

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



**UNICAMP**



1150055559



IQ

T/UNICAMP P414c 1

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**TESE DE DOUTORADO**

***“COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE ALGUNS  
COMPOSTOS ORGÂNICOS ELETROATIVOS IMOBILIZADOS  
EM SUPORTES INORGÂNICOS VISANDO O  
DESENVOLVIMENTO DE SENSORES PARA NADH”***

**ARNALDO CÉSAR PEREIRA**  
ALUNO

**LAURO TATSUO KUBOTA**  
ORIENTADOR

CAMPINAS - SP  
MAIO / 2003

i

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	ICQ
Nº CHAMADA	P414c / UNICAMP
V.	EX
TOMBO BCI	55659
PROC.	16.12703
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	30500,00
DATA	02/09/03
Nº CFD	

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

Bib. vol 299337

P414c	<p>Pereira, Arnaldo César Comportamento eletroquímico de alguns compostos orgânicos eletroativos immobilizados em suportes inorgânicos visando o desenvolvimento de sensores para NADH / Arnaldo César Pereira. -- Campinas, SP: [s.n], 2003.</p> <p align="center">Orientador: Lauro Tatsuo Kubota</p> <p align="center">Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p align="center">1. Eletrodos modificados. 2. Matrizes inorgânicas. 3. Mediadores de elétrons. 4. NADH. I. Kubota, Lauro Tatsuo. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.</p>
-------	---

## DEDICATÓRIA

**A toda a minha família, em especial à  
minha esposa Kátia, pelo amor,  
paciência, carinho e compreensão com  
que sempre me trataram, dedico.**

**“Continue subindo a montanha da alegria, espalhando diariamente as sementes da delicadeza, ao longo do caminho, da melhor forma que puder e, se os nevoeiros ocultarem o topo da montanha, continue intrépido e você atingirá os cumes cheios de sol em sua própria experiência de vida”**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me abençoar e ajudar em mais esta conquista.

Ao Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota, pela amizade, orientação, competência e apoio oferecidos durante a realização deste trabalho.

Ao meu grande amigo Antonio de Santana Santos (Jequié), pelos bons momentos de convivência profissional e pessoal.

Aos meus amigos do IQ/UNICAMP: Jose, José Ricardo, Renato Rosseto, Antenor, José Celso e Daniel.

Aos companheiros de Laboratório: Renato, Alaécio, Flávio, Altair, Percy, Paulo, Renata, Bárbara, Karin, Larissa, Lucilene, Tânia, Pilar e Rosângela.

Aos colegas que passaram por este Laboratório: Erik, Júlio, Laércio, Cesinha, Walter, Beth, Simone e Miyuki.

Ao pessoal dos demais grupos do Laboratório (Bertran e Ronei).

Aos meus amigos de Mogi-Mirim.

Ao Instituto de Química da UNICAMP pela estrutura oferecida e possibilidade da realização deste trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca do IQ pela disponibilidade oferecida.

Ao pessoal da CPG pela eficiência no desenvolvimento de suas funções.

A FAPESP pela bolsa e auxílios concedidos.

## DADOS CURRICULARES

### 1. Dados Pessoais

**Nome:** Arnaldo César Pereira

**Data de nascimento:** 27/06/1973

**Filiação:** João Batista Pereira

**Estado civil:** Casado

Neide Pigozzi Pereira

**Nacionalidade:** Brasileira

**Naturalidade:** Itapira-SP

### 2. Formação

#### 2.1. Segundo Grau

E.E.P.S.G. "Monsenhor Nora" Início: 1988 / Conclusão: 1990. Local: Mogi Mirim/SP

#### 2.2. Curso Superior

##### ***Bacharel em Química***

Universidade Estadual Paulista - UNESP. Início: Março de 1992 / Conclusão: Dezembro de 1995.

#### 2.3. Pós-graduação

##### **Mestrado em Química Analítica**

Local: Universidade Estadual Paulista-UNESP

Título da dissertação: "Modificação da Superfície de Microeletrodos para a Determinação de Ácido Isocítrico".

Início: Março de 1996 / Conclusão: Agosto de 1998

#### 2.4 Participação e Trabalhos Apresentados em Congressos e Eventos Científicos no País e no Exterior Durante a Realização do Mestrado

##### **2.4.1 No País**

- Participou do "XXXVI Congresso Brasileiro de Química" realizado no período de 01 a 05 de setembro de 1996, em São Paulo, tendo frequentado o I Workshop sobre Sensores Químicos e Biossensores, com 8 horas de duração.

- Participou da “20ª Reunião Anual da SBQ”, realizado no período de 24 a 27 de maio de 1997 em Poços de Caldas - MG, tendo apresentado o trabalho: “MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO MICROELETRODO Pt-Ir PARA MEDIDAS DE NADPH”, sob a forma de painel.

- Participou do “9º ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA”, realizado no período de 31 de agosto a 03 de setembro de 1997 em São Carlos - SP, tendo apresentado o trabalho “CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ARRANJOS DE MICROELETRODOS”, sob a forma de painel.

- Participou da “21ª Reunião Anual da SBQ”, realizada no período de 25 a 28 de maio de 1998 em Poços de Caldas - MG, tendo apresentado o trabalho: “ESTUDO DE DIFERENTES MEDIADORES PARA A COENZIMA NADH”, sob a forma de painel.

#### **2.4.2 No Exterior**

- “7th EUROPEAN CONFERENCE ON ELECTROANALYSIS” - ESEAC'98, realizada na Universidade de Coimbra em Coimbra - Portugal, no período de 24 a 28 de maio de 1998, tendo apresentado o trabalho : “Pt-Ir MICROELECTRODE MODIFICATION FOR ISOCITRATE DETERMINATION”, sob a forma oral pela co-autora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. HIDEKO YAMANAKA.

