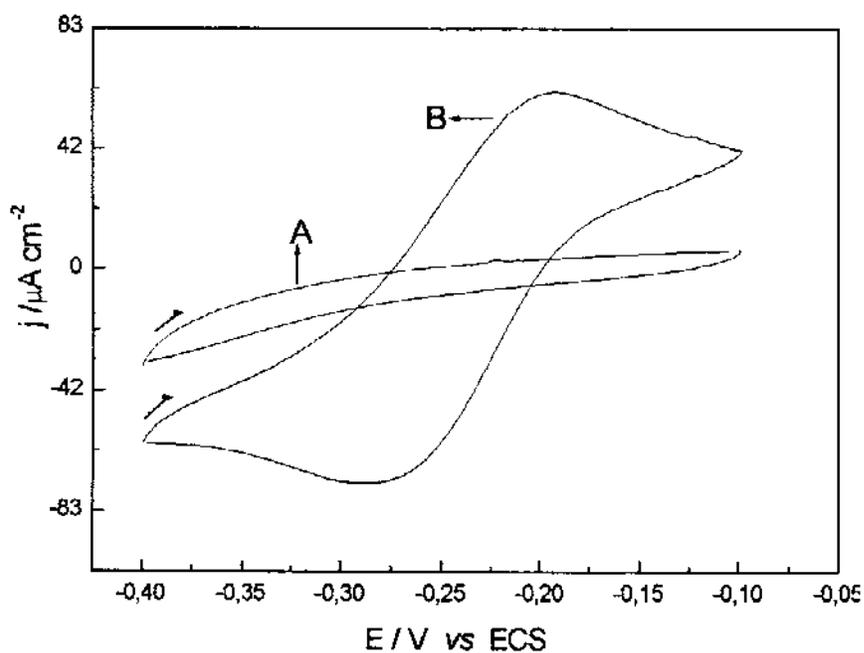


Figura IV.2. Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC/SN (A) e EPC/SNAN (B), usando solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

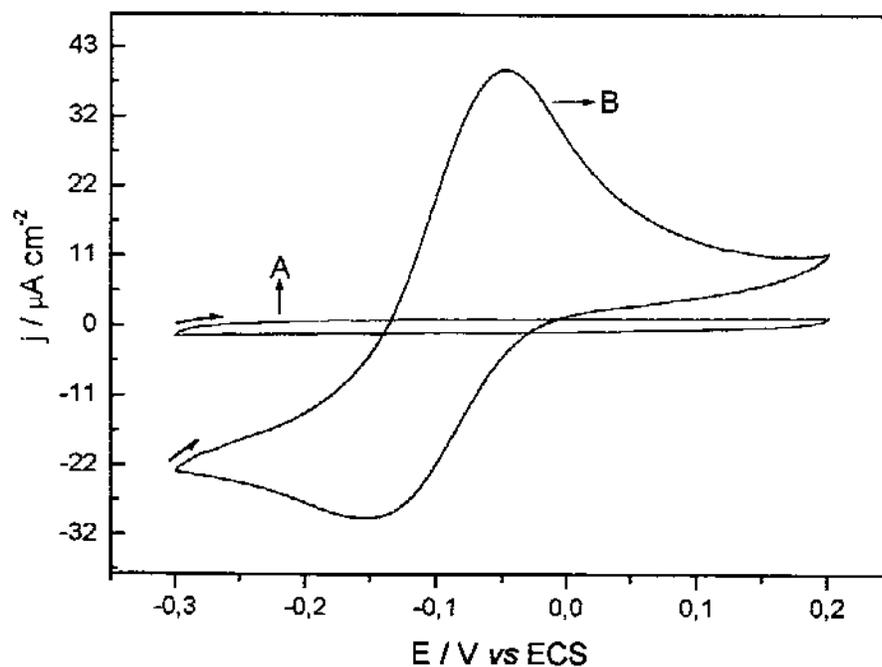


Figura IV.3. Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC/SN (A) e EPS/SNAT (B), usando solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

Com relação ao deslocamento do potencial formal apresentado por estes sensores, sabe-se que o potencial está relacionado com a diferença da força de interação entre as espécies reduzidas e oxidadas com a matriz do eletrodo [21].

Geralmente as matrizes interagem por suas propriedades ácido-base, o que leva a distinção entre as espécies reduzidas e oxidadas do mediador imobilizado. As espécies oxidadas interagem mais fortemente com superfícies de eletrodos mais básicas uma vez que são centros ácidos, estabilizando-se. Isto as torna mais difícil de serem reduzidas, exigindo maior potencial de redução e, conseqüentemente, deslocando o potencial formal para valor mais negativos.

No caso das espécies reduzidas, a interação é mais forte com matrizes ou centros mais ácidos, como no caso da matriz de SN, estabilizando as formas reduzidas, que passa a exigir maior potencial de oxidação, o que provoca o deslocamento do potencial formal para valor mais positivo.

De qualquer forma, este comportamento apresentado por estes sensores já demonstra que a matriz de sílica modificada não participa apenas como suporte de imobilização dos corantes orgânicos, mas também influencia diretamente na estabilização das ligações envolvidas na superfície do material. O deslocamento no potencial será muito importante no desenvolvimento futuro destes sensores, pois a possibilidade de aplicação de baixos potenciais amplia sua aplicabilidade, na medida em que se reduz possíveis interferentes e reações secundárias comuns em sistemas com alto potencial de operação.

Os sensores também foram avaliados para verificar o comportamento de adsorção do mediador na matriz SN em função da concentração da solução do corante orgânico, AM, AN e AT durante o processo de adsorção. Este experimento teve como objetivo determinar a capacidade máxima de adsorção da matriz de SN para cada mediador.

A **Figura IV.4** apresenta as curvas construídas através da determinação do Γ em função da concentração da solução do corante usado durante o processo de adsorção do mediador na matriz de SN, sendo Γ a cobertura do mediador na superfície do eletrodo expressa em mol cm⁻². O valor de Γ é avaliado pela

integração da área do pico anódico ou catódico do voltamograma cíclico obtido em baixa velocidade de varredura, ($\Gamma = Q/nFA$).

Neste experimento, observa-se que, em concentrações maiores que $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, a cobertura alcança um máximo e permanece praticamente constante para todos os sensores avaliados. Desta forma, a adsorção dos mediadores na sílica modificada foi realizada em solução do corante orgânico em concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

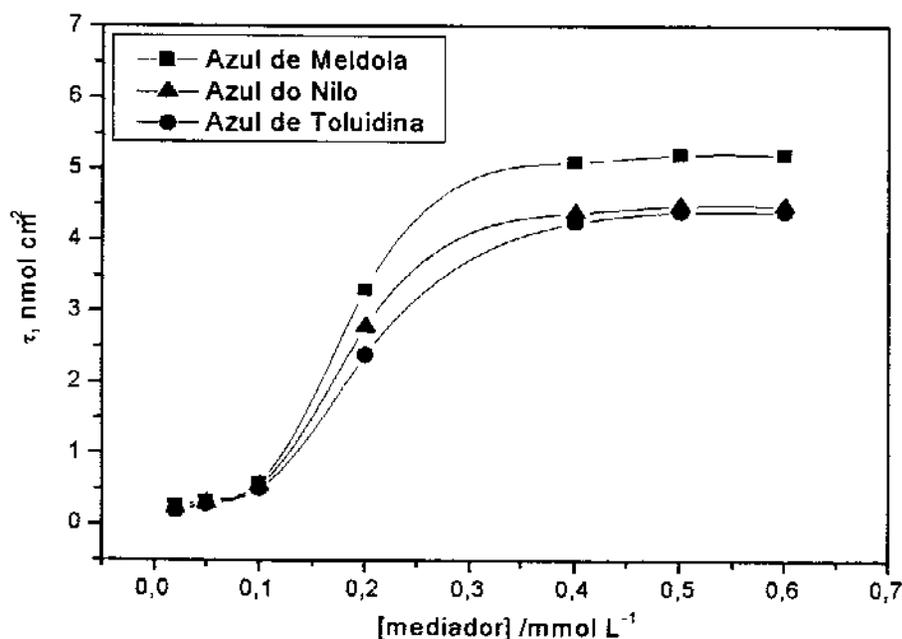


Figura IV.4. Cobertura eletroquímica obtida com os sensores EPC/SNAM, EPC/SNAN e EPC/SNAT, preparados a partir de SN contendo o mediador adsorvido em solução de diferentes concentrações. O experimento realizado em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1}

Uma vez comprovado que o sistema empregando eletrodo de pasta de carbono modificado promove um ambiente eficiente para o processo redox dos mediadores presentes, prosseguiu-se com os estudos para verificar a reversibilidade e o comportamento da transferência de elétrons destes sensores.

A Tabela IV.1 apresenta os valores de separação de picos, ΔE_p , dos sensores desenvolvidos usando soluções de diferentes eletrólitos de suporte.

Nota-se que os valores são pequenos, 70, 85 e 100 mV vs ECS em solução de KCl 0,5 mol L⁻¹, respectivamente para os sensores EPC/SNAM, EPC/SNAN e EPC/SNAT.

Os picos de oxidação e redução não são imagem um do outro, em contraste ao proposto teoricamente para processo redox de espécies adsorvidas [141]. Este comportamento indica que a transferência de elétrons não é totalmente reversível, apresentando pequena resistência do material empregado nos sensores.

Comportamento desta natureza pode ser explicado pela dificuldade dos eletrólitos de suporte em se difundirem através da superfície do eletrodo para manter a eletroneutralidade do sistema ou a resistência da própria pasta.

Tabela IV.1. Separação de pico anódico e catódico ΔE_p (mV) obtidos em diferentes eletrólitos de suporte. Experimento realizado em velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, concentração de 0,5 mol L⁻¹ e pH 7,0.

	LiCl	KCl	BaCl ₂	CaCl ₂	NaCl	NaNO ₃	Na ₂ SO ₄	NaClO ₄
EPC/SNAM	75	70	70	75	65	65	65	65
EPC/SNAN	85	85	85	90	95	93	91	95
EPC/SNAT	100	100	110	110	105	110	110	110

O efeito do eletrólito de suporte também foi estudado em relação ao potencial formal, **Tabela IV.2.** Neste estudo, verifica-se que o potencial formal não sofre nenhum efeito dos diferentes eletrólitos de suporte empregados, exceto para perclorato, que apresenta valores ligeiramente superiores. Este comportamento observado para o perclorato é atribuído à grande afinidade do íon perclorato ao nitrogênio de aminas quaternárias [142].

Como o KCl foi o eletrólito de suporte que apresentou os melhores resultados, tanto para separação de picos como para potencial formal, optou-se por utilizá-lo nos demais experimentos realizados para verificar o comportamento eletroquímicos deste sensores.

Tabela IV.2. Potencial médio, E_m , em mV obtido com os sensores em diferentes eletrólitos suportes. Experimento realizado em velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} , concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0

	LiCl	KCl	BaCl ₂	CaCl ₂	NaCl	NaNO ₃	Na ₂ SO ₄	NaClO ₄
ECS/SNAM	-60	-50	-55	-55	-60	-70	-70	-90
ECS/SNAN	-245	-230	-240	-240	-235	-240	-245	-265
ECS/SNAT	-98	-98	-100	-100	-100	-105	-105	-120

Outro aspecto importante relacionado ao comportamento eletroquímico destes sensores foi o estudo da influência da concentração do eletrólito suporte no processo redox dos mediadores imobilizados. Os dados apresentados pela **Tabela IV.3** sugerem que acima de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a concentração não afeta o processo redox, pois não houve variação considerável no potencial formal nem na separação de picos. O nível de corrente também não varia acima desta concentração.

Este comportamento comprova a boa mobilidade dos íons para manter a eletroneutralidade na superfície do eletrodo. Contudo, como já visto, o processo redox não é totalmente reversível; certamente, a resistência da pasta de carbono deve contribuir para este comportamento. Para valores inferiores a $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ percebe-se que há um comprometimento na transferência de elétrons do sistema, podendo ser atribuída à carência de transportadores de carga para manter a eletroneutralidade na superfície do eletrodo.

Tabela IV.3. Influência da concentração da solução do eletrólito de suporte no processo redox dos sensores. Experimento em solução de KCl 0,5 mol L⁻¹ pH 7,0 e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹

Concentração	ΔE_p (mV)			E_m (mV)		
	EPC/SNAM	EPC/SNAN	EPC/SNAT	EPC/SNAM	EPC/SNAN	EPC/SNAT
0,10 mol L ⁻¹	110	110	120	-62	-240	-115
0,25 mol L ⁻¹	70	85	100	-50	-230	-98
0,50 mol L ⁻¹	70	85	100	-50	-230	-98
0,75 mol L ⁻¹	70	85	100	-50	-230	-98
1,00 mol L ⁻¹	70	85	100	-50	-230	-98

Dada a eficiência das pastas em proporcionar um bom ambiente para o processo redox dos mediadores adsorvidos na superfície da matriz de SN, foi realizado experimento para verificar a eficiência da imobilização do mediador.

Pela **Tabela IV.4**, percebe-se que mesmo após sucessivos ciclos voltamétricos à velocidade de 10 mV s⁻¹ ou uso contínuo por várias horas, o nível de corrente permaneceu praticamente constante, comprovando que o mediador não sofre lixiviação da superfície do eletrodo. Esta estabilidade é fundamental em aplicações analíticas destes sensores.

Tabela IV.4. Corrente de pico anódico ($\mu A cm^2$) após sucessivos voltamogramas, obtida para os diferentes sensores. Experimento realizado em solução de KCl 0,5 mol L⁻¹ pH 7,0 e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹.

Ciclos	5	10	20	40	60	80	100
EPC/SNAM	200,1	200,1	200,0	200,1	200,1	200,0	200,1
EPC/SNAN	65,5	65,4	65,4	65,3	65,3	65,3	65,3
EPC/SNAT	39,8	39,8	39,9	39,8	39,9	39,8	39,8

Outro importante aspecto destes sensores é a correlação linear entre a corrente de pico anódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura, na faixa de 5 a 200 mV s⁻¹, **Figura IV.5**. Este comportamento é similar a processos

controlados por difusão [143]. No entanto, como o mediador está fortemente adsorvido na matriz de SN, certamente é a difusão dos íons do eletrólito suporte que mantém a eletroneutralidade na superfície do eletrodo. Este tipo de comportamento é freqüentemente observado quando materiais inorgânicos, como sílica ou fosfato de zircônio são usados em misturas com pasta de carbono [144].

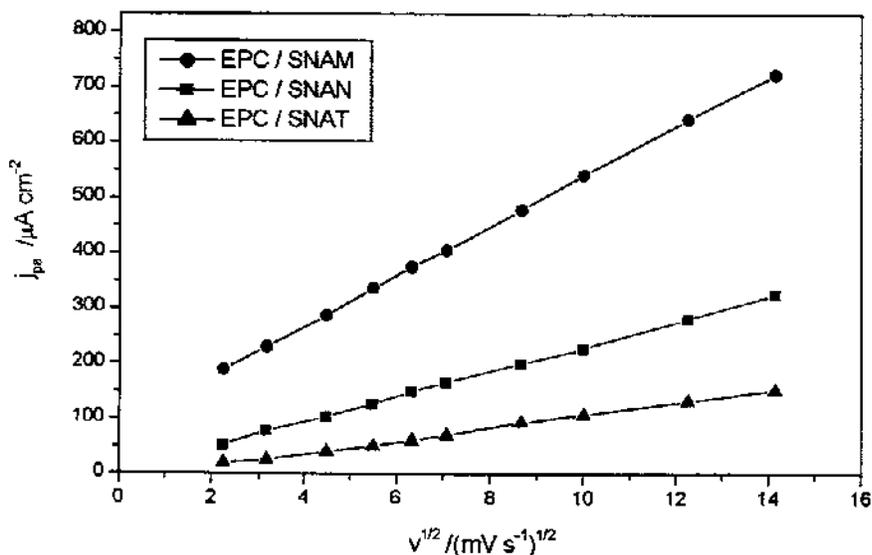


Figura IV.5. Dependência da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura obtida para os diferentes sensores. Experimento em solução de KCl 0,5 mol L⁻¹ pH 7,0.

O estudo do comportamento do potencial médio e da separação de picos também foi realizado em função da variação do pH da solução. Pela Tabela IV.5, observa-se que os valores de E_m e o ΔE_p dos mediadores adsorvidos na matriz de SN não variaram com o pH da solução entre 5 e 8. Este comportamento é atribuído ao efeito protetor da matriz de SN, minimizando o efeito do próton sobre o mediador adsorvido.

Contudo, para valores de pH menores que 4, um deslocamento do potencial formal para valores mais positivos é observado. Isto mostra que o efeito de proteção da matriz não consegue atuar em altas concentrações de H⁺. Este comportamento dos sensores em função do pH da solução é muito atrativo em relação a aspectos práticos e estudos de mecanismo de reação entre o NADH e o mediador adsorvido em SN.

A eliminação da influência do H^+ na faixa de 5 a 8 durante o processo redox dos mediadores adsorvidos na matriz de SN assegura que o comportamento da eletrooxidação do NADH será afetado somente pelo deslocamento no potencial formal do NADH. Este aspecto é muito importante para verificar o efeito da diferença de potencial eletroquímico na reação entre o NADH e o mediador.

Tabela IV.5. Potencial médio, E_m (mV), e separação dos picos, ΔE_p (mV), em função da variação do pH da solução. Experimento realizado para os sensores desenvolvidos em velocidade de varredura de 10 mV s^{-1}

pH	EPC/SNAM		EPC/SNAN		EPC/SNAT	
	ΔE_p	E_m	ΔE_p	E_m	ΔE_p	E_m
2	60	-25	85	-80	90	-80
3	65	-30	80	-110	90	-85
4	65	-45	80	-190	100	-98
5	65	-50	85	-230	100	-98
6	70	-50	85	-230	105	-98
7	70	-50	85	-230	100	-98
8	65	-50	85	-230	100	-98

Até o momento, conclui-se que a modificação da sílica gel com óxido de nióbio foi muito efetiva e que esta matriz revelou-se bastante eficiente no processo de adsorção dos corantes orgânicos empregados. Isto proporcionou alta estabilidade dos sensores gerados a partir da pasta de carbono incorporando o corante adsorvido na matriz de SN.

O grande deslocamento do potencial formal dos mediadores adsorvidos é um importante aspecto destes sensores, pois este é um fator importante em aspectos práticos que busca a aplicação de baixos potenciais, entre - 100 a 0 mV vs ECS, procurando evitar possíveis interferentes.

Desta forma partiu-se, com grande expectativa, para os estudos do comportamento da eletrocatalise do NADH frente aos sensores desenvolvidos.

IV.3. Estudo da Eletrooxidação do NADH

Fenoxazinas, fenotiazinas e fenazinas são espécies bem conhecidas pela capacidade de eletrocatalisar a oxidação do NADH. Muitas investigações sobre os parâmetros cinéticos envolvidos nesta reação é relatada na literatura [145]. Embora vários mediadores possam ser usados na transferência de elétrons durante a eletrocatalise do NADH, um número restrito destes conseguem efetivamente reduzir o sobrepotencial exigido na eletrooxidação do NADH.

As fenoxazinas e fenotiazinas quando adsorvidas na superfície de matrizes apresentam baixo potencial formal, permitindo a eletrooxidação do NADH em potenciais próximos de zero; também proporcionam alta velocidade de transferência de elétrons na superfície do eletrodo. Contudo, tanto sob o aspecto da capacidade de eletrocatalisar a oxidação do NADH quanto à estabilidade do sistema, pode-se obter melhorias.

Nos sensores apresentados neste projeto, observou-se o deslocamento do potencial formal para valores mais positivos, como também independência do potencial formal com a variação do pH da solução entre 5 e 8, quando os mediadores estão adsorvidos na matriz de SN. Estes aspectos são fatores importantes no emprego destes sensores para promover a eletrocatalise da oxidação do NADH. Por isso, considerou-se a viabilidade de explorar os sensores EPC/SNAM, EPC/SNAN e EPC/SNAT frente à reação de oxidação do NADH.

Para o estudo da eletrocatalise do NADH foram realizados testes para verificar a capacidade dos sensores em eletrocatalisar a oxidação do NADH em solução. Nas **Figuras IV.6(B), IV.7(b) e IV.8(b)**, observa-se claramente o desenvolvimento da corrente catalítica dos sensores na presença de uma solução de $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ de NADH. É importante salientar que, na ausência do mediador o sensor EPC/SN não apresenta qualquer corrente catalítica na presença de solução de NADH.

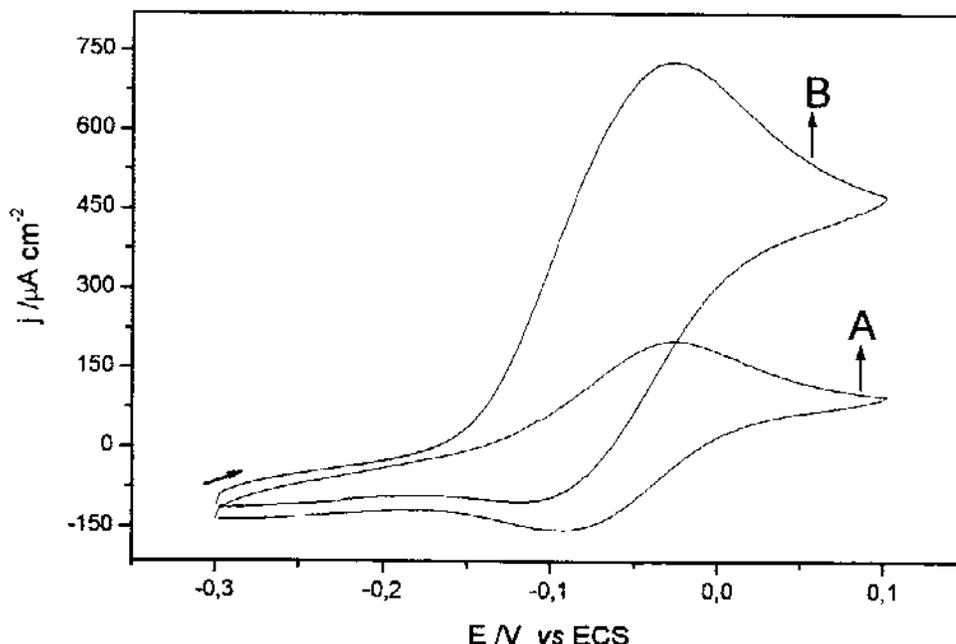


Figura IV.6. Voltamogramas cíclicos obtidos com o EPC/SNAM na ausência (A) e na presença (B) de NADH $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 a velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

Na Figura IV.7, observa-se um deslocamento para potenciais mais negativos no pico de redução do sensor EPC/SNAM. Este comportamento é atribuído à formação de um complexo de transferência de carga intermediário entre o NADH e o AN adsorvido na matriz de SN.

Neste experimento preliminar, percebe-se o bom desempenho do sensor EPC/SNAM, apresentando alta corrente catalítica para a oxidação do NADH em potencial próximo a $0,0 \text{ mV vs ECS}$. Este comportamento é realmente um importante aspecto; no entanto, é necessária uma avaliação mais completa dos sensores para que se possa extrair melhores conclusões.

Esta avaliação minuciosa do sensor só é possível através da realização de vários experimentos frente a parâmetros como: potencial, pH, tampão, curva analítica, cinética de reação, etc. Desta forma, é possível avaliar suas reais perspectivas para o desenvolvimento de biossensores.

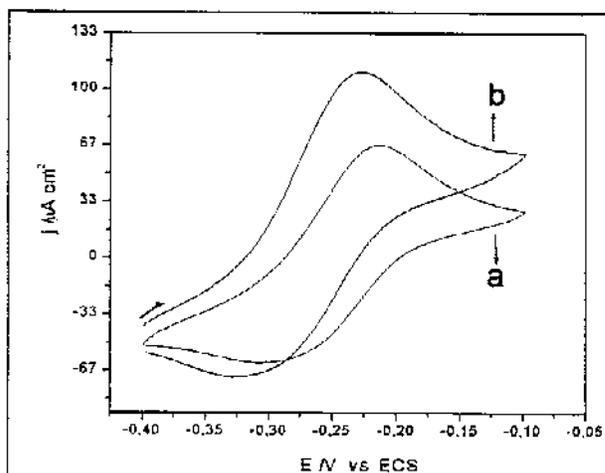


Figura IV.7. Voltamogramas cíclicos obtidos com o EPC/SNAN na ausência (a) e na presença (b) de NADH $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 a velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

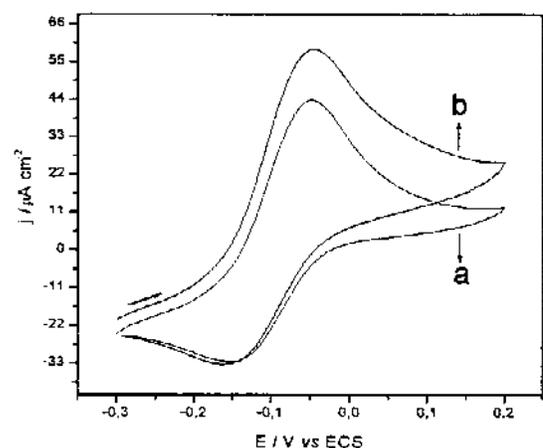


Figura IV.8. Voltamogramas cíclicos obtidos com o EPC/SNAT na ausência (a) e na presença (b) de NADH $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 a velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

Para melhor compreender a capacidade eletrocatalítica de cada sensor, foi realizado experimento utilizando cronoamperometria para avaliar a resposta do eletrodo em função do potencial aplicado. Na **Figura IV.9(A)**, observa-se claramente que a eletrooxidação do NADH, utilizando o sensor EPC/SNAM, começa em -200 mV vs ECS e alcança um máximo em 0 mV vs ECS aproximadamente. Este comportamento indica que o processo eletrocatalítico é bastante eficiente em termos de potencial comparado ao Azul de Meldola adsorvido em grafite [139].

Para o sensor EPC/SNAN (**Figura IV.9(B)**), a eletrooxidação do NADH começa em aproximadamente -350 mV vs ECS e alcança um máximo em -230 mV vs ECS , coincidindo com o E^0 do mediador imobilizado. Este valor é bastante negativo comparado com o potencial de 0 mV vs ECS observado para o AM adsorvido na matriz de SN, mas ainda apresenta boa atividade catalítica para eletrooxidar o NADH.

Quanto à eletrocatalise do NADH frente ao sensor EPC/SNAT (**Figura IV.9 (C)**), ela inicia-se em -200 mV vs SCE e alcança um máximo de resposta em 0 mV vs ECS , situando-se numa faixa intermediária dos sensores anteriores.

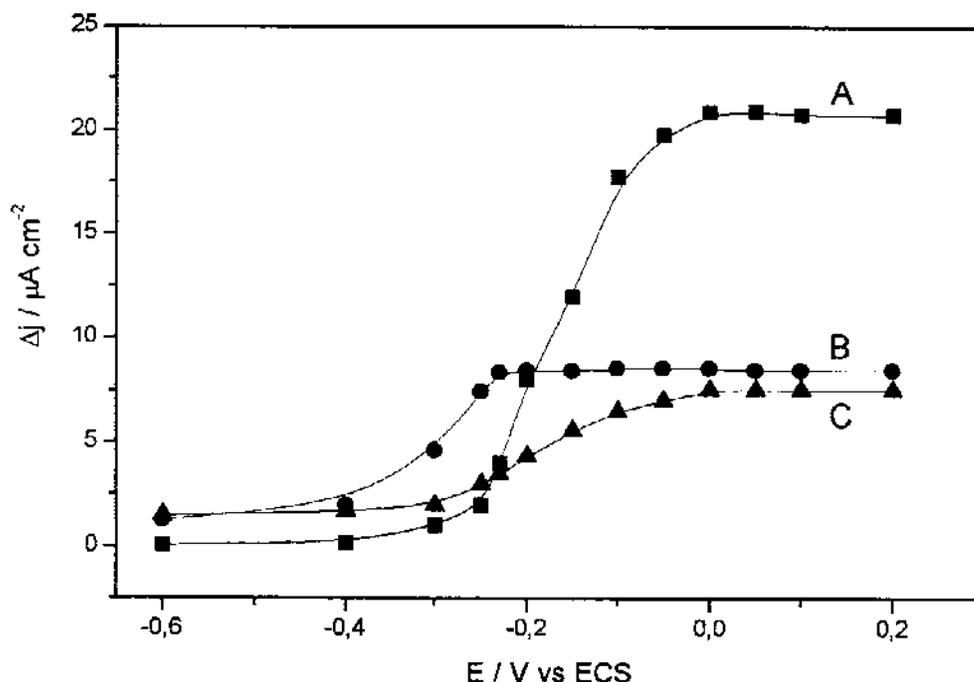


Figura IV.9. Dependência da corrente eletrocatalítica do NADH em função do potencial aplicado, obtida para os sensores EPC/SNAM (A), EPC/SNAN (B) e EPC/SNAT (C). Cada ponto no gráfico contém uma concentração de $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de NADH em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.

A realização de experimentos para verificar a influência do pH da solução na eletrocatalise do NADH é fundamental para obtenção de novas informações sobre o mecanismo desta reação. Observa-se na **Tabela IV.6** que, para um intervalo de pH entre 5 e 8, a resposta dos sensores se manteve praticamente constante, em concordância com a invariância do potencial formal dos mediadores adsorvidos em SN nesta mesma faixa de pH (**Tabela IV.5**).

Este comportamento é interessante, pois um aumento na eletrooxidação é esperado, isto porque o par redox NAD^+/NADH desloca-se 30 mV por unidade de pH para potenciais mais negativos [146], aumentando a diferença de potencial eletroquímico entre o mediador adsorvido e o NADH. A não variação da resposta dos sensores nesta faixa de pH sugere que a matriz ácida de SN afeta a formação do complexo de transferência de carga, minimizando a força do potencial termodinâmico.

Tabela IV.6. Corrente catalítica para a oxidação do NADH ($\Delta j / \mu A cm^2$) em função do pH da solução, empregando os sensores desenvolvidos. Experimento realizado na presença de $5,0 \cdot 10^{-4} mol L^{-1}$ de NADH em meio de KCl $0,5 mol L^{-1}$

pH	EPC/SNAM	EPC/SNAN	EPC/SNAT
5	$19,7 \pm 0,8$	$8,3 \pm 0,4$	$7,1 \pm 0,5$
6	$19,3 \pm 0,7$	$8,3 \pm 0,4$	$7,0 \pm 0,5$
7	$20,0 \pm 0,7$	$8,5 \pm 0,4$	$7,1 \pm 0,5$
8	$20,1 \pm 0,7$	$8,5 \pm 0,4$	$7,1 \pm 0,5$

Experimentos realizados em diferentes soluções de tampão (Tabela IV.7), mostraram que o tampão fosfato apresenta as melhores respostas para todos os sensores utilizados. Este comportamento pode ser explicado devido à formação de um complexo entre o fosfato e o anel piridínico da forma reduzida do NADH, formado um aduto que facilita a oxidação do NADH [147].

Tabela IV.7. Corrente catalítica ($\Delta j / \mu A cm^2$) da eletrooxidação do NADH ($5 \cdot 10^{-4} mol L^{-1}$) em diferentes tampões com concentração de $0,5 mol L^{-1}$ e pH 7,0. Experimento realizado com os sensores EPC/SNAM e EPS/SNAN e EPC/SNAT.

Solução Tampão	EPC/SNAM	EPC/SNAN	EPC/SNAT
Fosfato	20,0	8,4	7,8
Hepes	10,0	7,2	4,6
Pipes	8,5	6,2	4,2
Tris	11,7	7,3	5,7

Após os estudos eletroquímico e eletrocatalítico, partiu-se para a aplicação destes sensores na determinação da concentração de NADH em solução. A corrente catalítica em função da concentração de NADH (curvas analíticas) está representada nas Figuras IV.10, IV.11 e IV.12, respectivamente para EPC/SNAM, EPC/SNAN e EPC/SNAT. Em todos os sensores, obteve-se uma boa correlação linear com ampla faixa de resposta (Tabela IV.8), com destaque para o

EPC/SNAM com faixa linear de $1,0 \cdot 10^{-5}$ a $7,5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, sensibilidade de 48 mA L⁻¹ mol e limite de detecção de $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹.

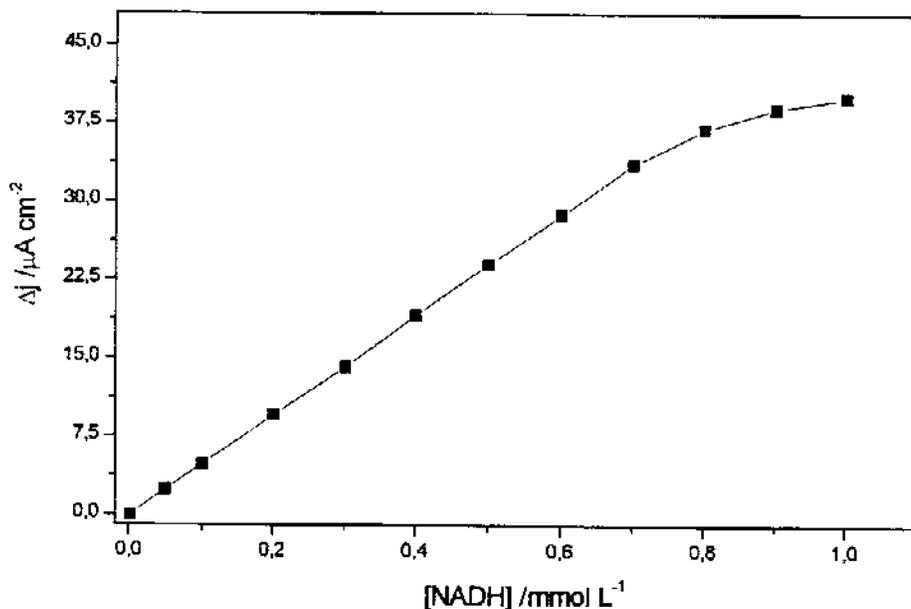


Figura IV.10. Curva analítica obtida com o sensor EPC/SNAM, com potencial aplicado de 0 mV vs ECS em solução tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹ pH 7,0

A curva analítica correspondente ao sensor EPC/SNAN (Figura IV.11), apresenta uma faixa de linearidade um pouco menor que para o sensor anterior, $1,0 \cdot 10^{-5}$ a $4,8 \cdot 10^{-4}$, com sensibilidade de 18 mA mol L⁻¹ e limite de detecção de $8,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹. Estes parâmetros analíticos, associados à grande estabilidade do sistema, também são favoráveis à utilização deste sensor no desenvolvimento de biossensores amperométricos empregando enzima NADH dependente.

A resposta do sensor EPC/SNAT em função da variação da concentração de NADH da solução, gerou a curva da Figura IV.12. Este sensor também apresenta boa faixa de resposta linear, $2,0 \cdot 10^{-4}$ a $4,0 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹, com sensibilidade de $1,4 \mu\text{A L}^{-1}$ mol e limite de detecção de $3,4 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹. Estes parâmetros analíticos obtidos com o sensor EPC/SNAT são bem inferiores aos parâmetros dos sensores EPC/SNAM e EPC/SNAN. Os valores estão em concordância com a literatura se observados em relação à velocidade de transferência de elétrons. Neste aspecto as fenoxazinas (Azul de Meidola e Azul

do Nilo) geralmente apresentam maior velocidade de reação que as fenotiazinas (Azul de Toluidina).

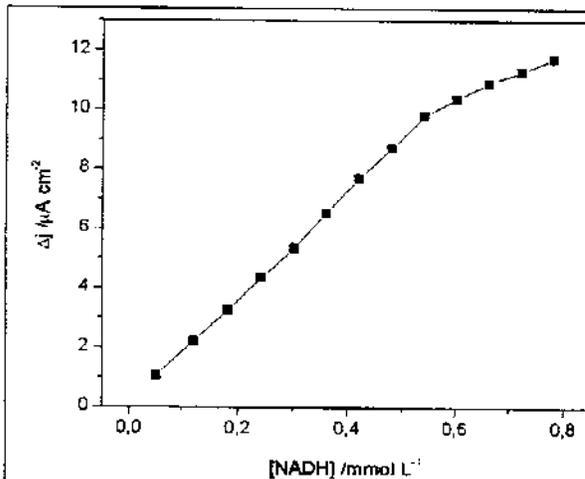


Figura IV.11. Curva analítica obtida com o sensor EPC/SNAN, com potencial aplicado de -200 mV vs ECS em solução tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹ pH 7,0

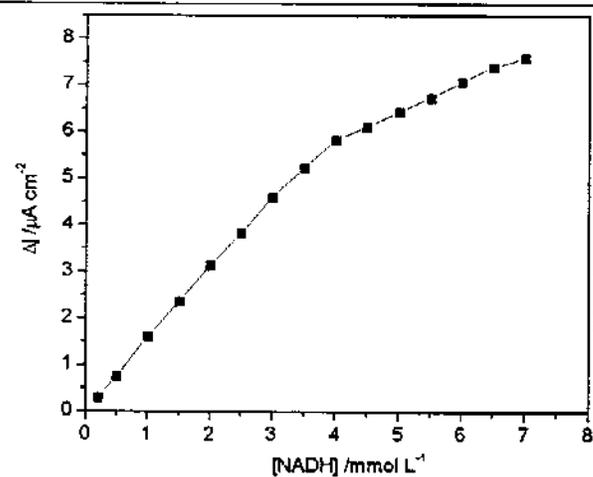


Figura IV.12. Curva analítica obtida com o sensor EPC/SNAT, com potencial aplicado de 0 mV vs ECS em solução tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹ pH 7,0

Outros parâmetros também foram avaliados. O tempo de resposta para todos os sensores desenvolvidos foi de aproximadamente $0,8 \pm 0,2$ s, sendo bastante rápido em se tratando de eletrodos de pasta de carbono. Provavelmente a facilidade de difusão dos eletrólitos de suporte e a alta velocidade de transferência de elétrons na superfície do eletrodo são os fatores responsáveis por este baixo tempo de resposta.

A repetibilidade dos sensores, avaliada em termos do desvio padrão relativo, ficou abaixo dos 3% com $n=10$. Com todos os sensores, foi possível realizar mais de 300 determinações sem variações significativas, mostrando alta estabilidade.

Como observado na Tabela IV.8, os sensores desenvolvidos respondem muito bem quando aplicados para detecção de NADH. Desta forma, pode-se seguir com os estudos que visam ampliar o conhecimento da utilização de mediadores de elétrons em reações que envolvam a participação do cofator

NAD(P)H. Assim, seria muito oportuno o estudo da cinética de reação entre o NADH e estes mediadores adsorvidos, podendo levar a um maior entendimento do mecanismo que envolve a transferência de elétrons das reações contendo a participação do cofator NADH.

Tabela IV.8. Condições finais da otimização dos sensores desenvolvidos para promover a eletrooxidação do NADH. Experimentos realizados em pH 7,0

Parâmetro	EPC/SNAM	EPC/SNAN	EPC/SNAT
Potencial aplicado	0 mV vs ECS	-200 mV vs ECS	0,0 mV vs ECS
Faixa de resposta linear (mol L ⁻¹)	1,0 10 ⁻⁵ a 7,5 10 ⁻⁴	1,0 10 ⁻⁵ a 4,8 10 ⁻⁴	2,0 10 ⁻⁴ a 4,0 10 ⁻³
Sensibilidade	48 mA L ⁻¹ mol	18 mA L ⁻¹ mol	1,4 µA L ⁻¹ mol
Limite de detecção	5,0 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	8,0 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	3,4 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹
Tempo de resposta	0,8 ± 0,2 s	0,8 ± 0,2 s	0,8 ± 0,2 s

IV.4. Estudo Cinético da Eletrooxidação Catalítica do NADH

Conforme já mencionado nesta tese, o aprofundamento dos estudos visando ampliar os conhecimentos do mecanismo de reação envolvendo o NADH é extremamente importante. Do ponto de vista analítico, o domínio do mecanismo desta reação tem despertado grande interesse entre os eletroquímicos, pois sua compreensão ampliará as aplicações de enzimas NADH dependentes no desenvolvimento de biossensores [18-20].

Neste sentido, a exploração eletroquímica de eletrodos contendo mediadores de elétrons tornou-se uma importante ferramenta nos estudos envolvendo o mecanismo de reação da eletrooxidação do NADH. E nos estudos visando a avaliação dos parâmetros cinéticos, o emprego dos eletrodos de disco rotatório, EDR, é de extrema importância.

Um fator primordial na exploração dos eletrodos de disco rotatório (EDR) é o gradiente de catálise apresentado pelo sensor em função da variação da velocidade de rotação do eletrodo. Quando foi empregado o sensor EPC/SNAT, o gradiente observado foi muito pequeno, comprometendo a realização dos estudos; por isso, serão discutidos e apresentados somente os dados para os sensores EPC/SNAM e EPC/SNAN.

É conhecido que a corrente de oxidação do NADH para o eletrodo modificado pode ser limitada pelo transporte de massa do NADH até a superfície do eletrodo e pela cinética da reação. Quando se emprega o EDR, a corrente (I_{lim}) pode ser limitada pelo transporte de massa, pela cinética da reação e pela concentração de NADH, $[NADH]^*$ no seio da solução, de acordo com a equação (1) de Levich [143].

$$I_{lim} = 0,620nF[NADH]^* D^{\frac{2}{3}} \omega^{\frac{1}{2}} \nu^{-\frac{1}{6}} \quad (\text{Eq.1})$$

Nesta equação n é o número de elétrons, F a constante de Faraday, D o coeficiente de difusão (em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e ν a viscosidade (em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$).

Para o sistema em estudo, é possível comprovar esse fenômeno submetendo o sensor a diferentes velocidades de rotação na presença e na ausência de NADH. Quando o NADH não está presente em solução, nenhuma alteração da corrente é observada com a variação da velocidade de rotação de 20 a 300 rpm (**Figura IV.13(A)**). Quando o NADH está presente em solução (**Figura IV.13(B)**), observa-se uma variação da corrente eletrocatalítica com a variação da velocidade de rotação do EDR. Isto comprova a influência do transporte de massa no processo redox do NADH.