### **2.5. Participação e Trabalhos Apresentados em Congressos e Eventos Científicos no País e no Exterior Durante a Realização do Doutorado**

#### **2.5.1 No País**

Participação na 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, realizada no período de 23 a 26 de maio de 2000, na cidade de Poços de Caldas – MG, onde apresentou os trabalhos intitulados: “OTIMIZAÇÃO DA PREPARAÇÃO DE ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO CONTENDO RIBOFLAVINA (VITAMINA B<sub>2</sub>) IMOBILIZADA EM SUPORTE INORGÂNICO” e “OTIMIZAÇÃO

DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE NA DETERMINAÇÃO  
ESPECTROFOTOMÉTRICA DE GLUTATIONA REDUZIDA”

Participação no XII SIBEE (Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica), realizado no período de 22 a 26 de Abril de 2001, na cidade de Gramado / RS, onde apresentou os trabalhos intitulados: “DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE VELOCIDADE DE TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS DA RIBOFLAVINA ADSORVIDA EM SUPORTE INORGÂNICO” (apresentação oral) e “ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO VERDE DE METILENO ADSORVIDO EM SÍLICA GEL MODIFICADA” (apresentação em painel)

Participação no XI ENQA (Encontro Nacional de Química Analítica), realizado no período de 18 a 21 de Setembro de 2001, na cidade de Campinas / SP (UNICAMP), onde apresentou os trabalhos intitulados: “CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DE FAD ADSORVIDA EM SÍLICA GEL MODIFICADA COM ÓXIDO DE NIÓBIO (V)” e “ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO E CATALÍTICO DE AZUL DE TOLUIDINA ADSORVIDO EM SÍLICA-Nb”

### **2.5.2 No Exterior**

Participação no XV SIBAE (Congresso da Sociedade Ibero-Americana de Electroquímica), realizado no período de 08 a 13 de Setembro de 2002, na cidade de Évora/Portugal, onde apresentou os trabalhos intitulados: “o-FENILENODIAMINA (FDA) ADSORVIDA EM  $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$  : ESTUDO ELETROQUÍMICO E ELETROCATALÍTICO” e “BIOSSENSOR PARA ÁLCOOL ALTAMENTE ESTÁVEL A BASE DE SÍLICA GEL MODIFICADA COM ÓXIDO DE NIÓBIO”

### 3. Trabalhos Científicos

#### 3.1. Publicados:

1. Pereira, A.C.; de Oliveira Neto, G.; Fertoni, F.L.; Kubota, L.T.; Yamanaka, H.; **“Reagentless biosensor for Isocitrate using one step modified Pt-Ir microelectrode”**, *Talanta*, **53** (2001) 801-806.
2. Santos, A.S., Pereira, A.C., Kubota, L.T.; **“Electrochemical and electrocatalytic studies of tuldine blue immobilized on a silica gel surface coated with niobium oxide”**, *J. Braz. Chem. Soc.*, **13** (2002) 495-501.
3. 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.
4. Pereira, A.C., Santos, A.S., Kubota, L.T.; **“Tendências em modificações de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas”** *Quim. Nova*, **25** (2002) 1012-1021.

#### 3.2. Submetidos para publicação

1. Pereira, A.C.; Santos, A.S. e Kubota, L.; **“Electrochemical behavior of immobilized Riboflavin on different matrices”** *Journal of the Colloid and Interface Science.*, aceito para publicação.
2. Pereira, A.C.; Santos, A.S. e Kubota, L.; **“o-phenylenediamine (PDA) adsorbed onto silica gel modified with niobium oxide for electrocatalytic oxidation of NADH”** *Electrochimica Acta*, aceito para publicação.

---

**Arnaldo César Pereira**

## RESUMO

**Título:** “Comportamento Eletroquímico de Alguns Compostos Orgânicos Eletroativos Imobilizados em Suportes Inorgânicos Visando o Desenvolvimento de Sensores para NADH”.

**Autor:** Arnaldo César Pereira

**Orientador:** Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

**Palavras-chave:** Eletrodos modificados, matrizes inorgânicas, mediadores de elétrons, NADH e transferência de elétrons

Neste trabalho foram empregadas matrizes inorgânicas modificadas com óxido de nióbio ou fosfato de nióbio, obtida pelos processos gel ou sol-gel, as quais foram denominadas SN, SNP,  $SN_{\text{sol-gel}}$  e  $SNP_{\text{sol-gel}}$ . Os materiais SN e  $SN_{\text{sol-gel}}$  continham 1400 e 1600  $\mu\text{mol Nb/g}$  de material, respectivamente; enquanto os materiais SNP e  $SNP_{\text{sol-gel}}$  continham 1100 e 780  $\mu\text{mol P/g}$  de material. Estas matrizes (SN, SNP,  $SN_{\text{sol-gel}}$  e  $SNP_{\text{sol-gel}}$ ) foram utilizadas como suporte para imobilização da Riboflavina (RF), a qual foi adsorvida, respectivamente, 27, 31, 36 e 44  $\mu\text{mol/g}$  de material. Posteriormente, estas matrizes foram empregadas na elaboração de eletrodos a base de pasta de carbono. Com estes eletrodos foram realizados estudos do comportamento eletroquímico da RF, avaliando os efeitos de acidez, área superficial e porosidade dos materiais empregados, assim como a cinética de transferência de elétrons entre a RF imobilizada e o eletrodo. A capacidade da RF imobilizada em eletrocatalisar a oxidação do NADH também foi avaliada. Nestes estudos observou-se que o potencial formal da RF adsorvida nas diferentes matrizes não variou numa faixa de pH entre 3 e 8. Os estudos da avaliação da cinética de transferência de elétrons entre a RF imobilizada e o eletrodo evidenciaram que estes eletrodos são excelentes dispositivos para a detecção de NADH, no entanto, a atividade eletrocatalítica dos sistemas empregando a RF imobilizada apresentou-se pouco efetiva, o que foi atribuído a um provável efeito de matriz, o qual poderia dificultar a interação entre a RF e o NADH.

Outros importantes aspectos foram verificados através do desenvolvimento do sensor EPC/SNFDA (eletrodo de pasta de carbono contendo o-fenilenodiamina imobilizada sobre sílica modificada com óxido de nióbio), onde, foi possível realizar mais de 300 determinações de NADH com desvio padrão relativo inferior a 3 %. Este sensor contendo o mediador o-fenilenodiamina apresentou faixa de resposta linear de  $4,0 \cdot 10^{-5}$  a  $8,0 \cdot 10^{-4}$   $\text{mol L}^{-1}$  e sensibilidade de  $24,2 \text{ mA L mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ , a um potencial aplicado de -50 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 da constante de velocidade de reação,  $k_{\text{obs}}$ , com o aumento do pH da solução foi atribuído ao aumento na diferença de potencial redox entre o NADH e o mediador.