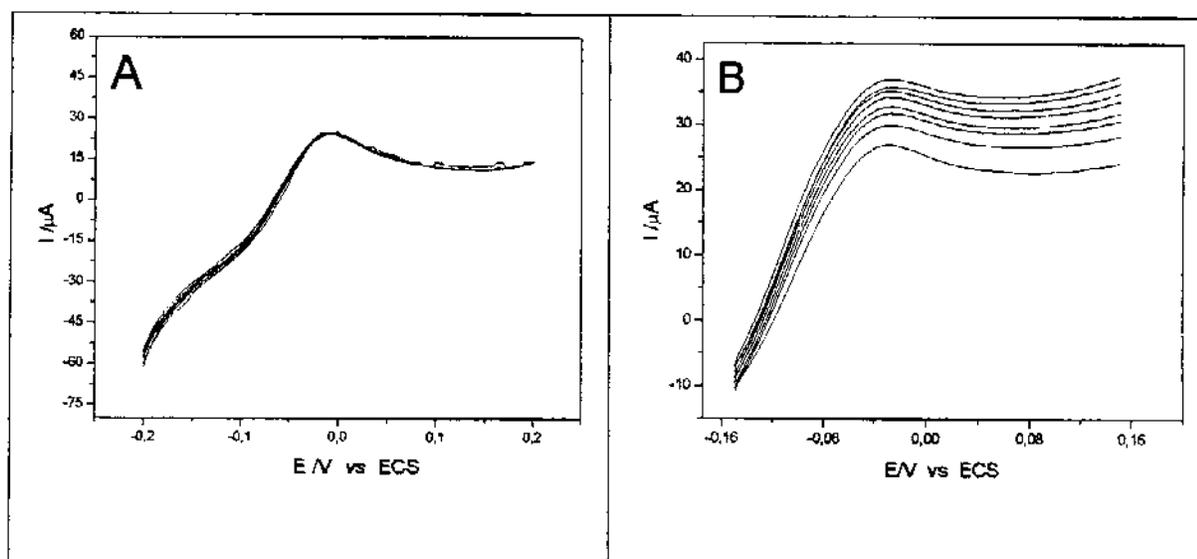


Figura IV.13. Voltamogramas de varredura linear obtidos para o sensor EPC/SNAM, empregando EDR, na ausência (A) e na presença (B) de $[NADH] 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em solução de $KCl 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 variando a velocidade de rotação de 20 a 300 rpm.

A influência da componente cinética na eletrocatalise do NADH, usando EDR, pode ser comprovada através da construção do gráfico de Levich (**Figura IV.14**). Para tanto, construiu-se um gráfico de intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade angular de rotação e, através deste gráfico, comprovou-se que nesta reação, além da contribuição difusional, há também uma componente cinética, a qual é verificada pelo desvio da linearidade.

Desta forma a emprego de EDR se ajusta perfeitamente para a determinação das constantes cinéticas envolvidas na reação de oxidação eletrocatalítica do NADH, empregando eletrodo modificado com mediadores de elétrons.

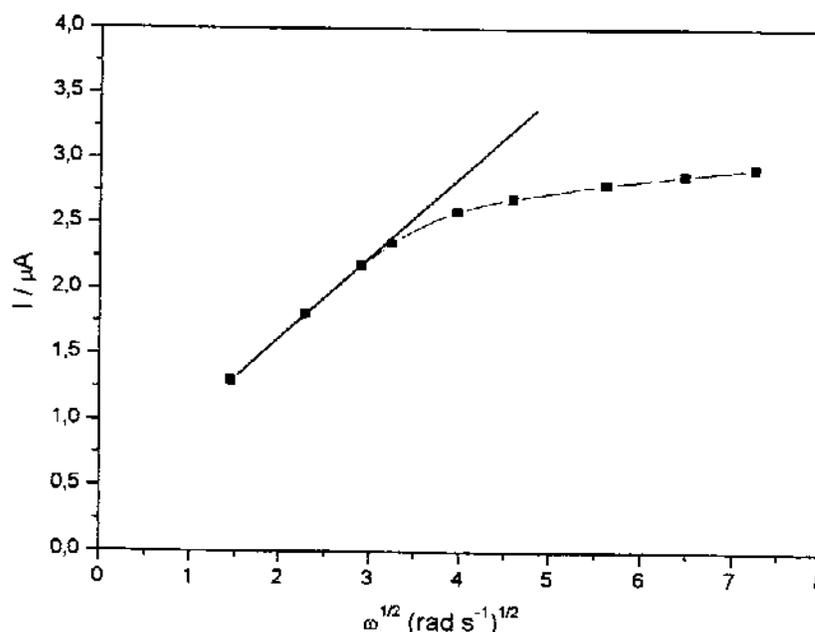


Figura IV.14. Variação da intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade de rotação. Experimento realizado em solução de KCl 0,5 mol L⁻¹, pH 7,0.

Para uma reação catalisada, a corrente medida (I), usando EDR, pode ser expressa como representada na equação 2 abaixo [148]:

$$I = \frac{nFAk_{obs}\Gamma[NADH]^* D^{\frac{2}{3}} \omega^{\frac{1}{2}}}{D^{\frac{2}{3}} \omega^{\frac{1}{2}} + 1,61\nu^{\frac{1}{6}} k_{obs} \Gamma} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde Γ é a cobertura da superfície do eletrodo com os mediadores de elétrons (em mol cm⁻²), a qual foi avaliada através da integração da área do pico anódico ou catódico do voltamograma obtido em baixa velocidade de varredura ($\Gamma = Q/nFA$).

Fazendo a inversão da equação (2), tem-se a conhecida equação (3) de Koutecky-Levich, muito utilizada em reações catalíticas empregando eletrodos contendo mediadores de elétrons [138,149]. Esta equação foi empregada na obtenção dos gráficos das **Figuras IV.15 e IV.16**, variando a concentração de $[NADH]^*$.

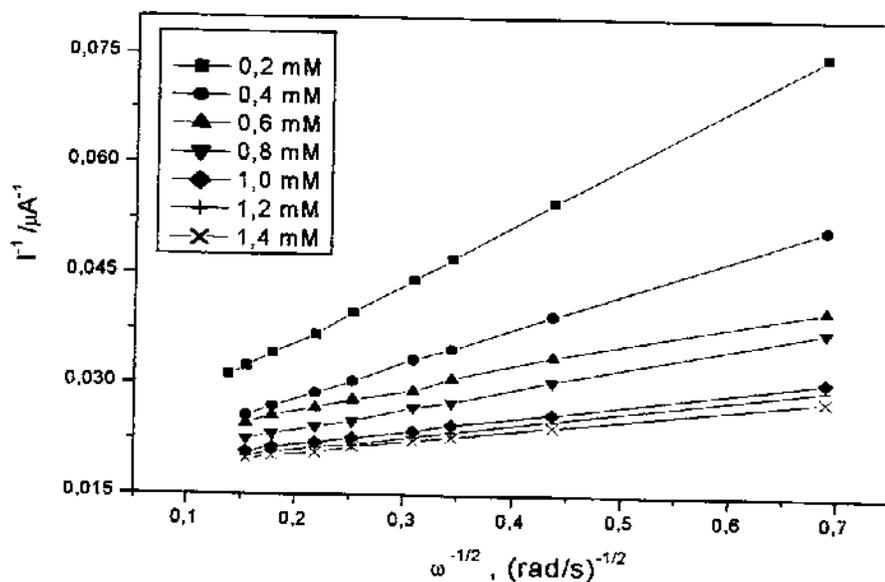


Figura IV.15. Gráfico de Koutechy-Levich para o eletrodo de pasta de carbono modificado com EPC/SNAM, empregando EDR em diferentes concentrações de $[NADH]^+$. Experimento realizado em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0

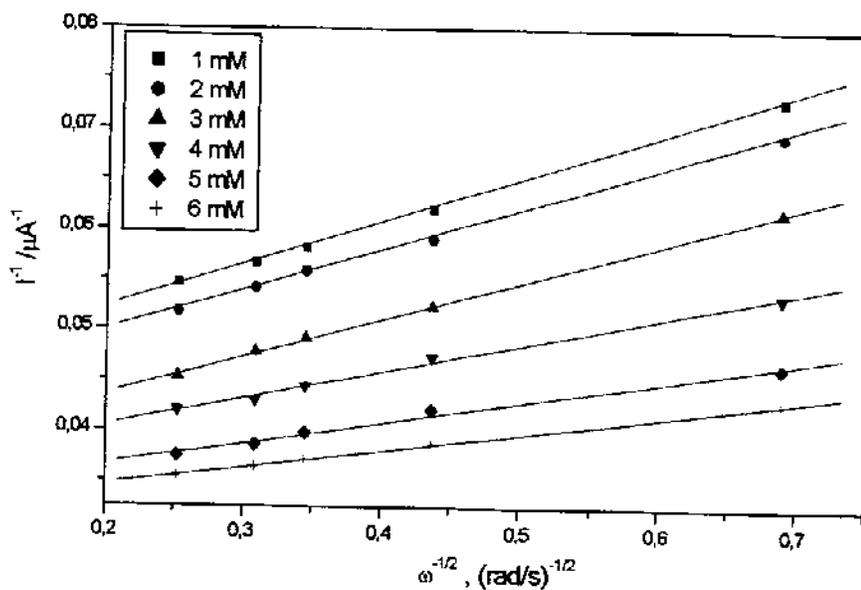


Figura IV.16. Gráfico de Koutechy-Levich para o eletrodo de pasta de carbono modificado com EPC/SNAM, empregando EDR em diferentes concentrações de $[NADH]^+$. Experimento realizado em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{nFAk_{obs}\Gamma[NADH]^*} + \frac{1}{0,620nFAv^{\frac{1}{6}}D^{\frac{2}{3}}[NADH]^*\omega^{\frac{1}{2}}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Pela inclinação da curva, é possível obter o número de elétrons (n) envolvidos na reação. Através da interceptação do gráfico de Koutechy-Levich é possível também avaliar o k_{obs} , conhecendo-se então o valor de Γ .

O valor da constante k_{obs} (constante global da reação) apresentou-se altamente dependente da $[NADH]^*$ (Figura IV.17). Isto também foi observado para outros eletrodos modificados com mediadores usados na oxidação eletrocatalítica do NADH [19,20,148], sendo esta alta dependência explicada pela formação de um complexo de transferência de carga (CT-complexo) entre o NADH e o mediador antes da formação do produto da reação representada pela equação (4) a seguir:

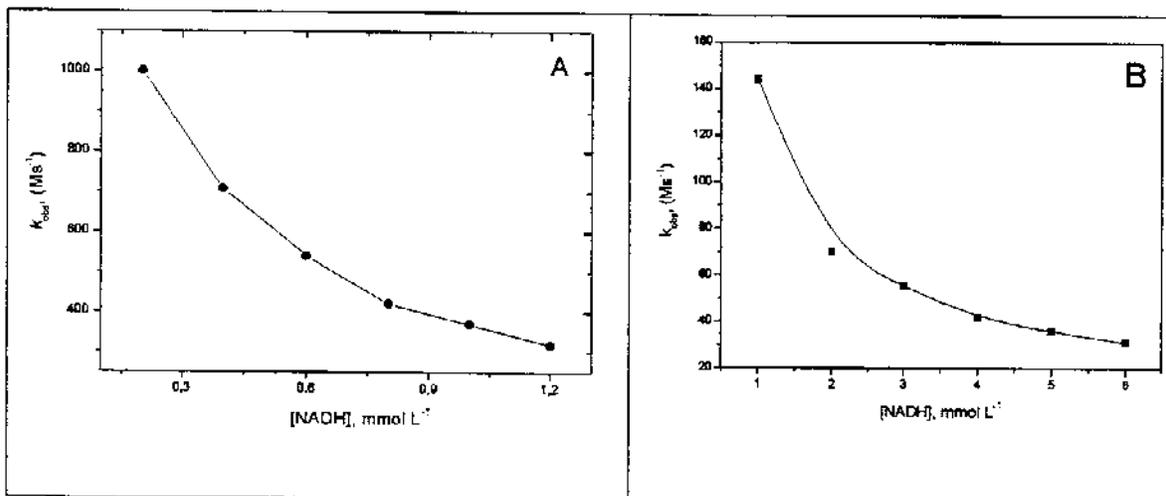
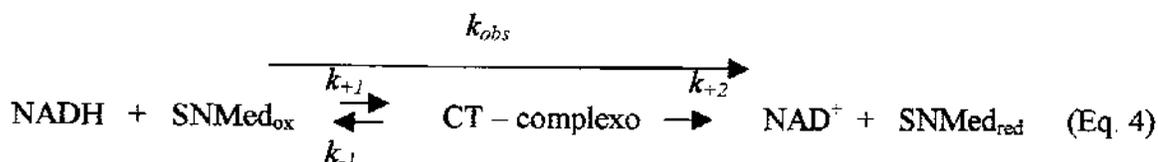


Figura IV.17. Variação da constante k_{obs} pela $[NADH]^*$ para os sensores EPC/SNAM (A) e EPC/SNAN (B).

Este tipo de mecanismo de reação é bastante empregado para estudo de cinética de Michaelis-Menten e obtenção da constante que leva o mesmo nome (K_M), que pode ser definida conforme a equação 5 abaixo [38]:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad (\text{Eq. 5})$$

A constante de velocidade global da reação, k_{obs} , para qualquer concentração de NADH pode ser expressa como proposto abaixo [148]:

$$k_{obs} = \frac{k_{+2}}{K_M + [NADH]^*} \quad (\text{Eq. 6})$$

Invertendo a equação (6) obtém-se a expressão:

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{K_M}{k_{+2}} + \frac{[NADH]^*}{k_{+2}} \quad (\text{Eq. 7})$$

A construção do gráfico $1/k_{obs}$ vs $[NADH]^*$ (Figuras IV.18 e IV.19) fornece uma relação linear, sendo indicativo que um complexo de transferência de carga deve se formar entre o mediador e o NADH. Do coeficiente angular da curva, é possível calcular o valor de k_{+2} e, do coeficiente linear, o valor de K_M pode ser avaliado.

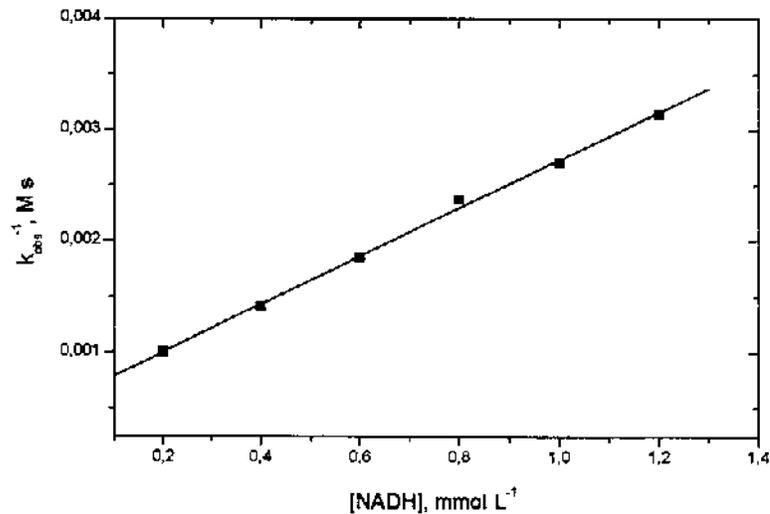


Figura IV.18. Variação de $1/k_{obs}$ em função da concentração de $[NADH]^*$, empregando o sensor EPC/SNAM em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.

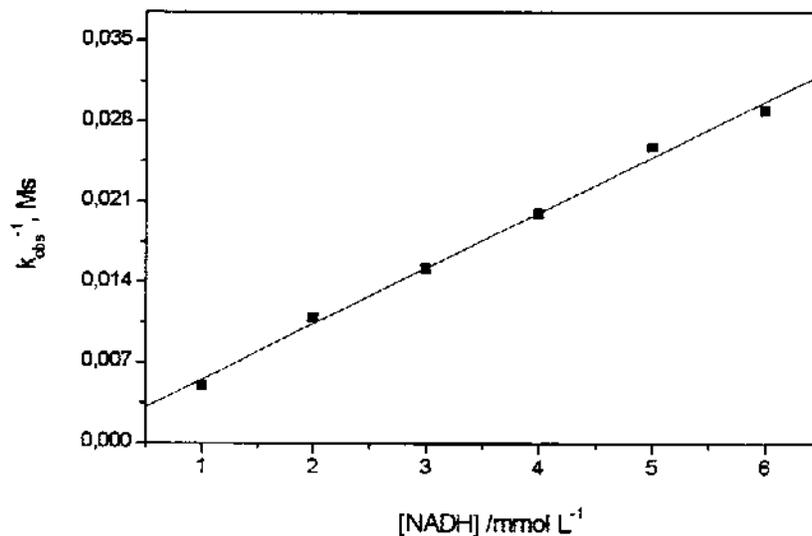


Figura IV.19. Variação de $1/k_{obs}$ em função da concentração de $[NADH]^*$ empregando o sensor EPC/SNAM em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0

O valor de $k_{obs,[NADH]=0}$ foi avaliado entre pH 6 e 8. Para valores de pH menores que 5, o comportamento eletroquímico do NADH não é estável [146] e para pH maiores que 8, a estabilidade da sílica gel que fica comprometida.

A Tabela IV.9 apresenta os parâmetros calculados pela eletrooxidação do NADH para os sensores EPC/SNAM e EPC/SNAN, empregando EDR.

Observa-se claramente que o $k_{obs,[NADH]=0}$ aumenta no sistema com o aumento do pH na solução, em contraste com outros sistemas estudados baseados em mediadores imobilizados em eletrodos convencionais, mas em concordância com dados de recente publicação com mediadores similares imobilizados em fosfato de zircônio [150].

Uma explicação dada para os sistemas nos quais ocorre diminuição da velocidade de reação com o aumento do pH, é que a estabilidade do mediador também é diminuída. No entanto, nos sensores estudados, a matriz de sílica-nióbio deve exercer um efeito de proteção frente à variação da concentração de H^+ , visto que não foi observada nenhuma alteração do potencial formal, nem na resposta dos sensores na faixa de pH entre 5 a 8, podendo a diferença de potencial eletroquímico entre o mediador adsorvido e o NADH ser a responsável por este comportamento.

Atualmente, no mecanismo de reação envolvendo o processo redox do NADH, indaga-se se a reação é influenciada pelo pH ou pelo valor do potencial formal do par $NAD^+/NADH$, que se desloca 30 mV por unidade de pH para valores mais negativos.

Possivelmente este comportamento é devido ao aumento da diferença de potencial entre o par redox $NAD^+/NADH$ e o mediador adsorvido em função do aumento do pH. É importante frisar que nos estudos do comportamento eletroquímico dos sensores, foi observado que o potencial formal do AM e AN adsorvido na matriz de SN praticamente não é afetado na faixa de pH entre 5 a 8.

A avaliação da cobertura da superfície do eletrodo com os mediadores adsorvidos, Γ , apresentou valores muito próximos para toda faixa de pH estudada, enquanto observa-se uma variação na velocidade de reação, pois k_{obs} aumenta com a diminuição da concentração de H^+ . Este comportamento evidencia que a quantidade de grupos mediadores imobilizados na superfície de SN é suficientemente alta, não afetando assim a velocidade da reação.

Quanto aos valores de K_M^{ap} , estes são pequenos quando comparados aos sistemas similares [148]. Estes valores sugerem grande participação do mediador na eletrooxidação do NADH.

Tabela IV.9. Parâmetros cinéticos e eletroquímicos da eletrooxidação do NADH em função do pH, empregando os sensores EPC/SNAM e EPC/SNAN

pH	EPC/SNAM			EPC/SNAN		
	6	7	8	6	7	8
$\Gamma (10^{-9} \text{ mol/cm}^2)$	$5,2 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,2$
$K_M (M^{-1} s^{-1})$	$0,29 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$
$k_{obs} (M^{-1} s^{-1})$	1538 ± 18	1785 ± 19	2000 ± 19	1111 ± 15	1400 ± 15	1571 ± 16
$k_{+2} (s^{-1})$	$0,40 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,02$
n (elétrons)	$1,9 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2$

Com relação ao k_{+2} , constante de dissociação do complexo, os valores são pequenos em relação ao k_{obs} ; provavelmente, este seja o passo limitante da reação.

Quanto ao número de elétrons encontrado, está concordante com o esperado para sistemas envolvendo a eletrocatalise de NADH mediada por corantes orgânicos do tipo fenoxazinas

Comparando com outros sistemas da literatura, a eletrocatalise do NADH empregando os sensores desenvolvidos foi bastante satisfatória, com alto valor de k_{obs} . Os estudos também confirmaram uma maior velocidade de transferência de elétrons para o sensor EPC/SNAM comparado ao EPCSNAN, o que já se supunha através dos estudos com os sensores em estado estacionário.

Por fim, a comparação dos resultados com outros sistemas da literatura, exige um pouco de cuidado, pois os mediadores estão adsorvidos somente na sílica nióbio a qual é misturada na pasta de carbono. Na verdade, os sítios eletroativos estão localizados no SNAM e SNAN, que são bem porosos. Considerando estes aspectos, os valores das constantes cinéticas, principalmente o K_M^{ap} , não podem ser comparados com outros sistemas de maneira direta.

IV.5. Desenvolvimento de um Biossensor para Etanol

Nos estudos anteriores foi demonstrado que o eletrodo de pasta de carbono, EPC/SNAM, resultou em um ótimo sensor para a determinação de NADH [151]. Quando o AM foi adsorvido na sílica-nióbio apresentou excelente estabilidade, graças à forte adsorção do mediador na superfície da sílica modificada. O melhoramento na atividade eletroquímica e o deslocamento do potencial formal para valores mais positivos permitiram uma efetiva eletrooxidação do NADH, aplicando potencial de 0,0 mV vs ECS.

Uma vez realizado com sucesso os estudos envolvendo a utilização de mediadores de elétrons visando melhorar a eletrooxidação do NADH, partiu-se para o desenvolvimento de um biossensor para álcool. As condições operacionais, otimização e performance deste biossensor são descritos a seguir.