---

**ABSTRACT**

**Title:** "Electrochemical Behavior of the Electroactive Organics Compounds Immobilized onto Inorganic Support to the Development of a NADH Sensor"

**Author:** Arnaldo César Pereira

**Adviser:** Lauro Tatsuo Kubota

**Keywords:** Modified electrodes, inorganic matrices, electron mediators, NADH and electron transfer

Inorganic matrices modified with niobium oxide or niobium phosphate, obtained for gel and sol-gel processes, which were denominated as: (SN, SNP, SN<sub>sol-gel</sub> e SNP<sub>sol-gel</sub>), were employed in this work. The SN and SN<sub>sol-gel</sub> materials presented 1400 and 1600  $\mu\text{mol Nb/g}$  of material, respectively; while 1100 and 780  $\mu\text{mol P/g}$  of material for SNP and SNP<sub>sol-gel</sub>. These matrices (SN, SNP, SN<sub>sol-gel</sub> e SNP<sub>sol-gel</sub>) were used as support to riboflavin (RF) immobilization, which adsorbed, respectively, 27, 31, 36 and 44  $\mu\text{mol/g}$  of material. These matrices were employed in the preparation of the modified carbon paste electrodes. Investigations of the electrochemical behavior of RF, evaluating the acidity effect, surface area and porosity of the materials were carried out with these electrodes, as well as the kinetics of electron transfer between immobilized RF and the electrode. The capacity of the immobilized RF in the electrocatalytic NADH oxidation was also estimated. In these studies was observed that the formal potential of adsorbed RF on different matrices kept constant in the pH range between 3 and 8. The studies to estimate the kinetics of electron transfer between immobilized RF and the electrode showed that these electrodes are excellent devices for NADH detection. However, the electrocatalytic activity of the systems employing the immobilized RF presented low efficiency, and it was attributed to a probable matrix effect, making difficult the interaction between RF and NADH.

Another important aspects were verified through the development of the EPC/SNFDA sensor. This device allowed to carry out more than 300 NADH determinations with a relative standard deviation (sdr) lower than 3 %. This sensor containing *o*-phenylenediamine presented a linear response range from  $0.4 \cdot 10^{-4}$  up to  $8.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  with a sensitivity of  $24.2 \text{ mA L mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ , with an applied potential of  $-50 \text{ mV vs. SCE}$ . The kinetic of electron transfer between the adsorbed mediator and NADH, employing rotation disk electrode was also verified. These studies indicated that the NADH oxidation reaction should occurs through of the formation of a charge transfer complex between the mediator and NADH. The increase of the rate constant of the reaction,  $k_{\text{obs}}$ , with the increase of the solution pH was assigned to the increase in the difference of the redox potential between NADH and the mediator.

## ÍNDICE GERAL

	Páginas
<b>GLOSSÁRIO</b> .....	xxiii
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	xxv
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xxvii
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	3
I.1 A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO ELETROQUÍMICO DE COFADORES.....	4
I.1.1 A importância da reação entre NADH e flavinas.....	5
I.2 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS.....	8
I.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE MEDIADORES DE ELÉTRONS.....	9
I.4 PREPARAÇÃO DOS EQM's.....	10
I.5 MÉTODOS DE MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE ELETRODO.....	11
I.5.4 Formação de Compósitos.....	12
I.6 METAS DE EQM.....	15
I.6.1 Pré-Concentração do Analito.....	17
I.6.2 Minimização de Interferentes.....	17
I.6.3 Detecção de Espécies que não sofrem Processo Redox.....	18
I.6.4 Amplificação de Resposta.....	18
I.6.5 Biossensores Eletroquímicos.....	20
I.7 ELETROOXIDAÇÃO DE NADH.....	22
I.7.1 Eletrooxidação Direta de NADH (Eletrodos não modificados).....	22
I.7.2 Eletrodos modificados.....	25
I.7.2.1 Tratamento da superfície do eletrodo.....	25
I.7.2.2 Imobilização de mediadores.....	26
I.8 MEDIADORES PARA A ELETROXIDAÇÃO DA NADH.....	26
I.9 TIPOS DE MEDIADORES UTILIZADOS NA MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS PARA NADH.....	28
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	35
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	39
III.1 Reagentes.....	39
III.2 Equipamentos.....	40
III.3. Modificação da superfície da sílica gel com óxido de nióbio (V).....	40
III.4 Material modificado com óxido de nióbio V obtido pelo processo sol-gel.....	41
III.5 Enxerto de fosfato sobre a superfície de SN e SN <sub>sol-gel</sub> .....	41

III.6 Caracterização dos materiais modificados com óxido de nióbio (SN e $SN_{sol-gel}$ ) e enxertada com fosfato (SNP e $SNP_{sol-gel}$ ).....	42
III.7 Imobilização da riboflavina sobre SN, SNP, $SN_{sol-gel}$ e $SNP_{sol-gel}$ .....	43
III.7.1 Imobilização de FAD sobre SN.....	43
III.7.2 Imobilização de o-fenilenodiamina (FDA) sobre SN.....	44
III.8 Caracterização da riboflavina adsorvida nas diferentes matrizes.....	44
III.9 Célula Eletroquímica e Eletrodos.....	44
III.10 Otimização da preparação do eletrodo de trabalho por planejamento fatorial	47
<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>51</b>
IV.1 Caracterização dos Materiais.....	51
IV.2 Justificativa para o emprego de diferentes materiais.....	54
<b>IV.3 PARÂMETROS REFERENTES A PREPARAÇÃO DO ELETRODO DE TRABALHO.....</b>	<b>57</b>
IV.3.1.Otimização da Preparação do Eletrodo de Pasta de Carbono por Planejamento Fatorial $2^3$ .....	59
<b>IV.4 PROPRIEDADES ELETROQUÍMICAS DOS DIFERENTES MATERIAIS.....</b>	<b>67</b>
IV.4.1 Determinação de parâmetros cinéticos para a RF adsorvida nas diferentes matrizes.....	78
IV.4.2 Estudo da Eletrooxidação de NADH através da RF imobilizada sobre diferentes matrizes.....	83
<b>IV.5. ESTUDO DAS PROPRIEDADES ELETROQUÍMICAS DA RF IMOBILIZADA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NA MATRIZ <math>SNP_{sol-gel}</math>.....</b>	<b>86</b>
IV.5.1 Determinação de parâmetros cinéticos para a RF adsorvida em diferentes concentrações na matriz $SNP_{sol-gel}$ .....	90
IV.5.2 Estudo da Eletrooxidação de NADH através da RF imobilizada em diferentes concentrações sobre a matriz $SNP_{sol-gel}$ .....	91
<b>IV.6 SISTEMA EPC/SNFDA.....</b>	<b>94</b>
IV.6.1 Determinação de Parâmetros Cinéticos para a FDA Adsorvida na Matriz SN.....	105
IV.6.2 Estudo da eletrooxidação de NADH.....	107
IV.6.3 Estudos Cinéticos da Eletrooxidação Catalítica do NADH com Eletrodo de Disco Rotatório (EDR).....	115