IV.5.1. Importância da Matriz de Sílica gel Modificada

Conforme verificado anteriormente, a modificação da superfície da sílica gel com o óxido de nióbio, SN, foi muito bem sucedida haja visto que a quantidade de grupos imobilizados foi bastante elevada (1,4 mmol Nb/g de sílica), comparada a outros sistemas similares [135].

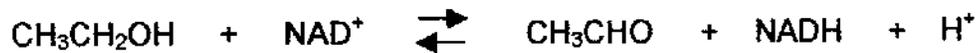
O sucesso desta etapa do projeto foi muito importante, pois a adsorção do mediador na matriz de SN conferiu elevada estabilidade ao sensor EPC/SNAM empregado na determinação de NADH. Este sensor não apresentou diminuição de corrente em nenhum momento, sendo capaz de realizar mais de 300 determinações de NADH, com erro padrão relativo de aproximadamente 3%. Esta performance é importante, pois como se sabe, a estabilidade é um grande problema na área de biossensores e com a enzima álcool desidrogenase não é diferente.

Desta forma, o desenvolvimento de um biossensor a partir do sistema com eletrodo de pasta de carbono modificado com a matriz de SNAM já é um passo importante no desenvolvimento de um biossensor com alta estabilidade e

sensibilidade.

IV.5.2. Mecanismo de Atuação do Biossensor Desenvolvido

Centenas de enzimas desidrogenases são conhecidas por catalisarem reações nas quais NAD^+ ou NADP^+ aceita um íon hidreto do mesmo substrato reduzido, ou NADH ou NADPH doa um íon hidreto para um substrato oxidado. As enzimas álcool desidrogenase catalisam o primeiro passo do catabolismo do etanol, oxidando-o a acetaldeído conforme representado na equação abaixo:



Para o emprego de enzimas desidrogenases em biossensores, o uso do cofator fisiológico é obrigatório. Contudo, a necessidade de aplicação de um sobrepotencial elevado para promover a oxidação do NAD(P)H limita sua aplicação para fins práticos, pois permite reações paralelas, provocando interferência no sistema, além do envenenamento da superfície do eletrodo.

Um caminho para solucionar este problema é a utilização de mediadores de elétrons imobilizados sobre a superfície de um eletrodo quimicamente modificado EQM [21,152]. Uma representação dos passos das reações para um biossensor empregando a enzima ADH na presença do mediador de elétrons é apresentado no esquema da **Figura IV.20**.

Por este esquema, nota-se que o cofator atua como um aceptor de elétrons gerados na reação enzimática e é transformado em sua forma reduzida, o NADH . O eletrodo modificado serve como um segundo aceptor de elétrons capaz de regenerar o cofator (NAD^+) usado na reação enzimática; assim, a magnitude desta corrente catalítica pode ser empregada como um sinal analítico na determinação de etanol.

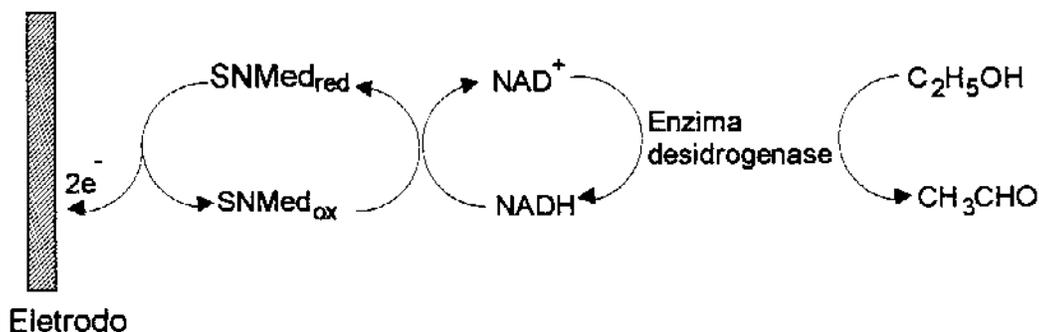


Figura IV.20. Sequência de reações para um biossensor amperométrico usando a enzima álcool desidrogenase. Neste esquema, a oxidação do NADH é facilitada pelo mediador adsorvido na matriz de SN.

VI.5.3. Determinação da Atividade da Enzima ADH

Para o emprego de enzimas em sistemas de detecção, uma característica importante é a sua atividade. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1,0 μmol de substrato por minuto, a 25 °C, sob condições ótimas de medidas [112].

Para a determinação da atividade da enzima álcool desidrogenase, foi usado o método espectrofotométrico que monitora a variação da concentração de NADH, conforme se observa na **Figura IV.21**. Nesta Figura, nota-se a grande diferença de absorção em 340 nm, comprimento de onda utilizado neste experimento, para NAD^+ e NADH.

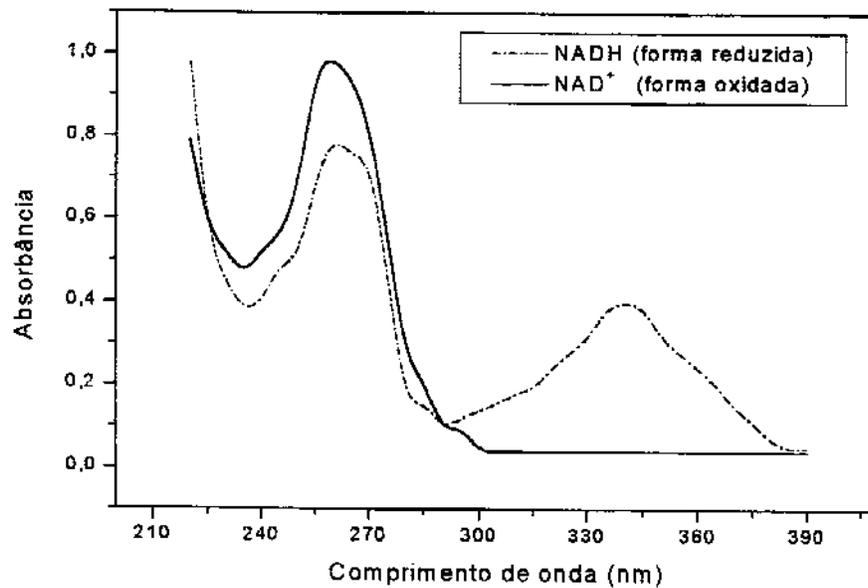


Figura IV.21. Espectros de absorção do NAD⁺ e do NADH na região do ultravioleta (UV).

Para a determinação da atividade da enzima álcool desidrogenase, foram realizados experimentos para monitorar a velocidade de reação em função da concentração de álcool. Na Figura IV.22 são mostradas as curvas de absorbância em função do tempo para várias concentrações de álcool, mantendo-se constante as concentrações de NAD⁺ e enzima.

Para a determinação da atividade da enzima ADH pelo método espectrofotométrico, também é necessário a obtenção do gráfico da Figura IV.23. Este gráfico mostra a curva analítica obtida para o cálculo da atividade da enzima álcool desidrogenase, enquanto a Figura IV.24 mostra a velocidade inicial desta reação.

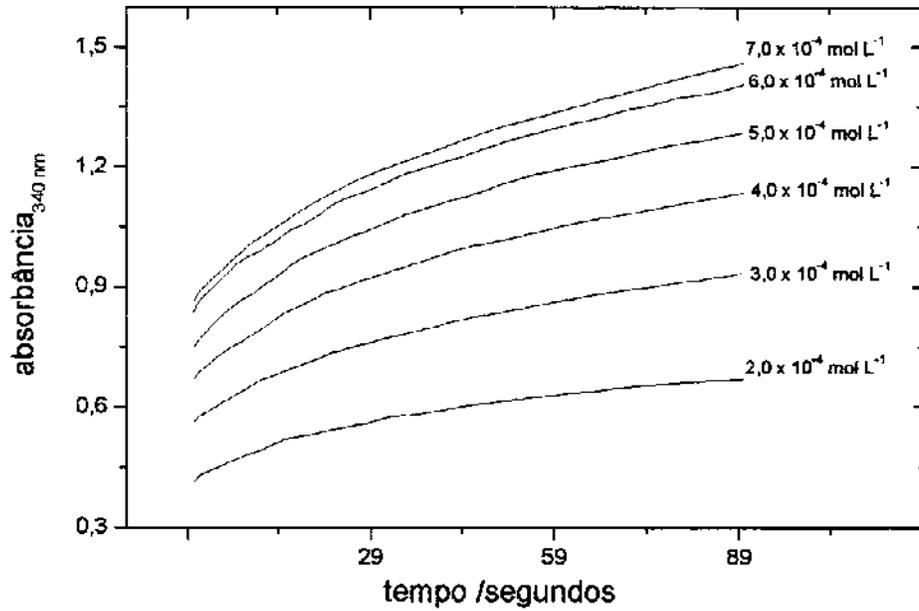


Figura IV.22. Curvas cinéticas obtidas em função da concentração de álcool. Experimento realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8 e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

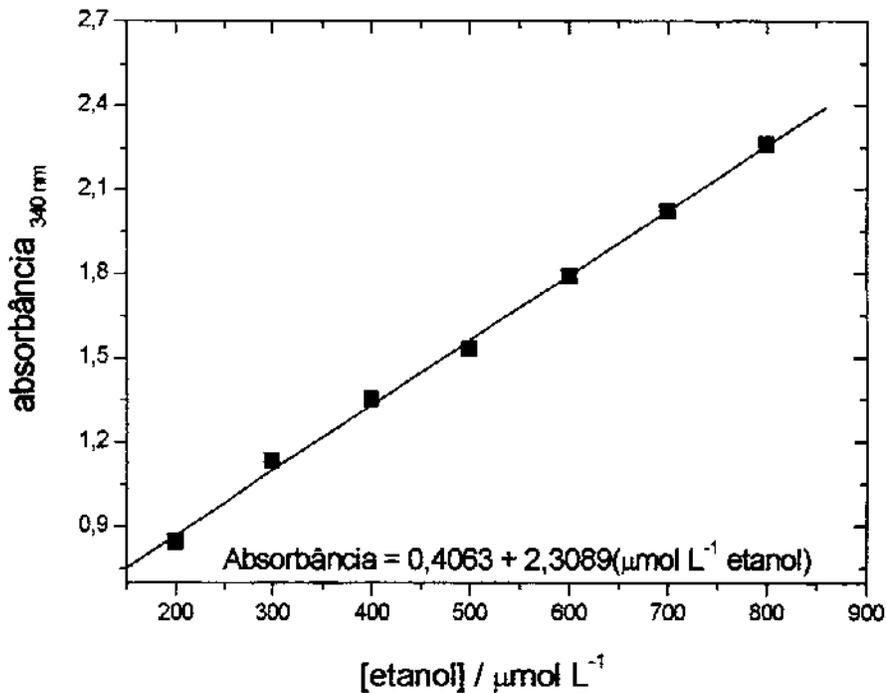


Figura IV.23. Curva analítica usada para verificar a atividade da enzima ADH. Experimento em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8 e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

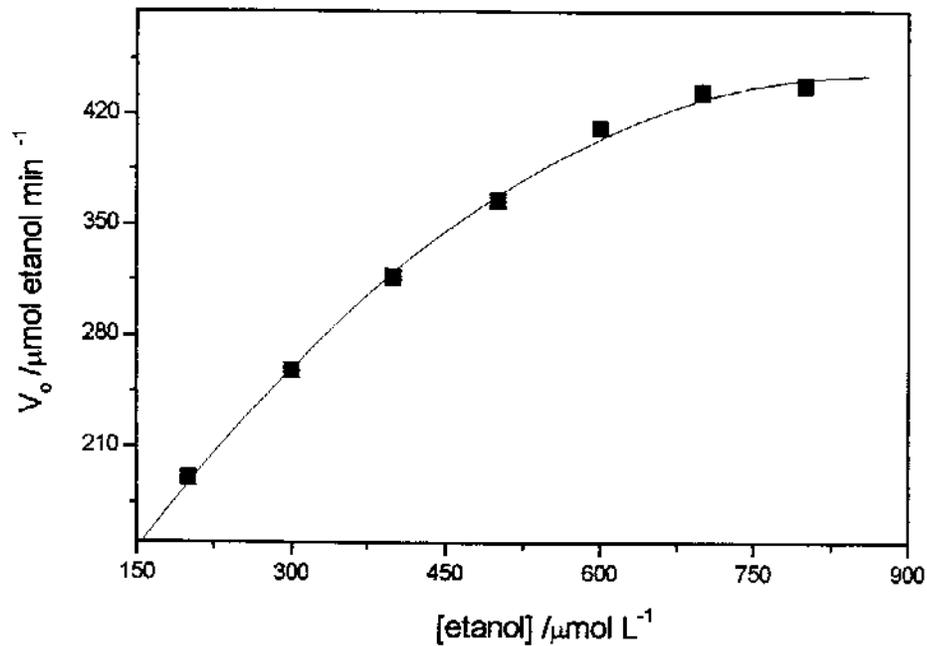


Figura IV.24. Curva da velocidade inicial da enzima álcool desidrogenase. Experimento realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8 e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Já a **Figura IV.25** relaciona o duplo recíproco no qual são apresentados os valores da velocidade máxima e K_M obtidos para a enzima em estudo. Desta curva, é possível constatar que o valor da atividade da enzima a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 8 foi de 345 U/mg de enzima. Este valor é bem próximo dos 356 U/mg fornecidos pela Sigma, lembrando que a cubeta continha $2,5 \text{ mg}$ de ADH em seus 3 mL de solução. Quanto ao valor da constante de Michaelis-Menten, K_M , foi de $0,7 \text{ mmol}$.

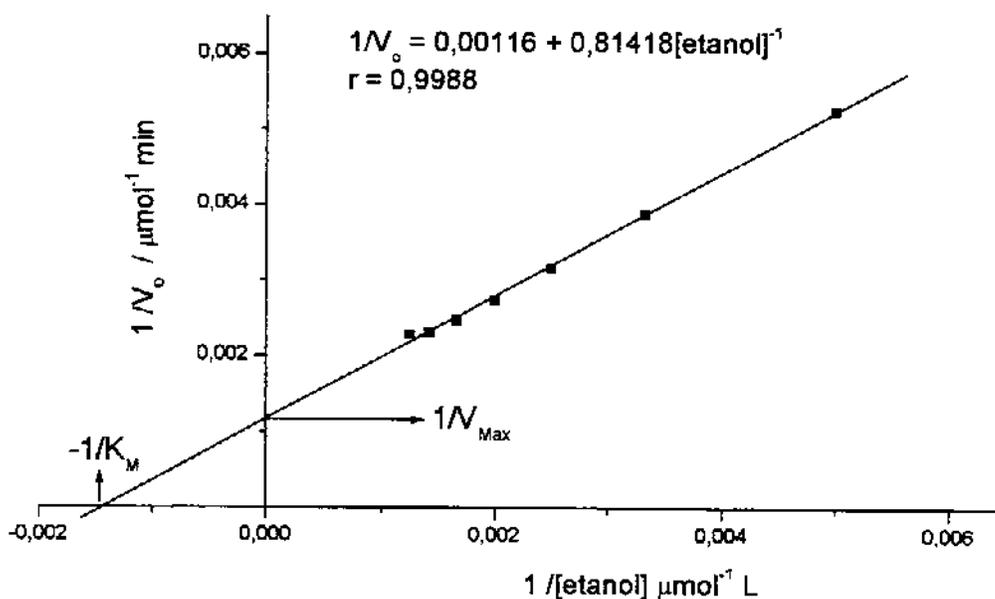


Figura IV.25. Gráfico do duplo recíproco ou de Lineweaver-Burk para a enzima álcool desidrogenase.

IV.5.4. Avaliação e Otimização do Biossensor

O desenvolvimento de um biossensor amperométrico requer minucioso estudo buscando encontrar as melhores condições de operação. A enzima é um componente sensível, podendo variar sua atividade dependendo das condições do meio. Vários fatores são importantes, como por exemplo a influência do pH da solução. As enzimas possuem um pH ótimo de atuação quando no meio fisiológico, então é importante verificar como o processo de imobilização altera o comportamento e a atividade deste componente do biossensor.

Vários outros fatores são imprescindíveis no processo de otimização de um sensor como: potencial aplicado, operação em ambientes tamponados, adição de aditivos, tempo de vida, etc. A otimização do biossensor leva ao conhecimento não só das melhores condições de operação, mas também proporciona maior compreensão do funcionamento do sistema como um todo.

IV.5.4.1. Importância do Mediador na Resposta do Biossensor

Para o desenvolvimento do biossensor a base de enzima álcool desidrogenase foram realizados inicialmente experimentos que pudessem comprovar a relevância da presença do mediador de elétrons azul de meldola na matriz de SN, pois a estabilidade do mediador no eletrodo e sua capacidade de mediar a eletrooxidação do NADH são fatores importantes no desenvolvimento dos biossensores NADH dependentes.

Estudos preliminares realizados com o sensor EPC/SNAM comprovaram a eficácia do mediador na eletrooxidação do NADH com alta estabilidade [151]. Neste sensor, o azul de meldola adsorvido na matriz de SN promove a oxidação eletrocatalítica do NADH com potencial aplicado de 0,0 mV vs ECS, obtendo-se alta sensibilidade.

Na resposta do biossensor a importância do mediador é evidente, através da curva da **Figura IV.26(C)**, na qual encontra-se presente na pasta de carbono ADH/NAD⁺/SNAM percebe-se a excelente performance do biossensor, respondendo linearmente à variação da concentração de etanol.

Na ausência do mediador, **Figura IV.26(A)** ADH/NAD⁺ e **Figura IV.26(B)**, ADH/NAD⁺/SN, praticamente nenhuma corrente catalítica foi observada na determinação de álcool etílico. Daí a importância da matriz de sílica nióbio que adsorve de maneira eficiente o mediador, impedindo sua lixiviação e aumentando a estabilidade do sistema, além de originar um ótimo ambiente para a eletrooxidação de NADH.

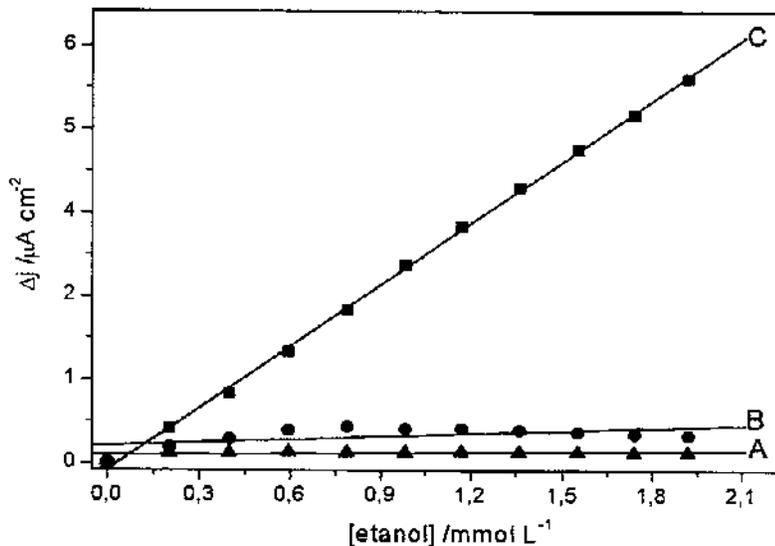


Figura IV.26. Efeito da composição da pasta na resposta do biossensor para etanol. Eletrodo de pasta de carbono modificada com ADH/NAD⁺ (A), ADH/NAD⁺/SN (B) e ADH/NAD⁺/SNAM (C). Experimento realizado em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,8 e potencial aplicado de 0,0 mV vs ECS.

IV.5.4.2. Estudo da Influência dos Aditivos na Resposta do Biossensor

Quando uma enzima é imobilizada em um suporte sólido contendo na superfície grupos funcionais com grande atividade química, estes grupos podem induzir a mudanças conformacionais na enzima, o que pode levar a perda de atividade enzimática. Por outro lado, imobilizações fracas tornam o biossensor altamente instável limitando sua aplicação.

Em geral, estes problemas são contornados através do desenvolvimento e aprimoramento dos métodos de imobilização de enzimas ou através do uso de estabilizadores, que incluem polímeros positivamente carregados ou carboidratos neutros [153].

Eletrodos a base de pasta de carbono oferecem boa estabilidade, baixo ruído, baixa corrente de fundo e baixo custo. Um outro ponto importante é a possibilidade da modificação do interior do eletrodo visando criar um ambiente compatível entre a enzima, a matriz condutora e outros aditivos, o que resulta num aumento de estabilidade e sensibilidade do biossensor [153,154].

Com tais possibilidades de variação e incorporação de reagentes no interior da matriz de carbono, sugere-se o emprego de aditivos, tais como: polímeros [155], proteínas [156] e DNA [157]. Albumina de soro bovino (BSA) é usada juntamente com enzimas para formar um ambiente mais próximo do ambiente natural [158]. Esse reagente tem sido utilizado quando a enzima é imobilizada através do método de ligação covalente cruzada com glutaraldeído.

Desta forma, foram realizados experimentos para verificar a eficácia do método de imobilização da enzima, seja por adsorção física ou por ligação cruzada com glutaraldeído/BSA. Na **Figura IV.27(A)**, verifica-se que com a imobilização da enzima por ligação cruzada empregando-se glutaraldeído/BSA obteve-se melhor sensibilidade e maior faixa de resposta linear do que para o método de adsorção física, **Figura IV.27(B)**.

O aumento na sensibilidade do biossensor também está associado ao aumento na hidrofiliicidade da superfície do eletrodo com a adição do BSA, levando a um aumento na velocidade de transferência de elétrons [37].