<b>V. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	131
V.1 Propriedades Eletroquímicas dos Sensores Desenvolvidos.....	131
V.2 Propriedades eletroquímicas da RF imobilizada em diferentes concentrações sobre a matriz SNP <sub>sol-gel</sub> e os estudos das propriedades eletrocatalíticas da RF frente ao NADH.....	132
V.3 Estudos eletrocatalíticos e cinéticos envolvendo a coenzima NADH e o sistema SNFDA.....	133
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	139
<b>VII. ANEXO</b> .....	149

## GLOSSÁRIO

$D$	- Coeficiente de difusão
$E$	- Potencial
$E^{0'}$	- Potencial formal
EDR	- Eletrodo de disco rotatório
EPC	- Eletrodo de pasta de carbono
ECS	- Eletrodo de calomelano saturado
EQM	- Eletrodo quimicamente modificado
$F$	- Constante de Faraday
FAD	- Flavina Adenina Dinucleotídeo
FDA	- <i>o</i> -fenilenodiamina
$\Delta E_p$	- Separação de Potencial de Pico
$\Delta j$	- 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
RF	- Riboflavina
SN	- Sílica gel modificada com óxido de nióbio
SNP	- Sílica gel modificada com óxido de nióbio e enxertada com fosfato
$SN_{sol-gel}$	- Material sol-gel modificado com óxido de nióbio
$SNP_{sol-gel}$	- Material sol-gel modificado com óxido de nióbio e enxertado com fosfato
VC	- Voltamograma cíclico
$\nu$	- Viscosidade
$\omega$	- Velocidade angular

## ÍNDICE DE TABELAS

	Páginas
<b>Tabela 1.</b> Métodos de modificação de superfície de eletrodos.....	11
<b>Tabela 2.</b> Exemplos de determinações envolvendo EQM's com mediadores de elétrons.....	20
<b>Tabela 3.</b> Quantidade de Nb (V), P e riboflavina (RF) adsorvida sobre as diferentes matrizes utilizadas .....	54
<b>Tabela 4.</b> Coeficientes de contraste para um planejamento fatorial $2^3$ .....	60
<b>Tabela 5.</b> Resultados do planejamento fatorial $2^3$ .....	60
<b>Tabela 6.</b> Coeficientes de contraste para um fatorial $2^3$ . A última coluna contém os valores das médias das respostas ( $I_{pa}$ / $\mu A$ ) obtidas nos ensaios.....	62
<b>Tabela 7.</b> Efeitos calculados para o planejamento fatorial $2^3$ e seus erros padrão.....	64
<b>Tabela 8.</b> Densidade de corrente de pico ( $\mu A\ cm^{-2}$ ) para os diferentes sensores após sucessivos voltamogramas cíclicos obtidos em solução de $NaNO_3$ $0,1\ mol\ L^{-1}$ pH 7,0, a velocidade de varredura de $10\ mV\ s^{-1}$ no intervalo de varredura de potencial de $-0,5$ a $-0,1\ V$ .....	69
<b>Tabela 9.</b> Separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e potencial formal ( $E^o$ ) obtidos para os diferentes sensores em diferentes eletrólitos de suporte na concentração de $0,1\ mol\ L^{-1}$ , pH 7,0, para uma velocidade de varredura de $10\ mV\ s^{-1}$ .....	71
<b>Tabela 10.</b> Potencial formal ( $E^o$ ) e separação de pico ( $\Delta E_p$ ) em função do pH da solução de $NaNO_3$ $0,1\ mol\ L^{-1}$ , obtidos para os diferentes sensores a velocidade de varredura de $10\ mV\ s^{-1}$ .....	71
<b>Tabela 11.</b> Efeito de Tampão sobre o potencial formal ( $E^o$ ) e a separação de pico ( $\Delta E_p$ ) em para os diferentes sensores em solução tampão $0,1\ mol\ L^{-1}$ , pH 7,0 obtidos para os diferentes sensores a velocidade de varredura de $10\ mV\ s^{-1}$ .....	72
<b>Tabela 12.</b> Valores estimados de $\alpha$ (coeficiente de transferência de elétrons) e $\kappa$ (constante de velocidade de transferência de elétrons) para a RF adsorvida sobre as diferentes matrizes.....	82

<b>Tabela 13.</b> Densidade de corrente catalítica obtida para a eletrooxidação de NADH ( $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) nas diferentes matrizes empregadas na imobilização da RF. Experimentos realizados em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.....	84
<b>Tabela 14.</b> Potencial Formal ( $E^0$ ) e separação de pico ( $\Delta E_p$ ), obtidos para os diferentes sensores preparados com SNPRF <sub>sol-gel</sub> em solução de $\text{NaNO}_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a uma velocidade de varredura de $10 \text{ mV s}^{-1}$ .....	87
<b>Tabela 15.</b> Eficiência dos diferentes sensores preparados com SNPRF <sub>sol-gel</sub> como função da quantidade de RF adsorvida no material.....	88
<b>Tabela 16.</b> Valores estimados de $\alpha$ (coeficiente de transferência de elétrons) e $\kappa$ (constante de velocidade de transferência de elétrons) para os diferentes sensores preparados com SNPRF <sub>sol-gel</sub> .....	91
<b>Tabela 17.</b> Valores da separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e do potencial formal ( $E^0$ ) obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFDA em diferentes soluções de eletrólito de suporte, pH 7,0 a $20 \text{ mV s}^{-1}$ .....	98
<b>Tabela 18.</b> Valores da separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e do potencial formal ( $E^0$ ) obtidos para eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFDA em solução de $\text{NaNO}_3$ em diferentes valores de pH através de voltametria cíclica a $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .....	100
<b>Tabela 19.</b> Valores da separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e do potencial formal ( $E^0$ ) obtidos para eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFDA em diferentes soluções tampões, pH 7,0 através de voltametria cíclica a $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .....	101
<b>Tabela 20.</b> Efeito do pH da solução na eletrooxidação de NADH, utilizando EPC/SNFDA na presença de $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de NADH preparado em solução tampão fosfato, com o $E_{\text{apl.}}$ de $-50 \text{ mV vs ECS}$ .....	110
<b>Tabela 21.</b> Condições finais da otimização do sensor EPC/SNFDA desenvolvido para a eletrooxidação do NADH.....	114
<b>Tabela 22.</b> Sumário dos parâmetros cinéticos do sistema EPC /SNFDA em diferentes pH.....	123

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
<b>Figura 1.</b> Representação esquemática das estruturas químicas das flavinas. Riboflavina (RF), flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD).....	6
<b>Figura 2.</b> Resumo das etapas da oxidação eletroquímica da NADH. O potencial dado é referente ao ECS, em pH 7,0.....	24
<b>Figura 3.</b> Etapa da transferência do próton, proveniente da oxidação do NADH, para molécula de H <sub>2</sub> O.....	25
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática da oxidação do NADH utilizando eletrodo modificado com mediador. M <sub>oxi</sub> : mediador oxidado; M <sub>red</sub> : mediador reduzido.....	27
<b>Figura 5.</b> Mecanismo geral proposto para a eletroxidação da NADH utilizando mediador, onde (X=O, S) e (Y=N).....	28
<b>Figura 6.</b> Estruturas de derivados de fenazina, fenoxazina, fenotiazina e flavinas.....	29
<b>Figura 7.</b> Variação da constante de velocidade de segunda ordem em função do potencial formal dos derivados de fenoxazina em 0,25 mol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato, pH 7: (a) 7-dimetilamino-1,2-benzofenoxazínio (azul de meldola); (b) 1,2 -benzofenoxazina-7-ona; (c) 3-hidroxi-fenoxazina-7-ona (Resorufin); (d) 3-amino-7-dietilamino-1,2-benzofenoxazínio (azul de nilo); (e) ácido 7-dimetilamino-4-hidroxi-3-oxo-3 H-fenoxazina-1-carboxílico (galocianina); (f) 3,7-bis(dimetilamino)fenoxazínio (metil azul de capri); (g) 3,7-bis(dietilamino)fenoxazínio (etil azul de capri).....	30
<b>Figura 8.</b> Sistema empregado durante o processo de modificação da superfície da sílica gel com óxido de nióbio (V).....	41
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática da cela eletroquímica. Entrada de gás na superfície (1) e na solução (2), eletrodo auxiliar (3), eletrodo de trabalho (4), eletrodo de referência (5) e local de injeção da amostra (6).....	45
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática do eletrodo de trabalho (pasta de carbono).....	46
<b>Figura 11.</b> Eletrodo utilizado nos estudos de disco rotatório .....	47

<b>Figura 12.</b> Variação da $I_{pa}$ / $\mu A$ em função da porcentagem de SNRF (m/m) na pasta de carbono. Solução de $NaNO_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .....	58
<b>Figura 13.</b> Variação do $\Delta E_p$ / mV em função da porcentagem de SNRF (m/m) na pasta de carbono. Solução de $NaNO_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .....	58
<b>Figura 14.</b> Diagrama para interpretação dos efeitos proporção, mistura e concentração do eletrólito no planejamento $2^3$ . Os valores apresentados neste diagrama representam a média das resposta de $I_{pa}$ para cada ensaio.....	61
<b>Figura 15.</b> Voltamogramas cíclicos correspondentes aos ensaios 6, onde as condições foram: proporção 60% de SNRF e 40 % de grafite, mistura tipo 1 e concentração do eletrólito $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (---) e 7, onde as condições foram: proporção 50% de SNRF e 50 % de grafite, mistura tipo 2 e concentração do eletrólito $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (—) para o planejamento fatorial $2^3$ .....	66
<b>Figura 16.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de $NaNO_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 para eletrodo de pasta de carbono modificado com SN (A); SNRF (B) e SNRF <sub>sol-gel</sub> (C) a velocidade de varredura de $10 \text{ mV s}^{-1}$ .....	68
<b>Figura 17.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de $NaNO_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 para eletrodo de pasta de carbono modificado com SN (A); SNPRF (B) e SNPRF <sub>sol-gel</sub> (C) a velocidade de varredura de $10 \text{ mV s}^{-1}$ .....	68
<b>Figura 18.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos para um eletrodo de pasta de carbono modificado com SNRF em solução de $NaNO_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura ( $5-500 \text{ mV s}^{-1}$ ).....	73
<b>Figura 19.</b> Dependência da densidade de corrente de pico anódico ( $j_{pa}$ ) como uma função da velocidade de varredura para EPC/SNRF (A) e EPC/SNPRF (B) em solução de $NaNO_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.....	74
<b>Figura 20</b> Dependência da densidade de corrente de pico anódico ( $j_{pa}$ ) como uma função da raiz quadrada da velocidade de varredura para EPC/SNRF <sub>sol-gel</sub> (A) e EPC/SNPRF <sub>sol-gel</sub> (B) em solução de $NaNO_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.....	75
<b>Figura 21.</b> Dependência da variação de potencial de pico ( $\Delta E_p$ ) como função da velocidade de varredura para os diferentes sistemas desenvolvidos.....	77
<b>Figura 22.</b> Dependência dos potenciais de pico anódico e catódico em função da velocidade de varredura obtida para o eletrodo de paste de carbono modificado com SNRF em solução de $NaNO_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.....	77