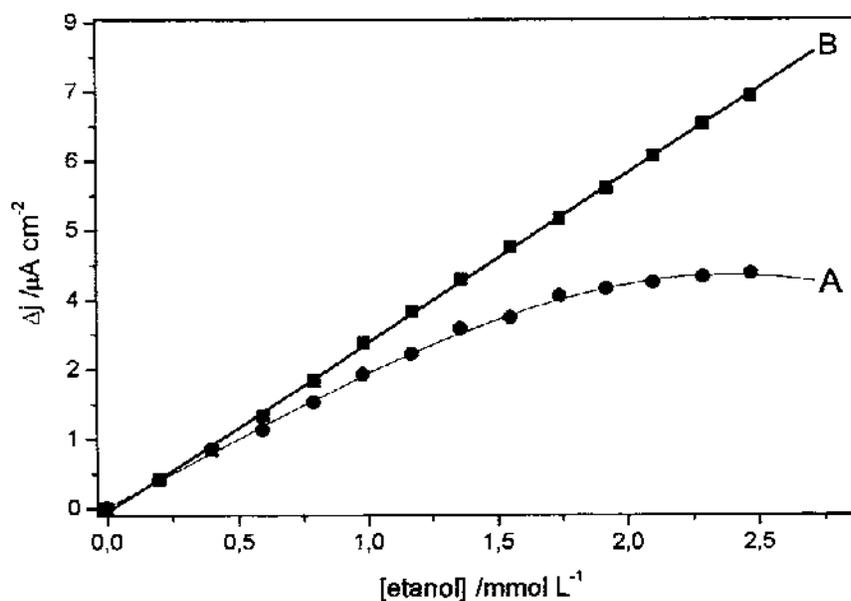


Figura IV.27. Curvas analíticas para etanol obtidas com o biossensor usando a enzima ADH imobilizada por adsorção física (A) e imobilização por ligação cruzada com glutaraldeído/BSA (B). Experimento realizado em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,8

IV.5.4.3. Influência da Concentração do Aditivo

Foram realizados também experimentos para verificar a influência da quantidade dos aditivos Glutaraldeído/BSA na resposta do biossensor a base de pasta de carbono (**Figura IV.28**). Neste experimento, variou-se a concentração de ambos os reagentes e a melhor resposta foi obtida com 2,5 % (m/m) de BSA e 5 μL de solução 5 % de glutaraldeído. Nestas concentrações, o biossensor também foi mais estável que em outras concentrações ou na ausência destes aditivos.

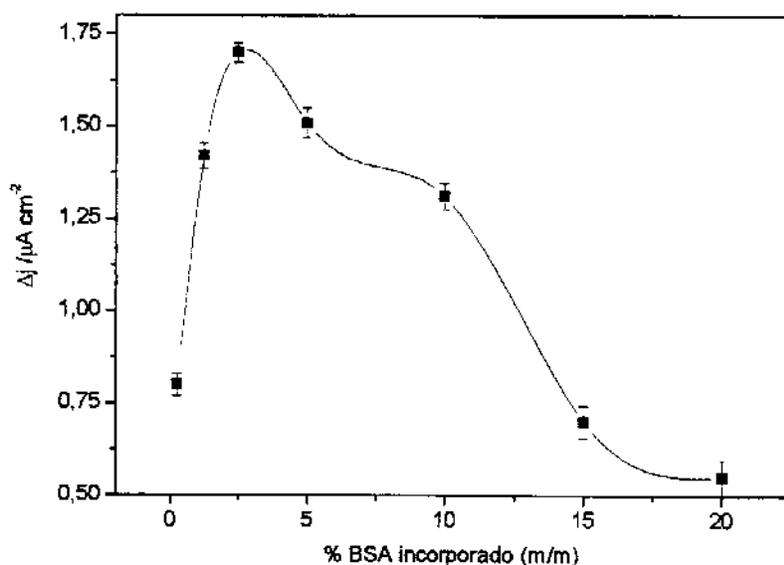


Figura IV.28. Resposta do biossensor em função da porcentagem em massa de BSA incorporado dentro da pasta de carbono. Experimento realizado em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,8 e potencial aplicado de 0 mV e 5 μL de solução 5 % de glutaraldeído com [etanol] de 5 10⁻⁴ mol L⁻¹.

IV.5.4.4. Comportamento da Enzima no Biossensor Proposto

Outro ponto importante no desenvolvimento de um biossensor é o conhecimento da melhor quantidade de enzima a ser utilizada, uma vez que alta quantidade deste reagente pode causar limitações difusionais, diminuindo a resposta, além do custo elevado da enzima purificada.

Portanto, é importante conhecer como a variação da concentração da enzima no interior da pasta de carbono pode influenciar a resposta do biossensor. Para tanto, foram elaboradas pastas com diferentes quantidades de ADH numa faixa de 1 a 23 U de enzima por mg de pasta, enquanto a quantidade dos outros componentes foi mantida constante. Neste estudo observa-se que houve um aumento da sensibilidade até $8,9 \text{ U mg}^{-1}$, enquanto para maiores quantidades de ADH nenhum aumento foi verificado (**Figura IV.29**). Portanto, optou-se por utilizar $8,9 \text{ U mg}^{-1}$ de enzima na construção do biossensor para etanol.

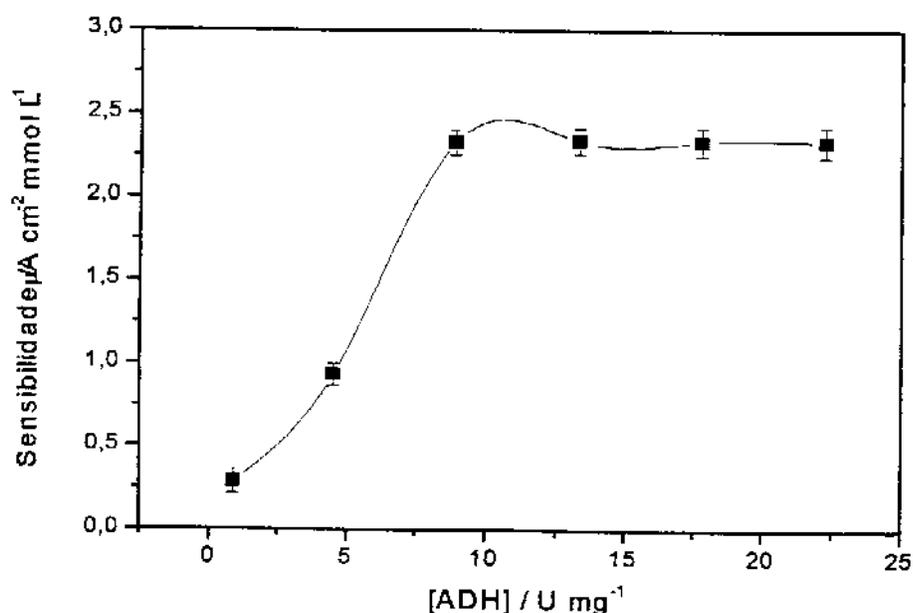


Figura IV.29. Efeito da quantidade de ADH na resposta do biossensor para etanol. Experimento realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,8 e potencial aplicado de 0 mV vs ECS .

IV.5.4.5. Influência do Cofator NAD^+ no Desempenho do Biossensor

Vários experimentos foram realizados previamente para verificar o comportamento da eletrooxidação do NADH utilizando o sensor EPC/SNAM, antes de partirmos para o desenvolvimento do biossensor. Neste estudo, verificou-se uma ótima capacidade do sensor em promover a eletrocatalise do NADH, melhorando a transferência de elétrons na superfície do eletrodo e diminuindo o sobrepotencial exigido na oxidação do NADH [151].

Como se sabe, o cofator desempenha importante papel no mecanismo de atuação das enzimas desidrogenases. Na otimização do biossensor é importante saber se o cofator atua melhor quando incorporado na pasta ou livre em solução. Quando o cofator é incorporado junto à pasta de carbono (**Figura IV.30(A)**), a inclinação da curva de calibração para etanol (sensibilidade) é cerca de 4 vezes maior do que aquela observada usando NAD^+ livre em solução (**Figura IV.30(B)**). Este comportamento mostra que o NADH , mesmo imobilizado, ainda apresenta mobilidade quando incorporado na pasta de carbono, podendo rapidamente difundir através da pasta de carbono até a camada de difusão para reagir com a ADH e etanol.

Por outro lado, a cinética de difusão do NAD^+ em solução compromete a sensibilidade quando comparada ao NAD^+ imobilizado na pasta, além do que o NADH formado durante a reação enzimática e monitorado pelo eletrodo deve ser mais facilmente reoxidado quando está imobilizado na pasta do que quando em solução. Também se observa que com o NAD^+ incorporado, obtêm-se maior faixa linear de resposta.

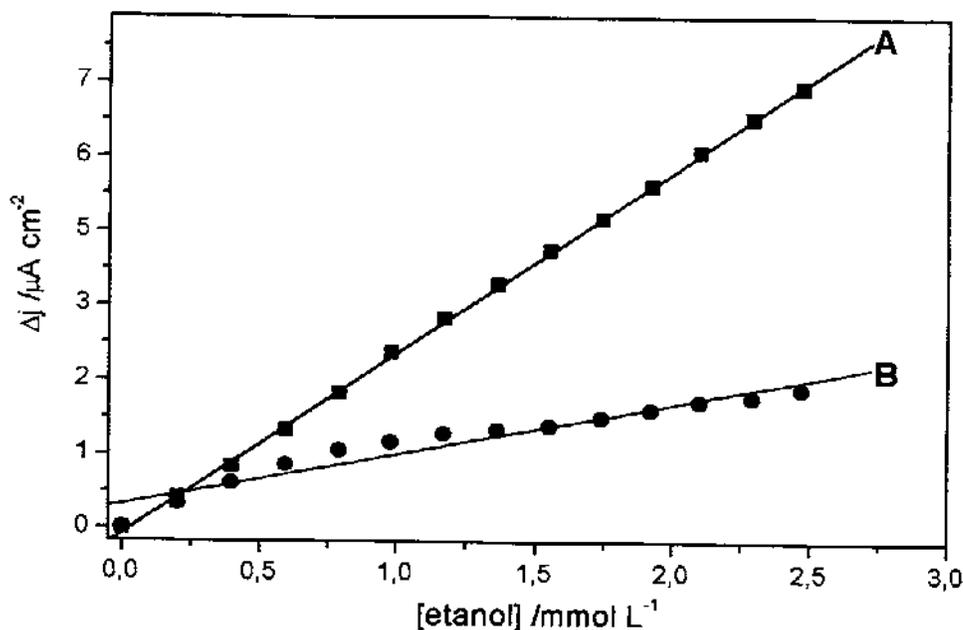


Figura IV.30. Curvas analíticas obtidas empregando o NAD^+ incorporado na pasta (A) e livre em solução (B). Experimento realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,8 e potencial aplicado de $0,0 \text{ mV vs ECS}$

Foi realizado também experimento para verificar qual a melhor quantidade de cofator que deveria ser utilizada na elaboração do biossensor. O gráfico da sensibilidade do biossensor para álcool em função da porcentagem de NAD^+ incorporada na pasta de carbono é apresentado na **Figura IV.31**.

Verifica-se que a resposta do biossensor aumenta em função da porcentagem de NAD^+ até 5% (m/m); para porcentagens maiores, a sensibilidade diminui até se estabilizar, em decorrência de problemas de lixiviação e da consistência da própria pasta que é alterada com o aumento de NAD^+ incorporado. Baseando-se nestes resultados, foi empregado 5 % de NAD^+ incorporado na pasta de carbono para o desenvolvimento do biossensor para etanol.

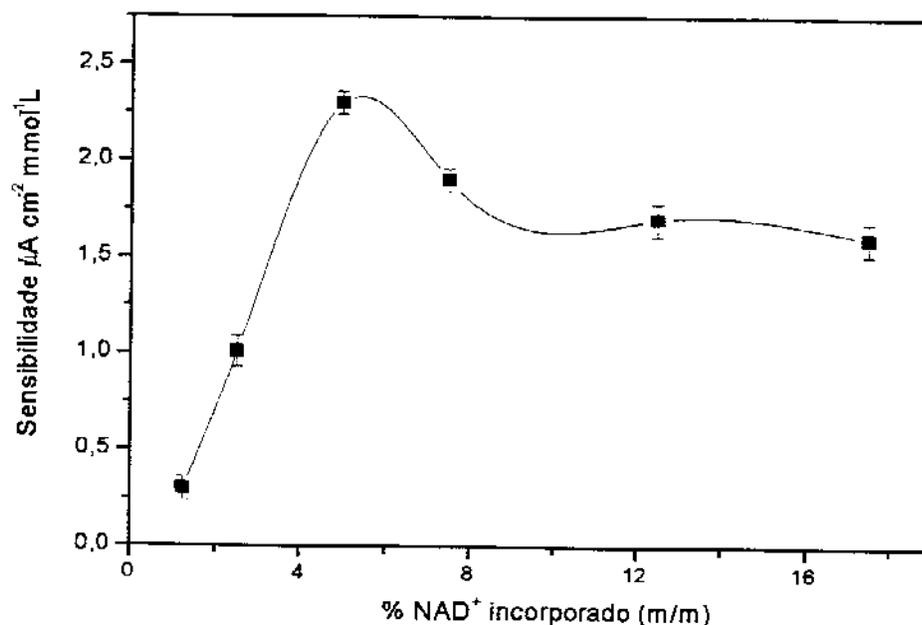


Figura IV.31. Sensibilidade do biossensor em função da porcentagem em massa de NAD^+ incorporada na pasta de carbono. Experimento realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,8 e potencial aplicado de 0 mV vs ECS

IV.5.4.6. Influência da Solução Tampão na Performance do Biossensor

Em grande parte dos artigos disponíveis na literatura, encontra-se o uso de solução tampão fosfato ou tris quando empregam biossensores enzimáticos com

ADH, mas não justificam de maneira clara sua escolha; provavelmente, a interação da enzima com a solução tampão é particular a cada caso. O biossensor em desenvolvimento foi submetido a diferentes soluções tampão para avaliar qual o efeito sobre a resposta do biossensor.

A Tabela IV.10 mostra as respostas obtidas na determinação de etanol usando diferentes soluções tampões e o melhor resultado foi obtido em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Este comportamento é atribuído à interação entre os íons fosfato e o sítio ativo da enzima e/ou a melhor facilidade dos íons fosfato de difundirem através da superfície do eletrodo de pasta de carbono, em comparação com os ânions dos outros tampões investigados. Outra explicação baseia-se na formação de um complexo entre o NADH e o fosfato, como um aduto, tornando a oxidação do NADH mais fácil [147].

A influência da concentração da solução tampão na catálise enzimática também foi estudada, mostrando que em concentrações acima de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ não se observa nenhuma alteração significativa no processo. Abaixo deste valor, começa haver um comprometimento da transferência de elétrons do sistema, podendo ser atribuída à carência de transportadores de carga para manter a eletroneutralidade do eletrodo.

Tabela IV.10. Efeito da solução tampão sobre a resposta do biossensor, aplicando potencial de $0,0 \text{ mV vs ECS}$. Solução tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,8 com $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de etanol.

Tampão	$\Delta j (\mu\text{A cm}^{-2})$
Fosfato	$1,70 \pm 0,04$
Hepes	$0,83 \pm 0,06$
Pipes	$0,77 \pm 0,06$
Tris	$1,39 \pm 0,05$

IV.5.4.7. Influência do pH na Resposta do Biossensor

O biossensor passou também pela avaliação da influência do pH da solução, pois as enzimas apresentam resposta ótima em determinados valores de pH. Quando se faz a imobilização da enzima, estes valores podem ser ligeiramente alterados, principalmente porque as cargas dos grupos amino e carboxílico das enzimas variam com o pH, além de poderem interagir com os grupos existentes na superfície do eletrodo utilizado. Portanto, a capacidade catalítica das enzimas depende do pH e da presença de íons, pois a carga afeta a conformação da enzima e sua interação eletrostática com o substrato.

A realização do experimento para verificar o efeito do pH da solução no desempenho do biossensor revelou que a resposta do biossensor alcança um máximo em pH 7,5 e mantém-se constante até pH 8,0 (Tabela IV.11). Este intervalo ótimo de pH é um pouco abaixo do observado para a enzima livre em solução pH 8,8, o que é explicado pelo efeito da matriz (pasta) sobre a estrutura da enzima.

Tabela IV.11. Dependência da resposta do biossensor para álcool em função do pH da solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, aplicando um potencial de 0 mV vs ECS com $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de etanol.

pH	$\Delta j \text{ (} \mu\text{A cm}^{-2} \text{)}$
6,0	$0,21 \pm 0,05$
6,5	$0,46 \pm 0,05$
7,0	$0,87 \pm 0,04$
7,5	$1,70 \pm 0,04$
8,0	$1,70 \pm 0,04$
8,5	$1,49 \pm 0,05$

IV.5.4.8. Efeito do Potencial Aplicado na Resposta do Biossensor

O potencial aplicado tem grande influência na resposta dos biossensores amperométricos a base de enzima desidrogenase. Isto se deve à dificuldade na eletrooxidação do NADH. Por isso, este estudo foi realizado dentro de uma ampla faixa de potencial aplicado, conforme pode ser observado na **Figura IV.32**. Neste experimento, observa-se que a resposta do biossensor para etanol inicia-se num potencial de -250 mV vs ECS e alcança um máximo de resposta a -50 mV vs ECS, mantendo este patamar até 100 mV vs ECS.

Estes resultados só foram possíveis graças à presença do mediador AM adsorvido na matriz de sílica-nióbio. O potencial médio deste mediador adsorvido na matriz de SN foi de -50 mV vs ECS, possibilitando efetuar a eletrooxidação do NADH em potencial de $0,0$ mV vs ECS, quando utilizou-se o sensor EPC/SNAM. Uma vez produzido o biossensor as características favoráveis à eletrooxidação do NADH foram mantidas, beneficiando sua aplicação em amostras reais.

Deste modo $0,0$ mV vs ECS foi escolhido como o potencial ótimo de trabalho. Neste potencial, o biossensor responde muito bem à presença de etanol além da célula eletroquímica ser operada num baixo poder de oxidação ou redução de outras espécies presentes. Na verdade, este biossensor é menos vulnerável a interferência de vários compostos comumente presentes em amostras reais. Também foi observado que neste potencial ocorre baixo nível de ruído e baixa corrente de fundo.

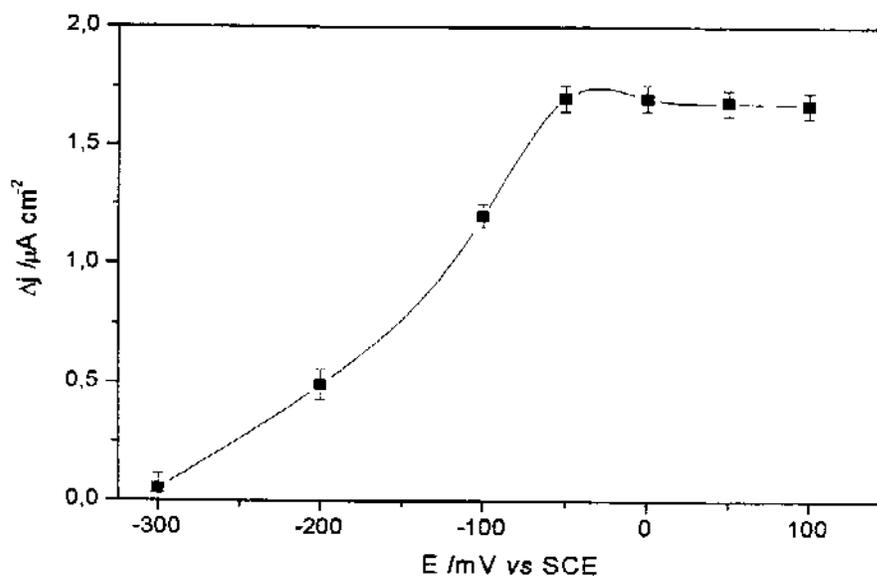


Figura IV.32. Influência do potencial aplicado sobre a resposta do biossensor para álcool. Experimento realizado em solução tampão fosfato, pH 7,8, com $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de etanol.

IV.5.4.9. Tempo de Resposta do Biossensor

A resposta para este biossensor foi rápida, alcançando um máximo em cerca de 0,6 s, como verificado na **Figura IV.33**. Este tempo de resposta é muito curto considerando que o eletrodo utilizado é feito a base de pasta de carbono, onde a difusão das espécies deve ser mais dificultada.

Sabe-se que uma condição para o biossensor responder é que haja difusão da solução através da pasta, sendo que esta etapa influi no tempo de resposta. Provavelmente, o procedimento usado para construir o biossensor a base de pasta de carbono resultou num sistema bem empacotado, tornando difícil a solução difundir profundamente através da pasta, e isso pode levar à uma resposta mais rápida, pois somente os sítios superficiais devem contribuir para a resposta [159].