<b>Figura 23.</b> Efeitos da velocidade de varredura sobre o potencial de pico anódico e potencial de pico catódico estimados para o sistema EPC/SNRF. Experimentos realizados em solução de $\text{NaNO}_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.....	80
<b>Figura 24.</b> Curva de Tafel obtida para o sistema SNRF em solução de $\text{NaNO}_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.....	81
<b>Figura 25.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos para o sistema EPC/SNRF <sub>sol-gel</sub> na ausência (A) e presença de $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NADH (B), a velocidade de varredura de $10 \text{ mV s}^{-1}$ , preparada em solução de $\text{NaNO}_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.....	84
<b>Figura 26.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com SNP <sub>sol-gel</sub> (A) e SNPRF <sub>sol-gel</sub> , os quais são: Sensor 1 (B); Sensor 2 (C); Sensor 3 (D) e Sensor 4 (E) a $20 \text{ mV s}^{-1}$ em solução de $\text{NaNO}_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.....	87
<b>Figura 27.</b> Dependência da densidade de corrente catalítica da eletrooxidação de NADH em função da concentração de RF utilizada na preparação dos diferentes sensores.....	92
<b>Figura 28.</b> Estrutura da o-fenilenodiamina (FDA).....	94
<b>Figura 29.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC modificado com SN (A); FDA em solução ( $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e SNFDA (C) a $20 \text{ mV s}^{-1}$ em solução de $\text{NaNO}_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.....	95
<b>Figura 30.</b> Voltamogramas cíclicos sucessivos ( $10^\circ$ , $50^\circ$ e $100^\circ$ ciclos) obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFDA a $20 \text{ mV s}^{-1}$ em solução de $\text{NaNO}_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.....	96
<b>Figura 31.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 (A), em solução de FDA $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ referente ao 1º ciclo (B) e ao 2º ciclo (C).....	97
<b>Figura 32.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC modificado com SNFDA em diferentes velocidades de varredura ( $5\text{-}150 \text{ mV s}^{-1}$ ) em solução de $\text{NaNO}_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.....	102
<b>Figura 33.</b> Variação da intensidade de corrente de pico anódico em função da velocidade de varredura.....	103
<b>Figura 34.</b> Variação da separação de potencial de pico ( $\Delta E_p$ ) em função da velocidade de varredura obtido com eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFDA em solução de $\text{NaNO}_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.....	104

<b>Figura 35.</b> Dependência do potencial de pico em função da velocidade de varredura.....	105
<b>Figura 36.</b> Potencial de pico anódico e catódico em função do <i>log</i> da velocidade de varredura para o sistema EPC/SNFDA.....	106
<b>Figura 37.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC/SNFDA na ausência (a) e na presença (b) de solução de NADH $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.....	108
<b>Figura 38.</b> Dependência da corrente catalítica de NADH em função do potencial aplicado, obtida com EPC/SNFDA em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. $[\text{NADH}] = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .....	109
<b>Figura 39.</b> Amperogramas obtidos a $-50 \text{ mV}$ com EPC/SNFDA em meio de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, através de incrementos de $20 \mu\text{L}$ de uma solução de NADH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ .....	111
<b>Figura 40.</b> Curva analítica para NADH empregando o sensor EPC/SNFDA.....	111
<b>Figura 41.</b> Determinação do tempo de resposta do sensor EPC/SNFDA em função da corrente catalítica obtida em meio de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, através da adição de $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de NADH. O potencial aplicado foi de $-50 \text{ mV vs. ECS}$ .....	112
<b>Figura 42.</b> Gráfico do duplo-recíproco para a obtenção de $K_{\text{Mapp}}$ .....	113
<b>Figura 43.</b> Voltamogramas de varredura linear obtidos para o sensor EPC/SNFDA, experimento realizado com eletrodo de disco rotatório, na ausência de NADH, em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 variando a velocidade de rotação de 30 a 400 rpm.....	117
<b>Figura 44.</b> Voltamogramas de varredura linear obtidos para o sensor EPC/SNFDA, experimento realizado com eletrodo de disco rotatório, na presença de $[\text{NADH}] = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 variando a velocidade de rotação de 30 a 400 rpm.....	117
<b>Figura 45.</b> Variação da intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade de rotação.....	118
<b>Figura 46.</b> Gráfico de Koutechy-Levich para o eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFDA, empregando EDR em diferentes concentrações de NADH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.....	120

<b>Figura 47.</b> Variação da constante $\kappa_{\text{obs}}$ pela $[\text{NADH}]^+$ para o sensor EPC/SNFDA. Experimento realizado em voltametria linear em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0.....	121
<b>Figura 48.</b> Variação da constante $1/\kappa_{\text{obs}}$ pela $[\text{NADH}]^+$ para o EPC/SNFDA em pH 7,0.....	122
<b>Figura 49.</b> Dependência da constante $\kappa_{\text{obs}}$ em função do pH da solução tampão fosfato. Experimento usando o EPC/SNFDA.....	125

### **Esquemas**

<b>Esquema 1.</b> Principais Enfoques Analíticos e Estratégias no Desenvolvimento de EQMs.....	16
<b>Esquema 2.</b> Sítios de adsorção dos diferentes materiais.....	51
<b>Esquema 3.</b> Mecanismo de adsorção da o-fenilenediamina (FDA) sobre a SN.....	94
<b>Esquema 4.</b> Processo redox da SNFDA.....	100

TESE DE DOUTORADO

# **I. INTRODUÇÃO**

## I. INTRODUÇÃO

Atualmente, uma importante área de desenvolvimento que vem conquistando espaço nos mais diversos campos de aplicações da ciência é a eletroquímica, devido ao baixo custo de operação, à extensa possibilidade em aplicações analíticas e também a sua utilização como ferramenta de estudo nos inúmeros fenômenos envolvendo transferência de elétrons [1-6].

A utilização de eletrodos na sua forma original, sem agregar nenhum outro componente, limita 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).

Na química analítica, a eletroquímica tem vasta atuação com emprego dos EQM [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]. Outro aspecto relevante é a possibilidade do monitoramento contínuo do analito *in situ* ou *in vivo*. 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 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]. Por outro lado, as principais limitações de seu uso são: a pouca estabilidade, refletida em sensores com tempos de vida curtos (semanas ou no máximo alguns meses); em alguns casos, apenas algumas horas e a eficiência do transdutor [16].

## I.1 A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO ELETROQUÍMICO DE COFADORES

Há um grande interesse em se estudar a eletroquímica dos cofatores, uma vez que, os mesmos participam da transferência de elétrons da enzima e, em muitos casos, os cofatores fazem parte do sítio ativo da enzima o qual é a região onde ocorre a reação redox e, sem a sua presença a enzima não consegue catalisar a reação do substrato para o produto. A compreensão das reações de transferência de elétrons envolvidos entre os cofatores/enzimas e eletrodo é complicada, uma vez que, devem ser levados em consideração o tamanho, os diferentes tipos de interações e a orientação da enzima depositada sobre a superfície do eletrodo. Dessa forma, o estudo do comportamento eletroquímico dos cofatores, sem a presença de enzima, tanto em solução como imobilizados sobre diferentes materiais eletródicos é necessário.

A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) é um cofator bastante visado devido a grande quantidade de enzimas de-hidrogenases que depende do par redox  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  e à sua importância como transportador de elétrons em células vivas. Atualmente sabe-se que existem cerca de 250 enzimas que dependem do NADH e aproximadamente 150 do NADPH [17]. 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 da enzima de-hidrogenase em biossensores é a dificuldade de regeneração do NADH. Problemas como oxidação de substâncias interferentes e envenenamento do eletrodo eram comumente observados em eletrodos modificados com enzimas de-hidrogenases devido à necessidade de uso de potenciais elevados, utilizado para regenerar o cofator. Uma das estratégias usadas para diminuir o potencial aplicado foi a utilização de mediadores redox imobilizados sobre a superfície do eletrodo. Dentre os mediadores estudados estão: p-fenilenodiamina [18], quinonas, catecol [19], ferroceno [20], derivados de tionina [21], fenazina [22], fenoxazina [23-24], fenotiazinas [25], complexos metálicos [26] e sais condutores orgânicos [27]. Na maioria dos casos os mediadores são imobilizados por adsorção sobre a superfície do eletrodo ao nível

de monocamada, por eletropolimerização, ligação covalente e em pasta de carbono. O maior obstáculo encontrado é o tempo de vida dos eletrodos modificados e a falta de seletividade na oxidação do NADH. Sendo assim, ainda existe um grande interesse de encontrar novos materiais ou alternativas para ser utilizado na eletrooxidação do NADH. Além disso, 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 dehidrogenases na busca de melhor performance dos mesmos. Dessa forma, novas moléculas poderão ser sintetizadas prevendo-se antecipadamente o aumento na propriedade eletrocatalítica [28].

Apesar da transferência de elétrons entre as espécies eletroativas (mediadores de elétrons) e NADH ser amplamente investigada, ainda há muitas dúvidas de como estas reações, de fato, ocorrem [29-30].

A investigação da cinética e mecanismo de reação é de suma importância no entendimento dos fenômenos biológicos, tais como: a fotossíntese, contração muscular, efeitos de drogas, dentre outros [31]. Apesar da complexidade das reações biológicas, o desenvolvimento de novos materiais eletródicos acoplados aos métodos eletroquímicos têm possibilitado a investigação dos mecanismos de transferência de elétrons que ocorrem nestes sistemas.

### I.1.1 A importância da reação entre NADH e flavinas

A flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e a flavina mononucleotídeo (FMN) são cofatores e fazem parte do sítio ativo de várias enzimas. Algumas das reações envolvendo estas enzimas, conhecidas como flavoproteínas, são de de-hidrogenação, reações de transferência de elétrons, dentre outros [32-33]. O entendimento da versatilidade química das flavinas e o mecanismo de ação das flavoproteínas são de extrema importância e por isso são muito investigados [34-36].

A riboflavina (RF), vitamina B<sub>2</sub>, é um precursor essencial das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN). A

lumiflavina e lumicromo também pertencem à família das flavinas [37]. Os diferentes tipos de flavinas têm em comum o anel aloxazina, o qual é o local onde ocorrem os processos redox, Figura 1.

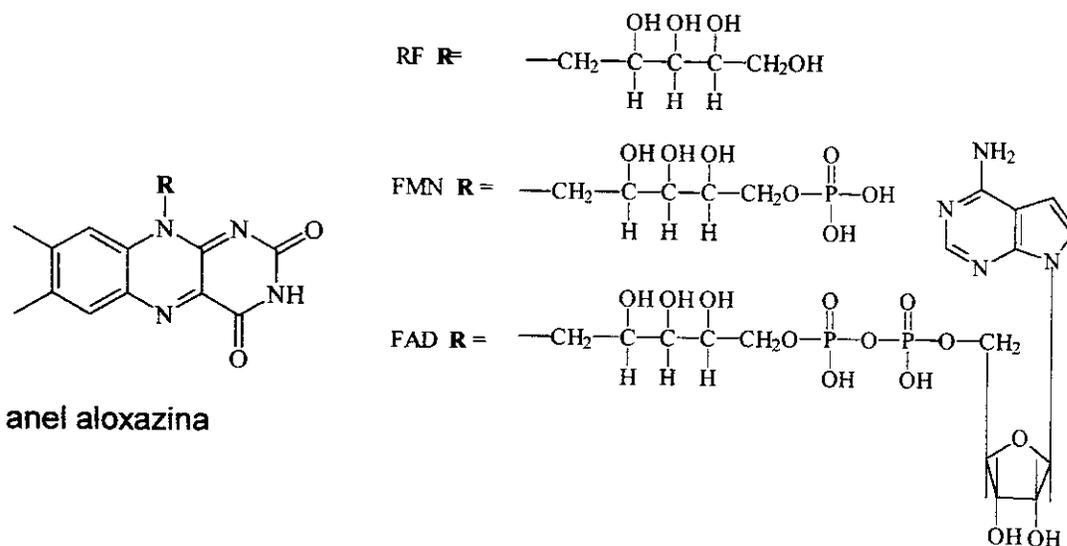


Figura 1. Representação esquemática das estruturas químicas das flavinas. Riboflavina (RF), flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) [28; 38]

A natureza do grupo (-R) ligado ao nitrogênio (localizado na posição N-10), Figura 1, do anel aloxazina é o que diferencia uma flavina da outra, podendo influenciar na sua orientação quando adsorvida sobre a superfície de algum eletrodo [39-40], deixando o sítio ativo (anel aloxazina) mais ou menos disponível para a reação catalítica. Em geral, quanto mais acessível estiver o sítio ativo da flavina em relação ao substrato, mais rápida será a transferência de elétrons entre eles.