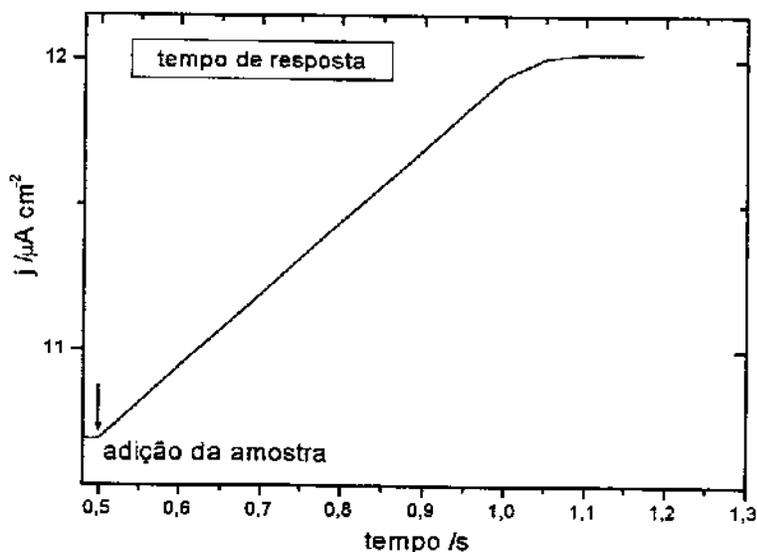


Figura IV.33. Tempo de resposta obtido com o biossensor para etanol com potencial aplicado de 0,0 mV vs ECS, em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,8.

IV.5.4.10. Curva Analítica para Etanol Usando o Biossensor Desenvolvido

Após a etapa de otimização, partiu-se para o emprego do biossensor desenvolvido na construção da curva analítica para etanol, ou seja, variação da corrente em função da concentração de álcool etílico presente em solução.

A curva da **Figura IV.34** apresenta uma boa linearidade de resposta de 0,1 a 10 mmol L⁻¹ para etanol em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,8. Esta curva analítica foi ajustada pela equação: $j = -0,06(\pm 0,02) + 2,28(\pm 0,03)[\text{álcool}]$ com um coeficiente de 0,9996 para n=21, onde a densidade de corrente j é dada em $\mu\text{A cm}^{-2}$ e a concentração de álcool em mmol L⁻¹.

O desvio de linearidade observado para concentrações de álcool acima de 0,01 mol L⁻¹ foi atribuído à saturação dos sítios ativos da enzima imobilizada sobre a matriz de pasta de carbono modificada com sílica-nióbio adsorvida com Azul de Meldola. O limite de detecção calculado como sendo três vezes o ruído do branco, foi de $8 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹. Este biossensor apresenta excelente repetibilidade, pois quando o mesmo biossensor foi usado na construção de 8 curvas analíticas completas, apresentou um desvio padrão relativo menor que 2,1 %.

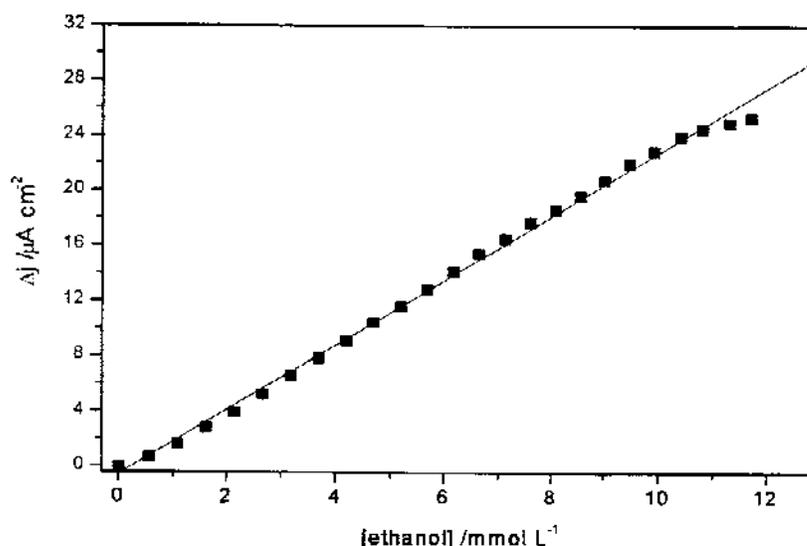


Figura IV.34. Curva de calibração obtida com o biossensor para álcool etílico com adições sucessivas de $0,55 \text{ mmol L}^{-1}$. O experimento foi realizado aplicando um potencial de $0,0 \text{ mV vs ECS}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,8

O valor da constante de Michaelis-Menten aparente, K_{Map} , calculado para a enzima imobilizada foi de 10 mmol . Este valor é mais alto que para o sistema em solução $0,7 \text{ mmol}$. O aumento do K_{Map} é devido ao processo de imobilização da enzima e do cofator NAD^+ . Isto não significa necessariamente que ocorreu diminuição da afinidade da enzima pelo substrato, pois tanto a cinética da catálise enzimática na superfície do eletrodo como a difusão do substrato são fatores que influenciam o valor do K_{Map} e também porque se trata de uma aproximação de um sistema em que a enzima está livre em solução e outro onde ela se encontra imobilizada.

IV.5.4.11. Estabilidade e Tempo de Vida do Biossensor

Este biossensor apresentou ótima estabilidade operacional, verificada quando utilizado em análises repetidas com intervalo de 10 minutos sobre longo período de utilização. Na Figura IV.35 verifica-se que aproximadamente 95 % da resposta inicial foi mantida após 300 determinações.

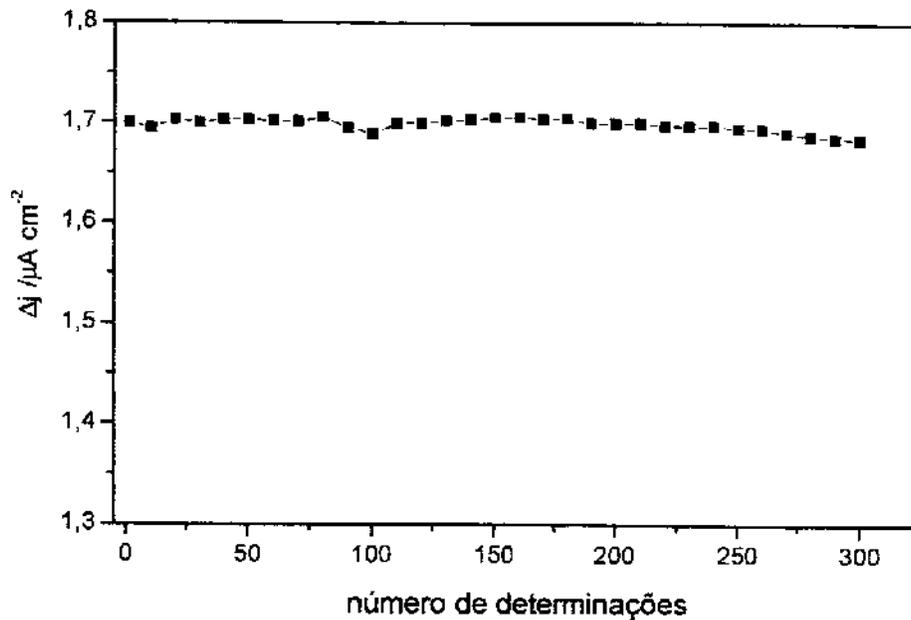


Figura IV.35. Estabilidade operacional do biossensor. Concentração de etanol de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, potencial aplicado de $0,0 \text{ mV vs ECS}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,8.

Para verificar o tempo de vida do biossensor, procedeu-se a realização de medidas diárias usando sempre o mesmo biossensor. Através da **Figura IV.36(A)**, nota-se uma considerável estabilidade até o vigésimo quinto dia; após este período, a resposta do biossensor começa a apresentar uma redução diária. Cabe ressaltar que mesmo com uma diminuição na resposta após o vigésimo quinto dia, o biossensor apresenta sensibilidade suficiente para ser utilizado.

Uma condição para que o biossensor mantivesse sua resposta foi estocá-lo em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,8 em geladeira, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (**Figura IV.36(A)**). Quando o biossensor foi estocado a seco em geladeira este desempenho diminuiu cerca de 35 % (**Figura IV.36(B)**).

Comparado a outros biossensores propostos na literatura [16,160], a estabilidade do biossensor desenvolvido é muito boa, com diminuição da atividade enzimática é muito pequena após vários dias de uso. Este resultado comprova que a utilização da matriz de SN tem papel fundamental no sistema, pois sua capacidade adsortiva promove uma ótima imobilização do mediador Azul de Meldola e suas características contribuem para a estabilização total do sistema.

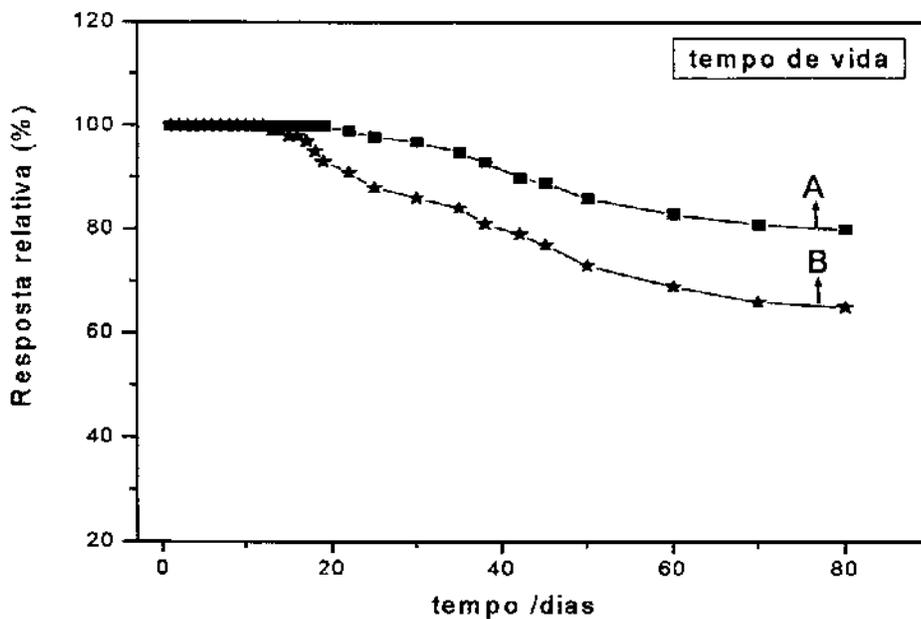


Figura IV.36. Curva referente ao tempo de vida do biossensor estocado em geladeira a 4 °C, (A) em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,8 e (B) estocado a seco. Experimento realizado em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,8, potencial aplicado de 0 mV vs SCE e concentração alcoólica de 5 10⁻⁴ mol L⁻¹

IV.5.4.12. Considerações Finais da Otimização do Biossensor

A faixa linear de resposta, o limite de detecção e especialmente a estabilidade apresentados por este biossensor são superiores aos biossensores amperométricos para etanol descritos na literatura [16,115,117-120,161,162]. Vale ressaltar que o emprego do cofator NAD⁺ e de todos os outros reagentes adicionados diretamente na pasta de carbono é uma grande vantagem, facilitando sua aplicação, tanto pela simplicidade quanto pela economia nos custos e contribuindo para uma química “limpa”.

Para melhor visualização dos parâmetros analíticos e condições de operação do biossensor desenvolvido, construiu-se a Tabela IV.12. Houve um deslocamento no pH ótimo da enzima, pois, segundo o fornecedor, o pH ótimo de atuação da enzima é de 8,8 enquanto os estudos apresentaram uma faixa ótima entre 7,5 e 8,0. O deslocamento observado se deve ao efeito da matriz.

Outro ponto importante é a estabilidade do biossensor, pois o mesmo eletrodo pode ser reutilizado sem perda de resposta, por pelo menos 300 determinações ou por mais de 80 dias, bastando estocá-lo na geladeira. Ainda podemos ressaltar a grande faixa de resposta linear, o que amplia sua aplicação em situações reais.

Tabela IV.12. Condições finais da otimização do biossensor para álcool e alguns parâmetros analíticos

Parâmetros	Condições otimizadas
pH	7,8
Potencial aplicado (mV)	0,0
Solução tampão	Fosfato 0,1 mol L ⁻¹
Faixa de resposta linear	0,1 a 9 mmol L ⁻¹
Sensibilidade	2,28 $\mu\text{A cm}^{-2} \text{mmol}^{-1} \text{L}$
Limite de detecção	8 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹
Estabilidade	até 300 análises ou 80 dias
K_{Map}	10 mmol

IV.5.5. Aplicação do Biossensor em Análises de Bebidas Alcoólicas

A determinação da concentração de etanol em diferentes tipos de bebidas é muito importante na indústria, por várias razões. Primeiro, devido à própria necessidade de se conhecer a concentração alcoólica dentro do processo de controle de qualidade. Segundo devido à carência de métodos seguros e rápidos para a determinação de álcool em testes que possam comprovar a adulteração do produto ou seu padrão de qualidade.

A utilização de métodos cromatográficos e de destilação não são os mais convenientes para esta tarefa, sendo o desenvolvimento de biossensores amperométricos uma ótima alternativa.

As boas características apresentadas pelo biossensor sugerem sua aplicação para a determinação da concentração de etanol em amostras reais.

Desta forma, a capacidade do biossensor na determinação de álcool foi testada aplicando-o na determinação da concentração de etanol em diferentes bebidas: cerveja, uísque, vinho tinto, tequila e destilado de cana de açúcar. A **Tabela IV.13** sumariza as concentrações encontradas para as diferentes bebidas utilizando o biossensor proposto.

Todos os resultados estão muito próximos dos valores fornecidos pelos fabricantes. É importante mencionar também que o biossensor desenvolvido apresentou excelente repetibilidade com desvio padrão médio relativo (r.d.s.) de 1,3 % para $n = 10$.

Tabela IV.13. Determinação da concentração de etanol em amostra de bebidas, usando o biossensor proposto.

Bebida	Concentração nominal (% m/v)	Eletrodo modificado ^a % de etanol (m/v)
Vinho tinto	11,0	11,2 ± 0,3
Cerveja	4,7	4,7 ± 0,3
Uísque	40,0	39,9 ± 0,4
Tequila	39,0	38,5 ± 0,4
Destilada	39,0	38,5 ± 0,4

^a As medidas foram realizadas em triplicata

VI.5.5.1. Testes de Recuperação

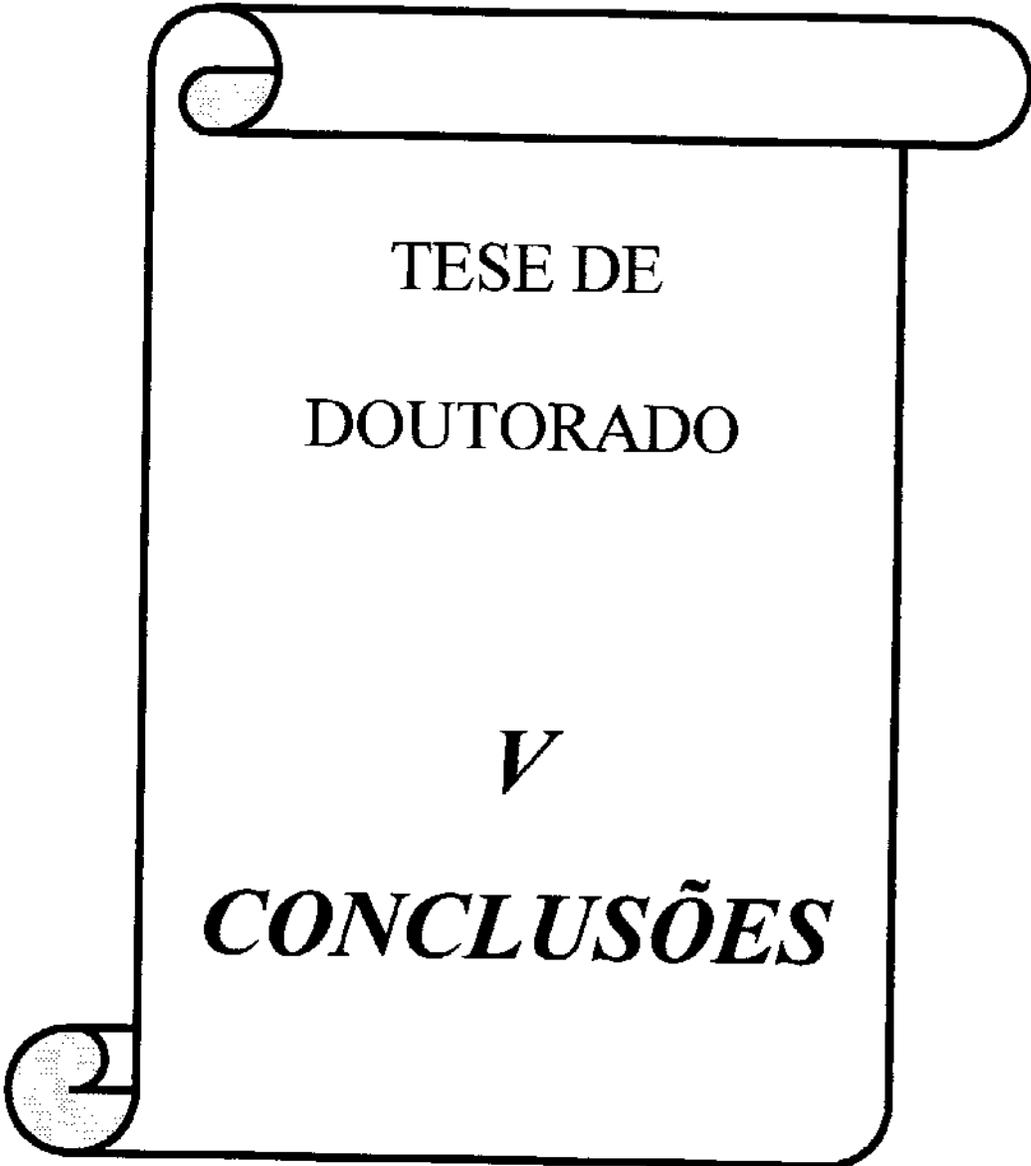
Na **Tabela IV.14** encontram-se os valores de recuperação para o biossensor aplicado em diferentes bebidas. Por estes testes pode-se concluir que a matriz da amostra não interfere significativamente na resposta do biossensor, evidenciando alta seletividade para com o analito.

Tabela IV.14. Porcentagem de recuperação em diferentes amostras obtida com o biossensor

Bebida	Adicionado (mM)	Recuperado (mM)	Recuperação ^a (%)
Vinho Tinto	5,00	4,86 ± 0,2	97,2 ± 3
Cerveja	5,00	4,78 ± 0,2	95,6 ± 3
Uísque	5,00	4,94 ± 0,1	98,7 ± 2
Tequila	5,00	4,96 ± 0,1	99,1 ± 2
Destilada	5,00	4,92 ± 0,1	98,3 ± 2

^a As medidas foram realizadas em triplicata

Com estas características, o biossensor desenvolvido evidencia-se como uma boa alternativa para a determinação de etanol em bebidas, levando-se em conta que não é necessária a adição de nenhum reagente durante as análises. Isto torna muito mais simples e rápida a determinação da concentração alcoólica destas bebidas, o que é de interesse dos fabricantes e dos órgãos de controle.



TESE DE
DOUTORADO

V
CONCLUSÕES

V. CONCLUSÕES GERAIS

i) Conclusões sobre as Propriedades Eletroquímicas dos Sensores Desenvolvidos

Na primeira etapa do projeto, verificou-se que a sílica gel modificada com óxido de nióbio apresenta-se como uma matriz eficaz para o desenvolvimento de sensores a base de pasta de carbono. A modificação da superfície da sílica gel se deu de forma efetiva, pois a matriz de SN tornou-se um eficiente suporte para a adsorção dos mediadores de elétrons, proporcionando grande estabilidade aos sensores contendo os mediadores de elétrons AM, AN e AT.

Após a adsorção na matriz de SN, os mediadores utilizados apresentaram algumas mudanças em suas propriedades eletroquímicas, quando comparadas com o comportamento eletroquímico livre em solução.

O deslocamento do potencial formal para valor mais positivo, a minimização do efeito do pH da solução sobre o potencial formal e a separação de picos são importantes características observadas nos eletrodos modificados. Associada a estas novas propriedades, a alta estabilidade e o baixo potencial do par redox para os mediadores imobilizados fazem destes eletrodos excelentes dispositivos para promoverem a eletrooxidação do NADH em potenciais baixos.

ii) Conclusões sobre os estudos eletrocatalíticos e cinéticos envolvendo o cofator NADH

Os estudos eletrocatalíticos e cinéticos do NADH empregando os sensores desenvolvidos comprovaram a grande eficiência dos mediadores AM, AN e AT em mediar a transferência de elétrons envolvendo a molécula de NADH. A pasta de carbono juntamente com a matriz de SN constituem-se em excelentes ambientes para a elaboração de sensores capazes de promover a detecção de NADH, com ótima sensibilidade e estabilidade, mesmo quando empregando sistemas mais "agressivos" como o eletrodo de disco rotatório, usado nos estudos cinéticos.

A partir dos sensores desenvolvidos, foi possível operar a célula eletroquímica durante a eletrooxidação do NADH, aplicando potencial de 0,0 mV vs ECS para os sensores EPC/SNAM e EPC/SNAT, o que amplia bastante a possibilidade de uso destes sensores em amostras complexas, pois, nestes potenciais o sensor torna-se muito menos sensível à possíveis interferentes.

A avaliação dos parâmetros analíticos destes sensores mostrou que são ótimos dispositivos para a determinação de NADH, com ampla faixa de resposta linear, como por exemplo $1,0 \cdot 10^{-5}$ a $7,5 \cdot 10^{-4}$ obtida para o EPC/SNAM. Merece destaque a alta estabilidade destes sensores, pois não foi observada qualquer diminuição da corrente mesmo após várias horas de uso. Com estes mesmos sensores, é possível realizar mais de 300 determinações, com desvio padrão relativo inferior a 3 %.

Desta forma, os sensores desenvolvidos comprovam que a utilização de mediadores de elétrons do tipo fenoxazinas e fenotiazinas, adsorvidos numa matriz adequada como a sílica gel modificada com óxido de nióbio, apresenta-se como sistemas eficazes na determinação de NADH, com ótimas perspectivas de desenvolvimento de biossensores NADH dependentes.

Os estudos cinéticos indicaram a formação de um complexo de transferência de carga, CT-complexo, entre o mediador e o NADH, constatado pela grande correlação do k_{obs} com a concentração de NADH na solução.

A cobertura da superfície do eletrodo com os mediadores adsorvidos, Γ , apresentou valores muito próximos para toda faixa de pH estudada, enquanto observa-se uma variação na velocidade de reação, pois k_{obs} aumenta com a diminuição da concentração de H^+ . Este comportamento evidencia que a quantidade de grupos mediadores imobilizados na superfície de SN é suficientemente alta, não afetando a velocidade da reação.

O número de elétrons transferidos no sistema confirma a previsão da transferência de dois elétrons quando fenoxazinas são usadas como mediadores de elétrons.

O $k_{obs,[NADH] \rightarrow 0}$ aumenta com o aumento do pH na solução. Possivelmente este comportamento é devido ao aumento da diferença de potencial eletroquímico

do par redox NAD^+/NADH e do mediador adsorvido na matriz de SN. Isto pode ser afirmado, pois em estudos anteriores foi observado que o potencial formal do AM e AN adsorvido na matriz de SN praticamente não são afetados nesta faixa de pH.

Quanto aos valores de K_M^{ap} , estes são menores quando comparados a sistemas similares. Estes valores sugerem grande afinidade do mediador na eletrooxidação do NADH.

Os estudos eletrocatalíticos e cinéticos do NADH comprovaram a grande eficiência dos corantes orgânicos AM, AN e AT em mediar a transferência de elétrons envolvendo a molécula de NADH. A pasta de carbono juntamente com a matriz de SN formam um ótimo sistema para o desenvolvimento de sensores para NADH.

iii) Conclusões sobre o biossensor para álcool

O dispositivo demonstrou que é possível o desenvolvimento de biossensores NADH dependente com excelente sensibilidade e estabilidade.

Inicialmente a combinação do eletrodo de pasta de carbono modificado com a matriz de SNAM gerou o sensor EPC/SNAM, com elevada capacidade de promover a oxidação eletrocatalítica do NADH em baixo potencial, superando assim um grande obstáculo, pois o NADH exige elevado potencial de oxidação, inviabilizando sua aplicação analítica. Esta capacidade apresentada por este sensor foi mantida no biossensor empregando a enzima álcool desidrogenase, o qual opera com excelente sensibilidade para etanol, aplicando potencial de 0,0 mV vs ECS.

Outra importante característica deste biossensor é o fato de todos os reagentes, incluindo o cofator NAD^+ , serem adicionados diretamente na pasta de carbono, tornando o biossensor apto a determinar a concentração de álcool sem prévia preparação da amostra. Isto é uma grande vantagem, pois facilita sua aplicação tanto pela simplicidade quanto pela economia nos custos e contribuição para uma química "limpa".

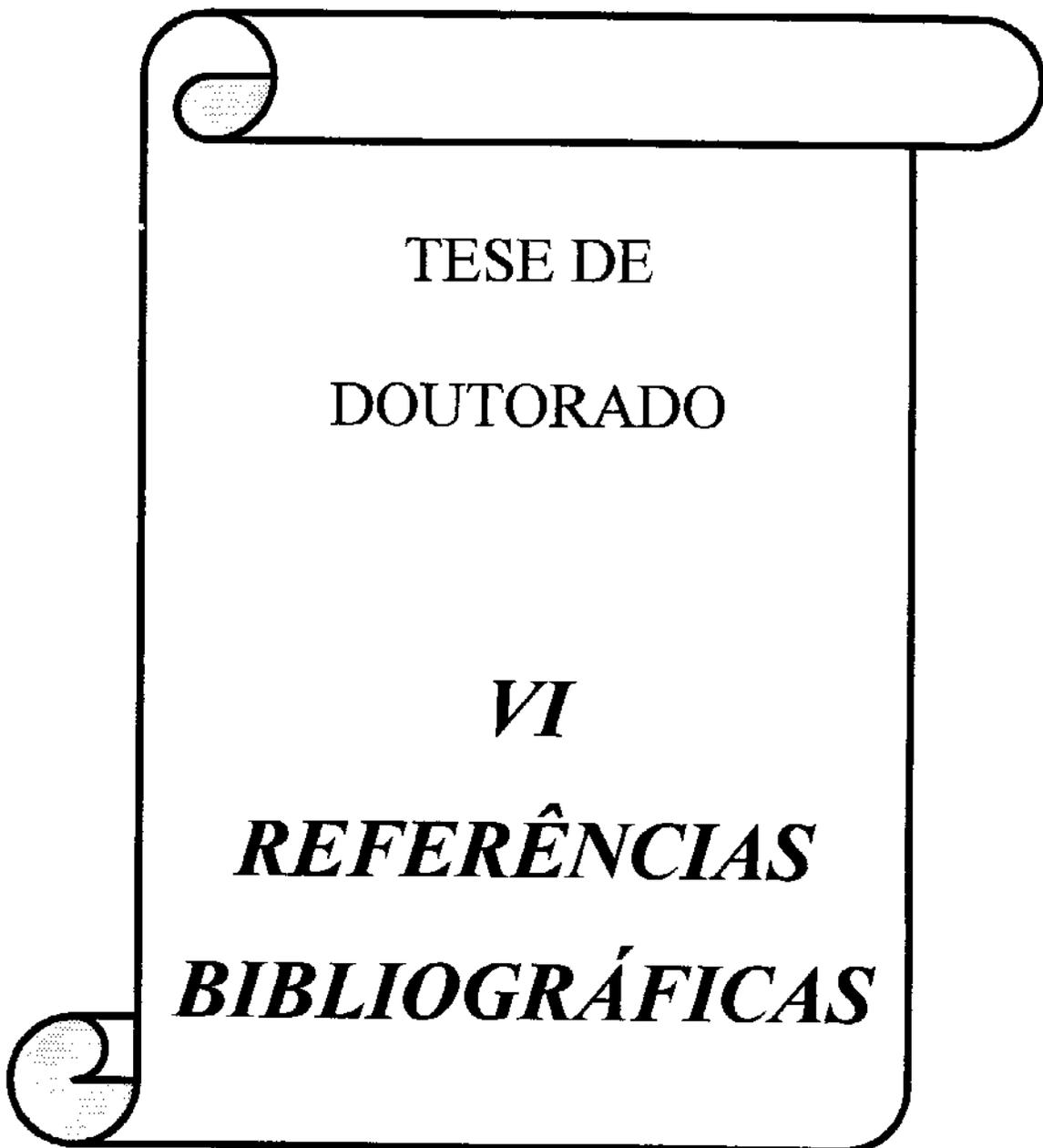
Os parâmetros analíticos alcançados com este biossensor são significativamente melhores quando comparados a outros sensores para álcool etílico. A sensibilidade ($2,28 \mu\text{A cm}^{-2} \text{mmol L}^{-1}$), o amplo intervalo de resposta linear (0,1 a 9mmol L^{-1}), o tempo de resposta (0,6 s), associados ao potencial aplicado de 0 mV vs ECS o credencia como um promissor dispositivo para determinação de álcool etílico.

A estabilidade do biossensor também é ótima, podendo-se realizar várias medidas, pelo menos 300 determinações, utilizando-o por mais de 80 dias, bastando estocá-lo em geladeira.

O biossensor quando empregado na determinação da concentração de álcool em diferentes bebidas alcoólicas demonstrou excelente performance. Em todos os testes, cerveja, vinho tinto, uísque, tequila e bebidas destiladas, os resultados ficaram bem próximos dos valores nominais.

O biossensor também foi avaliado frente aos testes de recuperação, apresentando excelentes resultados. Para todas as bebidas avaliadas, os índices de recuperação ficaram próximos de 100 % com desvio inferior a 3 %, mostrando que a matriz da amostra não interfere significativamente na resposta do biossensor. Este comportamento evidencia a alta seletividade do biossensor para etanol.

Como visto, o biossensor proposto além de comprovar que a estratégia elaborada para a construção de biossensores a base de enzimas NADH dependentes foi correta e bem sucedida, resultou num ótimo dispositivo para determinação da concentração de álcool etílico em diferentes matrizes e com excelente estabilidade.



TESE DE
DOUTORADO

VI
REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abel, P.U., Von, W.T.; **"Biosensors for in vivo glucose measurement: can we cross the experimental stage"** *Biosens. Bioelectron.*, **17** (2002) 1059-1070.
2. Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Ozkan, Z., Ozsoz, M.; **"Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA"** *Electrochem. Commun.*, **4** (2002) 705-709.
3. Zayats, M., Raitman, O.A., Chegel, V.I., Kharitonoy, A.B., Willner, I.; **"Probing antigen-antibody binding processes by impedance measurements on ion-sensitive field-effect transistor devices and complementary surface plasmon resonance analyses: Development of cholera toxin sensors"** *Anal. Chem.*, **74** (2002) 4763-4773.
4. Wang, J.; **"Real-time electrochemical monitoring: Toward green analytical chemistry"** *Acc. Chem. Res.*, **35** (2002) 811-816.
5. Marazuela, M.D., Moreno-Bondi, M.C.; **"Fiber-optic biosensors - an overview"** *Anal. Bioanal. Chem.*, **372** (2002) 664-682.
6. Lund, H.; **"A century of organic electrochemistry"** *J. Electrochem. Soc.*, **149** (2002) S21-S33.
7. Xu, F., Wang, L., Gao, M.N., Jin, L.T., Jin, J.Y.; **"Amperometric sensor for glucose and hypoxanthine based on a Pd-IrO₂ modified electrode by a co-crosslinking bienzymic system"** *Talanta*, **57** (2002) 365-373.
8. Pravda, M., O'Halloran, M.P., Kreuzer, M.P., Guilbault, G.G.; **"Composite glucose biosensor based on screen-printed electrode bulk modified with Prussian blue and glucose oxidase"** *Anal. Lett.*, **35** (2002) 959-970.
9. Rodriguez, P., Lobo, M.J., Miranda, A.J., Tuñón, P.; **"Modified carbon paste electrodes for flow injection amperometric determination of isocitrate dehydrogenase activity in serum"** *Anal. Biochem.*, **308** (2002) 195-203.

10. Chaubey, A., Malhotra, B.D.; **"Mediated biosensors"** *Biosens. Bioelectron.*, **17** (2002) 441-456.
11. Moser, I., Jobst, G., Urban, G.A.; **"Biosensor arrays for simultaneous measurement of glucose, lactate, glutamate, and glutamine"** *Biosens. Bioelectron.*, **17** (2002) 297-302.
12. Nistor, C., Rose, A., Wollenberger, U., Pfeiffer, D., Emmeus, J.; **"A glucose dehydrogenase biosensor as an additional signal amplification step in an enzyme-immunoassay"** *Analyst*, **127** (2002) 1076-1081.
13. Riccardi, C.S., Costa, P.I., Yamanaka, H.; **"Amperometric immunosensor"** *Quim. Nova*, **25** (2002) 316-320.
14. Skladal, P., Morozova, N.O., Reshetilov, A.N.; **"Amperometric biosensors for detection of phenol using chemically modified electrodes containing immobilized bacteria"** *Biosens. Bioelectron.*, **17** (2002) 867-873.
15. Miscoria, S.A., Barrera, G.D., Rivas, G.A.; **"Analytical performance of a glucose biosensor prepared by immobilization of glucose oxidase and different metals into a carbon paste electrode"** *Electroanalysis*, **14** (2002) 981-987.
16. Gibson, T.D.; **"Biosensors: The stability problem"** *Analisis*, **27** (1999) 630-638.
17. Tzang, C.H., Yuan, R., Yang, M.S.; **"Voltammetric biosensors for the determination of formate and glucose-6-phosphate based on the measurement of dehydrogenase-generated NADH and NADPH"** *Biosens. Bioelectron.*, **16** (2001) 211-219.
18. Bartlett, P.N., Simon, E., Toh, C.S.; **"Modified electrodes for NADH oxidation and dehydrogenase-based biosensors"** *Bioelectrochemistry*, **56** (2002) 117-122.
19. Lobo, M.J., Miranda, A.J., Tuñón, P.; **"Amperometric biosensors based on NAD(P)-dependent dehydrogenase enzymes"** *Electroanalysis*, **9** (1997) 191-202.

20. Katakis, I., Dominguez, E.; "Catalytic electrooxidation of NADH for dehydrogenase amperometric biosensors" *Mikrochim. Acta*, **126** (1997) 11-32.
21. Gorton, L., Dominguez, E.; "Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator-modified electrode" *Rev. Mol. Biotechnol.*, **82** (2002) 371-392.
22. Munteanu, F.D., Mano, N., Kuhn, A., Gorton, L.; "Mediator-modified electrodes for catalytic NADH oxidation: high rate constants at interesting overpotentials" *Bioelectrochemistry*, **56** (2002) 67-72.
23. Halliwell, C.M., Simon, E., Toh, C.S., Bartlett, P.N., Cass, A.E.G.; "Immobilization of lactate dehydrogenase on poly(aniline)-poly(acrylate) and poly(aniline)-poly(vinyl sulphonate) films for use in a lactate biosensor" *Anal. Chim. Acta*, **453** (2002) 191-200.
24. Yuan, Y., Wang, P., Zhu, G.Y.; "Sol-gel derived carbon ceramic electrode containing methylene blue-intercalated alpha-zirconium phosphate micro particles" *Anal. Bioanal. Chem.*, **372** (2002) 712-717.
25. Wang, P., Yuan, Y., Zhu, G.Y.; "Carbon ceramic electrodes modified with sub-micron particles of new methylene blue (NMB) intercalated alpha-zirconium phosphate" *J. Electroanal. Chem.*, **519** (2002) 130-136.
26. Liu, B.H., Yan, F., Kong, J.L., Deng, J.Q.; "A reagentless amperometric biosensor based on the coimmobilization of horseradish peroxidase and methylene green in a modified zeolite matrix" *Anal. Chim. Acta*, **386** (1999) 31-39.
27. Liu, Z.J., Deng, J.Q., Li, D.; "A new tyrosinase biosensor based on tailoring the porosity of A1(2)O(3) sol-gel to co-immobilize tyrosinase and the mediator" *Anal. Chim. Acta*, **407** (2002) 87-96.
28. Gushikem, Y., Rosatto, S.S.; "Metal oxide thin films grafted on silica gel surfaces: Recent advances on the analytical application of these materials" *J. Braz. Chem. Soc.*, **12** (2001) 695-705.
29. Walcarius, A.; "Electrochemical applications of silica-based organic-inorganic hybrid materials" *Chem. Mater.*, **13** (2001) 3351-3372.

30. Walcarius, A.; "Analytical applications of silica-modified electrodes - A comprehensive review" *Electroanalysis*, **10** (1998) 1217-1235.
31. Qian, J.M., Li, X.X., Suo, A.L.; "Study on immobilization of glucose oxidase on aminated silica gel" *Prog. Biochem. Biophys.*, **29** (2002) 394-397.
32. Rosatto, S.S., Sotomayor, P.T., Kubota, L.T., Gushikem, Y.; "SiO₂/Nb₂O₅ sol-gel as a support for HRP immobilization in biosensor preparation for phenol detection" *Electrochim. Acta*, **47** (2002) 4451-4458.
33. Blaedel, W.J., Jenkins, R.A.; "Study of electrochemical oxidation of reduced nicotinamide adenine-dinucleotide" *Anal. Chem.*, **47** (1975) 1337-1343.
34. Schlereth, D.D., Katz, E., Schmidt, H.-L.; "Surface-modified gold electrodes for electrocatalytic oxidation of NADH based on the immobilization of phenoxazine and phenothiazine-derivatives on self-assembled monolayers" *Electroanalysis*, **7** (1995) 46-53.
35. Ohtani, M., Kuwabata, S. e Yoneyama, H.; "Electrochemical oxidation of reduced nicotinamide coenzymes at Au electrodes modified with phenothiazine derivative monolayers" *J. Electroanal. Chem.*, **422** (1997) 45-54.
36. Malinauskas, A., Ruzgas, T., Gorton, L.; "Electrochemical study of the redox dyes Nile Blue and Toluidine Blue adsorbed on graphite and zirconium phosphate modified graphite" *J. Electroanal. Chem.*, **484** (2000) 55-63.
37. Molina, C.R., Boujtita, M., El Murr, N.; "A carbon paste electrode modified by entrapped Toluidine Blue-O for amperometric determination of L-lactate" *Anal. Chim. Acta*, **401** (1999) 155-162.
38. Persson, B., Gorton, L.; "A comparative-study of some 3,7-diaminophenoxazine derivatives and related-compounds for electrocatalytic oxidation of NADH" *J. Electroanal. Chem.*, **292** (1990) 115-138.

39. Wang, J.; **"Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges"** *Electroanalysis*, **13** (2001) 983-988.
40. Sprules, S.D., Hart, J.P., Wring, S.A. Pittson, R.; **"A reagentless, disposable biosensor for lactic-acid based on a screen-printed carbon electrode containing meldolas-blue and coated with lactate dehydrogenase, NAD⁺ and cellulose-acetate"** *Anal. Chim. Acta*, **304** (1995) 17-24.
41. Janata, J., *Principles of chemical sensors*, New York, Plenum (1989).
42. Kay. L., **"Auditory perception of objects by blind persons, using a bioacoustic high resolution air sonar"** *J. Acoust. Soc. Am.*, **107**, (2000) 3266.
43. Fairaill, C.W., Hare, J.E., Edson, J.B., McGills, W., **"Parameterization and micrometeorological measurement of air-sea gas transferairail"** *Bound-Lay Meteorol.*, **96** (2000) 63-105.
44. Weetall, H.H., **"Chemical sensors and biosensors, update, what, where, when and how"** *Biosens. Bioelectron.*, **14** (1999) 237-242.
45. Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A. Wilson, G.S.; **"Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification"** *Biosens. Bioelectron.*, **16** (2001) 121-131.
46. Eiggins, B.R., *Biosensors: an introduction*, John Wiley & Sons, New York (1999).
47. Kim, K., Minamitani, H., **"Active optical poly(vinylchloride) thin-film waveguide ion sensor"** *Opt. Rev.*, **7** (2000) 152-157.
48. Tressler, J.F., Alkoy, S., Newnham, R.E., **"Piezoelectric sensors and sensors materials"** *J. Electroceram.*, **2** (1998) 157- 172.
49. Mosbach, K., **"Thermal biosensors"** *Biosens. Bioelectr.*, **6** (1991) 179.182.
50. Wilkins, E., Atanasov, P.; **"Glucose monitoring: State of the art and future possibilities"** *Med. Eng. Phys.*, **18** (1996) 272-288.
51. Avramescu, A., Andreescu, S., Noguier, T., Bala. C., Andreescu, D., Marty, J.L.; **"Biosensors designed for environmental and food quality control"**

- based on screen-printed graphite electrodes with different configurations" *Anal. Bioanal. Chem.*, **374** (2002) 25-32.
52. Fernandes, J.C.B., Kubota, L.T., Oliveira Neto, G.; "Potentiometric biosensor for L-ascorbic acid based on ascorbate oxidase of natural source immobilized on ethylene-vinylacetate membrane" *Anal. Chim. Acta*, **385** (1999) 3-12.
53. Torabi, F., Ramanathan, K., Larsson, P.-O., Gorton, L., Svanberg, K., Okamoto, Y., Danielsson, B., Khayyami, M.; "Coulometric determination of NAD⁺ and NADH in normal and cancer cells using LDH, RVC and a polymer mediator" *Talanta*, **50** (1999) 787-797.
54. Losada, J., Armada, M.P.G.; "An amperometric sensor based on covalent immobilization of glucose oxidase in electropolymerized chloranil-N-aminopyrrole films" *Electroanalysis*, **13** (2001) 1016-1021.
55. Oni, J., Westbroek, P., Nyokong, T.; "Voltammetric detection of vitamin B-1 at carbon paste electrodes and its determination in tablets" *Electroanalysis*, **14** (2002) 1165-1168.
56. Labuda, J.; "Chemically modified electrodes as sensors in analytical-chemistry" *Selective Elect. Rev.* **14** (1992) 33-86.
57. Moses, P.R., Wier, P., Murray, R.W. "chemically modified tin oxide electrode" *Anal. Chem.*, **47** (1975) 1882-1886.
58. Pereira, A.C., Santos, A.S., Kubota, L.T.; "Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroquímicas" *Quim. Nova*, **25** (2002) 1012-1021.
59. Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S.; *Biotechnology*, Weinheim, V.C.H (1987) .
60. Song, F-Y., Shiu, K-K.; "Preconcentration and electroanalysis of silver species at polypyrrole film modified glassy carbon electrodes" *J. Electroanal. Chem.*, **498** (2001) 161-170.
61. Ijeri, V.S., Srivastava, A.K.; "Voltammetric determination of lead at chemically modified electrodes based on crown ethers" *Anal. Sci.*, **17** (2001) 605-608.

62. Bi, S.P., Chen, G., Liu, J., Zou, G.W., Gan, N.; **"Differential-pulse voltammetric determination of aluminum in water by a pyrocatechol violet modified electrode"** *Acta Chim. Sinica*, **58** (2000) 494-499.
63. Borgo, C.A., Ferrari, R.T., Colpini, L.M.S., Costa, C.M.M., Baesso, M.L.; Bento, A.C.; **"Voltammetric response of a copper(II) complex incorporated in silica-modified carbon-paste electrode"** *Anal. Chim. Acta*, **385** (1999) 103-109.
64. Liu, Y.C, Hwang, B.J, Tzeng, I.J **"Improvements in sensitivity and in anti-aging of Pt/C/Nafion((R)) gases sensors modified by chromium"** *J. Electroanal Chem.*, **533** (2002) 85-90.
65. Murimboh, J., Lam, M.T., Hassan, N.M., Chakrabarti, C.L.; **"A study of Nafion-coated and uncoated thin mercury film-rotating disk electrodes for cadmium and lead speciation in model solutions of fulvic acid"** *Anal. Chim. Acta*, **423** (2000)115-126.
66. Sotomayor, M.D.T., Tanaka, A.A., Kubota, L.T.; **"Development of an amperometric sensor for phenol compounds using a Nafion (R) membrane doped with copper dipyriddy complex as a biomimetic catalyst"** *J. Electroanal. Chem.*, **536** (2002) 71-81.
67. Nelson, A.; **"Influence of biologically active compounds on the monomolecular gramicidin channel function in phospholipid monolayers"** *Langmuir*, **12** (1996) 2058-2067.
68. Thangamuthu, R., Pillai, K.C.; **"Electrocatalytic oxidation of ascorbic acid at poly(4-vinylpyridine) modified electrode"** *Bull. Electrochem.*, **15** (1999) 481-484.
69. Malinauskas, A., Ruzgas, T., Gorton, L.; **"Electrocatalytic oxidation of coenzyme NADH at carbon paste electrodes, modified with zirconium phosphate and some redox mediators"** *J. Colloid Interface Sci.*, **224** (2000) 325-332.
70. Pournaghi-Azar, M.H, Ojani, R.; **"Electrochemistry and electrocatalytic activity of polypyrrole/ferrocyanide films on a glassy carbon electrode"** *J. Sol. State Electrochem.*, **4** (2000) 75-79.

71. Perez, E.F., Oliveira Neto, G., Tanaka, A.A., Kubota, L.T.; **“Electrochemical sensor for hydrazine based on silica modified with nickel tetrasulfonated phthalocyanine”** *Electroanal.*, **10** (1998) 111-115.
72. Peixoto, C.R.M., Gushikem, Y., Kubota, L.T.; **“Use of ruthenium-(ethylenedinitrito)-tetraacetic acid monohydrate ion immobilized on zirconium(IV) oxide coated silica gel surface as an amperometric sensor for oxygen in water”** *Anal. Proc.*, **32** (1995) 503-505.
73. Florou, A.B., Prodomidis, M.I., Tzouwara-Karayanni, S.M.; **“Electrocatalysis of sulphide with a cellulose acetate film bearing 2,6-dichlorophenolindophenol. Application to sewage using a fully automated flow injection manifold”** *Talanta*, **52** (2000) 465-472.
74. Sun, W.L., Kong, J.L., Deng, J.Q.; **“Electrocatalytic activity of riboflavin chemically modified electrode toward dioxygen reduction”** *Anal. Lett.*, **29** (1996) 2425-2439.
75. Sun, W.L., Kong, J.L., Deng, J.Q.; **“Electrocatalytic reduction of hemoglobin at a chemically modified electrode containing riboflavin”** *Electroanalysis*, (1997) **9** 115-119.
76. Kitani, A., So, Y-H., Miller, L.L.; **“An electrochemical study of the kinetics of NADH being oxidized by diimines derived from diaminobenzenes and diaminopyrimidines”** *J. Am. Chem. Soc.*, **103** (1981) 7636-7641.
77. Ottaway, J.M., *the Indicators*, Ed. Bishop, Pergamon, E., Oxford, (1972) 498.
78. Albareda-Sirvent, M., Merkoci, A., Alegret, S.; **“Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review”** *Sensor Actuat B-Chem.*, **69** (2000) 153-163.
79. Cheng, T.J., Lin, T.M., Chang, H.C.; **“Physical adsorption of protamine for heparin assay using a quartz crystal microbalance and electrochemical impedance spectroscopy”** *Anal. Chim. Acta*, **462** (2002) 261-273.

80. Downard, A.J.; **"Electrochemically assisted covalent modification of carbon electrodes"** *Electroanalysis*, **12** (2000) 1085-1096.
81. Ratner, B.D.; **"Surface modification of polymers - chemical, biological and surface analytical challenges"** *Biosens. Bioelectron.*, **10** (1995) 797-804.
82. Huang, H., Hu, N.F., Zeng, Y.H., Zhou, G.; **"Electrochemistry and electrocatalysis with heme proteins in chitosan biopolymer films"** *Anal. Biochem.*, **308** (2002) 141-151.
83. Aydin, G., Celebi, S.S., Ozyoruk, H., Yildiz, A.; **"Amperometric enzyme electrode for L(+)-lactate determination using immobilized L(+)-lactate oxidase in poly(vinylferrocenium) film"** *Sensors Actuat. B-Chem.*, **87** (2002) 8-12.
84. Koopal, C.G.J., Feiters, M.C., Nolte, R.J.M., Deruiter, B., Schasfoort, R.B.M.; **"3rd-generation amperometric biosensor for glucose - polypyrrole deposited within a matrix of uniform latex-particles as mediator"** *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **29** (1992) 159-175.
85. Gerard, M., Chaubey, A. Malhotra, B.D.; **"Application of conducting polymers to biosensors"** *Biosens. Bioelectron.*, **17** (2002) 345-359.
86. Lu, W., Wallace, G.G., Imisides, M.D.; **"Development of conducting polymer modified electrodes for the detection of phenol"** *Electroanalysis*, **14** (2002) 325-332.
87. Brett, A.M.O., Brett, C.M.A.; *Electroquímica – Princípios, Métodos e Aplicações*; Oxford University Press, New York (1993).
88. Jawaheer, S., White, S.F., Rughooputh, S.D.D.V., Cullen, D.C.; **"Enzyme stabilization using pectin as a novel entrapment matrix in biosensors"** *Anal. Chem.*, **35** (2002) 2077-2091.
89. Ramirez-Garcia, S., Alegret, S., Céspedes, F., Forster, R.J.; **"Carbon composite electrodes: surface and electrochemical properties"** *Analyst*, **127** (2002) 1512-1519.
90. Alegret, S.; **"Rigid carbon - Polymer biocomposites for electrochemical sensing - A review"** *Analyst*, **121** (1996) 1751-1758.

91. Svancara, I., Vytras, K., Barek, J., Zima, J.; **“Carbon paste electrodes in modern electroanalysis”** *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **31** (2001) 311-345.
92. Kinoshita, K., *Carbon: Electrochemical and Physicochemical Properties*, Wiley, New York (1988).
93. Gorton, L.; **“Carbon-paste electrode modified with enzymes, tissues and cells”** *Electroanalysis*, **7** (1995) 23-45
94. Wang, S.W., Guo, J.K., Huang, X.X., Li, B.S.; **“Morphological evolution of ZrO_2 - SiO_2 composite gel and stability of tetragonal ZrO_2 ”** *Mater. Lett.*, **25** (1995) 151-155.
95. Miller, J.B., Ko, E.I.; **“Acidic properties of silica-containing mixed oxide aerogels: Preparation and characterization of zirconia-silica and comparison to titania-silica”** *J. Catal.*, **159** (1996) 58-68.
96. Dryfe, R.A.W., Holmes, S.M.; **“Zeolitic rectification of electrochemical ion transfer”** *J. Electroanal. Chem.*, **483** (2000) 144-149.
97. Walcarius, A.; **“Zeolite-modified electrodes in electroanalytical chemistry”** *Anal. Chem.*, **384** (1999) 1-16.
98. Liu, B.H., Liu, Z.J., Chen, D.D., Dong, J.L., Deng, J.Q.; **“An amperometric biosensor based on the coimmobilization of horseradish peroxidase and methylene blue on a beta-type zeolite modified electrode”** *Fresen. J Anal. Chem.*, **367** (2000) 539-544.
99. Walcarius, A., Rozanska, S., Bessiere, J., Wang, J.; **“Screen-printed zeolite-modified carbon electrodes”** *Analyst*, **124** (1999) 1185-1190.
100. Jiang, Y.X., Zou, M.Z., Yuan, K., Xu, H.D.; **“The electrochemical behavior of iron(III) incorporated in zeolite Y-modified electrode and the catalytic oxidation of ascorbic acid”** *Electroanalysis*, **11** (1999) 254-259.
101. Updike, S.J., Hichs, G.P.; **“Enzyme electrode”** *Nature*, **214** (1967) 986-997.
102. Bicketstaff, G. *Immobilization of enzymes and cells methods in biotechnology*, Human Press, New Jersey (1997).

103. Samec, Z., Elving, P.J.; **"Anodic-oxidation of dihydronicotinamide adenine-dinucleotide at solid electrodes - mediation by surface species"** *J. Electroanal. Chem.*, **144** (1983) 217-234.
104. Moiroux, J., Elving, P.J.; **"Mechanistic aspects of the electrochemical oxidation of dihydronicotinamide adenine-dinucleotide (NADH)"** *J. Am. Chem. Soc.*, **102** (1980) 6533-6538.
105. Aizawa, M., Coughlin, R.W., Charles, M.; **"Electrochemical regeneration of nicotinamide adenine-dinucleotide"** *Biochim. Biophys. Acta*, **385** (1975) 362-370.
106. Silber, A., Brauchle, C., Hampf, N.; **"Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine-dinucleotide (NADH) at thick-film gold electrode"** *J. Electroanal. Chem.*, **390** (1995) 83-89.
107. Mark, H.B., Attan, N., MA, Y.L., Petticrewm K.L., Zimmer, H., Shi, Y., Lunsford, S.K., Rubinson, J.F., Galal, A.; **"The electrochemistry of neurotransmitters at conducting organic polymer electrode-electrocatalysis and analytical applications"** *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **38** (1995) 229-245.
108. Koncki R **"Chemical sensors and biosensors based on Prussian blues"** *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **31** (2002)79-96
109. Alvarez-Gonzalez, M.I., Saidman, S.A., Lobo M.J., Miranda A.J., Tuñón, P.; **"Electrocatalytic detection of NADH and glycerol by NAD(+)-modified carbon electrodes"** *Anal. Chem.*, **72** (2000) 520-527.
110. Raj, C.R., Ohsaka, T.; **"Electrocatalytic sensing of NADH at an in situ functionalized self-assembled monolayer on gold electrode"** *Electrochem. Commun.*, **3** (2001) 633-638.
111. Voet, D. & Voet, J.; *Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York (1995).
112. Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M.; *Princípios de Bioquímica*, Sarvier, São Paulo (2000).
113. Persson, B.; **"A chemically modified graphite electrode for electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine-**

- dinucleotide based on a phenothiazine derivative, 3-beta-naphthoyl-toluidine blue-O" *J. Electroanal. Chem.*, **287** (1990) 61-80.
114. Fung, Y., Mo, S.; "Determination of Ethanol in beer by flow injection dual-pulse staircase voltammetric detection" *Analyst*, **121** (1996) 369-372.
115. Lobo, M. J., Miranda A. J., Tunon, P.; "Flow-injection analysis of ethanol with an alcohol dehydrogenase-modified carbon past electrode" *Electroanalysis*, **8** (1996) 932-937.
116. Park, J.K., Yee, H.J., Lee, K.S., Lee, W.Y., Shin, M.C., Kim, T.H., Kim, S.R.; "Determination of breath alcohol using a differential-type amperometric biosensor based on alcohol dehydrogenase" *Anal. Chim. Acta*, **390** (1999) 83-91.
117. Boujita, M., Hart, J.P., Pittson, R.; "Development of a disposable ethanol biosensor based on a chemically modified screen-printed electrode coated with alcohol oxidase for the analysis of beer" *Biosens. Bioelectron.*, **15** (2000) 257-263.
118. Patel, N.G., Meier, S., Cammann, K., Cheminitius, G.C.; "Screen-printed biosensors using different alcohol oxidases" *Sens. Actuators, B*, **75** (2001) 101-110.
119. Gulce, H., Gulce, A., Kavanoz, M., Coskun H., Yildiz, A.; "A new amperometric enzyme electrode for alcohol determination" *Biosens. Bioelectron.*, **17** (2002) 517-521.
120. Razumiene, J., Niculescu, M., Ramanavicius, A., Laurinavicius, V., Csoregi, E.; "Conversion of the chemical interaction into electrical signal in planar structure based on dry ADH layer with thin metal film contacts" *Electroanalysis*, **14** (2002) 43-49.
121. Liden, H., Vijayakumar, A.R., Gorton L., Marko-Varga, G.; "Rapid alcohol determination in plasma and urine by column liquid chromatography with biosensor detection" *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17** (1998) 1111-1128.
122. Rang, H.P., Dale, M.M., *Pharmacology*, Churchill Livingstone, Edinburgh (1987).

123. Lee, N.M., Becker, C.E., in *Basic and Clinical Pharmacology*, ed. B. G. Katzung, Appleton and Lange, Norwalk, CT, (1995) 350–360.
124. Lazarova, G. Genova L., Kostov, V.; **“Ethanol concentration determination using solvent-extraction and refractometry”** *Acta Biotechnol.*, **7** (1987) 97-99.
125. Gallignani, M., Garrigues, S., Delaguardia, M.; **“Direct determination of ethanol in all types of alcoholic beverages by near-infrared derivative spectrometry”** *Analyst*, **118** (1993) 1167-1173.
126. Clarkson, S.P., Onnrod, I.H.L., Sharpe, F.R.; **“Determination of ethanol in beer by direct-injection gas-chromatography - a comparison of 6 identical systems”** *J. Inst. Brew.*, **101** (1995) 191-193.
127. Criddle, W.J., in *Ethanol in encyclopedia of analytical science*, ed. A. Townshend, Academic Press, London, vol. 2, (1995).
128. Sutter, K.; **“Determination of ethanol in blood: Analytical aspects, quality control, and theoretical calculations for forensic applications”** *Chimia*, **56** (2002) 59-62.
129. Varadi, M., Adanyi, N.; **“application of biosensor with amperometric detection for determining ethanol”** *Analyst*, **119** (1994) 1843-1847.
130. Marko-Varga, G., Johansson, K., Gorton, L.; **“Enzyme-based biosensor as a selective detection unit in column liquid-chromatography”** *J. Chromatogr. A*, **660** (1994) 153-167.
131. Lobo, M.J., Miranda A.J., Tunon, P.; **“Amperometric detection of D-sorbitol with NAD⁺ -D-sorbitol dehydrogenase modified carbon paste electrode”** *Anal. Chim. Acta.*, **424** (2000) 45-50.
132. Akyilmaz, E., Dinckaya, E.; **“A mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate based alcohol oxidase electrode for alcohol determination in serum”** *Talanta*, **53** (2000) 505-509.
133. Wang, J.; **“Electroanalysis and biosensors”** *Anal. Chem*, **71** (1999) 328R-332R

134. Dinh, T., Cullum, B.; **"Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics"** *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366** (2000) 540-551.
135. Denofre, S., Gushikem, Y., Davanzo, C.U.; **"Adsorption property of Nb (V) oxide grafted on silica gel surface"** *Eur. J. Solid State Inorg. Chem.*, **28** (1991) 1295-1305.
136. Vollet, D.R., Moreira, J.C., Kubota, L.T., Varela, J.A., Gushikem, Y.; **"Small-angle x-ray-scattering study of structural-changes in silica-gel modified with organofunctional groups"** *Colloids Surf.*, **40** (1989) 1-8.
137. Kubota, L.T., Gouvea, F., Andrade, A.N., Milagres, B.G., Oliveira Neto, G.D.; **"Electrochemical sensor for NADH based on Meldola's Blue immobilized on silica gel modified with titanium phosphate"** *Electrochim. Acta*, **41** (1996) 1465-1469.
138. Murray, E.W., in: Bard, A.J. (Ed.), *Electroanalytical Chemistry*, Vol. 13, Marcel Dekker, New York, (1984)191-368.
139. Gorton, L., Torstensson, A., Jaegfeldt, H., Johansson, G.; **"Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide coenzymes by graphite-electrodes modified with an adsorbed phenoxazinium salt, meldola blue"** *Electroanal. Chem.*, **161** (1984) 103-120.
140. Kubota, L.T., Munteanu, F., Roddick-Lanzilotta, A., McQuillan, A.J., Gorton, L.; **"Electrochemical investigation of some aromatic redox mediators immobilised on titanium phosphate"** *Quim. Anal.*, **19** (2000) 15-27.
141. Laviron, E., In: Bard, A.J. (Ed.), *Electroanalytical Chemical*, Vol. 12, Dekker, New York, (1982) 53-157.
142. Springborg, J., Olsen, C.E., Sotofte, I.; **"An inert proton coordinated inside a nearly tetrahedral tetraamine cavity - synthesis and x-ray crystal-structure of the aquatriflorozincate(ii) salt of the inside monoprotonated amine 1,4,8,11-tetraazatricyclo[6.6.2.2(4,11)] octadecane"** *Acta Chem. Scand.*, **49** (1995) 555-563.

143. Bard, A.J., Faulker, L.R.; *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, (1980).
144. Pessoa, C.A., Gushikem, Y., Kubota, L.T.; **“Electrochemical study of methylene blue immobilized in zirconium phosphate”** *Electrocatalysis*, **9** (1997) 800-803.
145. Kubota, L.T., Gorton, L.; **“Electrochemical investigations of the reaction mechanism and kinetics between NADH and riboflavin immobilised on amorphous zirconium phosphate”** *J. Solid State Electrochem.*, **3** (1999) 370-379.
146. Chenault, H.K., Whitesides, G.M.; **“Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic-synthesis”** *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **14** (1987) 147-197.
147. Rover, L., Fernandes, J.C.B., Oliveira Neto, G., Kubota, L.T., Katekawa, E., Serrano, S.H.P.; **“Study of NADH stability using ultraviolet-visible spectrophotometric analysis and factorial design”** *Anal. Biochem.*, **260** (1998) 50-55.
148. Gorton, L.; **“Chemically modified electrodes for the electrocatalytic oxidation of nicotinamide coenzymes”** *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, **82** (1986) 1245-1258.
149. Murray, R.W., *Molecular Design of Electrode Surface*, Wiley-Interscience, New York, (1992).
150. Munteanu, F. D., Kubota, L. T., Gorton, L.; **“Effect of pH on the catalytic electro oxidation of NADH using different two-electron mediators immobilised on zirconium phosphate”** *J. Electroanal. Chem.*, **509** (2001) 2-10.
151. Santos, A.S., Gorton, L., Kubota, L.T.; **“Electrocatalytic NADH oxidation using an electrode based on meldola blue immobilized on silica coated with niobium oxide”** *Electroanalysis*, **14** (2002) 805-812.
152. Elving, P.J., Bresnahan, W.T., Moiroux J., Samec, Z.; **“NAD/NADH as a model redox system - mechanism, mediation, modification by the environment”** *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **9** (1982) 365-378.

153. Pospecu, I.C., Zetterberg, G., Gorton, L.; **"Influence of graphite powder, additives and enzyme immobilization procedures on a mediatorless hrp-modified carbon-paste electrode for amperometric flow-injection detection of H₂O₂"** *Biosens. Bioelectron.*, **10** (1995) 443-461.
154. Amine, A., Kauffmann, J.; **"Preparation and characterization of a fragile enzyme immobilized carbon paste electrode"** *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **28** (1992) 117-125.
155. Yabuki, S., Mizutani, F., Katsura, T.; **"Glucose-sensing carbon paste electrode containing polyethylene glycol-modified glucose-oxidase"** *Biosens. Bioelectron.*, **7** (1992) 695-700.
156. Lutz, M., Burestedt, E., Emnéus, J., Lidén, H., Gobhadi, S., Gorton, L., Marko-Varga, G.; **"Effects of different additives on a tyrosinase based carbon-paste electrode"** *Anal chim. Acta*, **305** (1995) 8-17.
157. Dantoni, P., Serrano, S.H.P., Brett, A.M.o., Gutz, I.G.R.; **"Flow-injection determination of catechol with a new tyrosinase/DNA biosensor"** *Anal. Chim. Acta*, **366** (1998) 137-145.
158. Jönsson-Pettersson, G.; **"Reagentless hydrogen-peroxide and glucose sensors based on peroxidase immobilized on graphite-electrodes"** *Electroanalysis*, **3** (1991) 741-750.
159. Rosatto, S.S., Kubota, L.T., Oliveira-Neto, G.; **"Biosensor for phenol based on the direct electron transfer blocking of peroxidase immobilising on sílica-titanium"** *Anal. Chim. Acta*, **390** (1999) 65-72.
160. Sprules, S.D., Hartley, I.C., Wedge, R., Hart, J.P., Pittson, R.; **"A disposable reagentless screen-printed amperometric biosensor for the measurement of alcohol in beverages"** *Anal. Chim. Acta*, **329** (1996) 215-221.
161. Mullor, S.G., Sánchez-Cabezudo, M., Ordieres, A.J.M., Ruiz, B.L.; **"Alcohol Biosensor Based on Alcohol Dehydrogenase and Meldola blue Immobilized into a Carbon Paste Electrode"** *Talanta*, **43** (1996) 779-784.

162. Tobalina, F., Pariente, F., Hernández, L., Abruña, H.D., Lorenzo, E.;
“Carbon felt composite electrodes and their use in electrochemical sensing: a biosensor based on alcohol deshydrogenase”, *Anal. Chim. Acta*, **358** (1998) 15-25.