A FAD e a FMN são coenzimas de várias flavoproteínas tais como glicose oxidase, aminoácido oxidase e xantina oxidase. Sua importância em catálise enzimática tem motivado a investigação do comportamento eletroquímico de eletrodos modificados com monocamadas ou agregados contendo flavinas [41-42]. Outro interesse é estudar a reação de transferência de elétrons entre a flavina e a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) [39; 43-44], uma vez que, os mesmos estão envolvidos na formação de ATP no metabolismo em seres vivos,

onde o oxigênio é o aceptor final de elétrons. Ainda é questionável se a transferência de elétrons entre o NADH e a flavina ocorre em uma única ou em várias etapas. Dessa forma, várias investigações eletroquímicas têm sido realizadas no sentido de elucidar o mecanismo de reação deste importante sistema. Contudo, o maior obstáculo encontrado nestes tipos de estudos é, que as flavinas em solução aquosa apresentam baixa atividade para oxidar o NADH.

Isto ocorre porque a diferença entre os potenciais formais ( $E^{\circ}$ ) de NADH (-560 mV vs. ECS [45]) e da flavina (-470 mV vs. ECS [46-47]) não é suficiente para permitir que a reação seja termodinamicamente favorável e permita a obtenção de resultados satisfatórios. Os pesquisadores têm contornado este problema usando derivados de flavinas [48-50], ou imobilizando flavinas sobre diferentes matrizes causando mudança no  $E^{\circ}$  para valores mais positivos [51-53]. No entanto, na maioria dos casos com a imobilização da flavina, não houve o deslocamento do  $E^{\circ}$  para regiões mais positivas, e seu comportamento eletroquímico é semelhante ao da flavina quando esta se encontra em solução. Como exemplos pode-se citar a flavina adsorvida sobre a superfície de eletrodo de grafite, carbono vítreo, platina e ouro [54], imobilizada sobre monocamadas de mercaptana [55] ou tiouréia [56], ligadas ao metal nobre ou usando a técnica de imobilização de Langmuir-Blodgett [57]. O eletrodo de pasta de carbono também vem sendo usado para imobilizar flavinas com a vantagem, em relação aos demais eletrodos, da possibilidade de incorporação de espécies eletroativas, mediadores, dentre outros, na pasta de carbono. A imobilização da riboflavina (RF) sobre fosfato de zircônio (ZP) ou fosfato de titânio (TP) incorporado na pasta de carbono promove mudanças no  $E^{\circ}$  de aproximadamente 250 mV ou 100 mV, respectivamente, para potenciais mais positivos quando comparado com seu valor quando dissolvido [52-53]. Esta mudança foi atribuída a interação entre o nitrogênio básico da RF e o grupo ácido do ZP ou TP. Além disso, o valor do  $E^{\circ}$  mostrou-se independente do pH da solução, atribuído como sendo um efeito protetor do ZP sobre a riboflavina. Porém, sob essas mesmas condições, FAD e FMN não foram adsorvidas sobre ZP [51] ou TP [53], mas foram fortemente adsorvidas sobre óxido de titânio disperso sobre fibra de carbono [58]. Estruturas

semelhantes às das flavinas, tais como corantes orgânicos, têm sido imobilizadas sobre o óxido de zircônio enxertado sobre a sílica, e incorporados em eletrodo de pasta de carbono. Nestes casos, também foram verificadas mudanças no valor do  $E^{\circ}$  para regiões mais positivas em relação aos valores dos corantes orgânicos dissolvidos [59-61].

Dentro deste contexto, na presente Tese procurou-se estudar o comportamento eletroquímico de flavinas e/ou compostos orgânicos eletroativos similares imobilizados sobre matrizes inorgânicas modificadas com óxido de nióbio em pasta de carbono, com intuito de investigar a cinética e o mecanismo de reação de transferência de elétrons entre estas espécies e NADH.

## I.2 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

A denominação eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi inicialmente utilizada na eletroquímica por Murray e colaboradores [62] na década de 70 para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas na superfície desses dispositivos. Como citado anteriormente, o principal objetivo dessa modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução como uma forma de alterar a reatividade e seletividade do sensor base, favorecendo assim, o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações, desde a catálise de reações orgânicas e inorgânicas [63] até a transferência de elétrons em moléculas de interesse [64]. Desta forma, avanços tecnológicos na área dos EQM's encontram aplicações nas mais variadas áreas de atuação, como por exemplo, na saúde pública [65], onde sensores *in vivo* podem ser usados na detecção de drogas em situação de emergência. Além disso, sensores com rápida detecção, alta sensibilidade e especificidade são requisitos importantes em hospitais ou laboratórios satélites (móveis) [66-67]. Sensores também encontram vasta aplicação nas indústrias de alimentos [68] e bioprocessos, onde o monitoramento em tempo real é muito valioso, ou ainda em aplicações ambientais [63] onde, tanto a indústria quanto os órgãos de vigilância ambiental, necessitam de sensores para análise quantitativa

ou diferencial de inúmeros rejeitos industriais tais como: misturas gasosas, óleos, compostos orgânicos voláteis, metais pesados, etc.

A maior parte das aplicações analíticas de EQM's envolve técnicas voltamétricas ou amperométricas. Entretanto, é possível encontrar na literatura alguns casos de utilização de EQM's como eletrodos íon-seletivos [69-70]. Em termos analíticos, a sensibilidade ou seletividade de uma determinação deve aumentar, em relação a eletrodos base (sem modificação), com a utilização de um EQM para que seu emprego seja justificado.

### I.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE MEDIADORES DE ELÉTRONS

Um mediador de elétrons é uma substância de baixa massa molecular com propriedades redox que, numa primeira etapa, interage com um reagente ou produto de uma reação química (como por exemplo, uma reação enzimática) e, então, na superfície do eletrodo, sofre uma transferência de elétrons rápida sob um potencial substancialmente menor àquele necessário para a eletrooxidação ou redução de um reagente ou produto. São muito empregados no desenvolvimento de biossensores.

Alguns mediadores bastante usados em determinações enzimáticas compreendem classes de compostos aromáticos como quinonas e derivados, fenazinas, fenoxazinas e fenotiazinas. Outros mediadores muito empregados, também, se baseiam em complexos de metais de transição (ferro, rutênio e ósmio) [71].

Alguns destes mediadores são quimicamente imobilizados no eletrodo com propriedades para promover o processo de oxidação eletrocatalítica do NADH. As diferentes estruturas dos principais mediadores usados para produzir eletrodos quimicamente modificados (EQM) para a oxidação do NADH, visando diminuir o sobrepotencial de oxidação deste, são apresentadas na literatura [28].

#### I.4 PREPARAÇÃO DOS EQM's

Um EQM consiste de duas partes, isto é, o eletrodo base e uma camada do modificador químico. A forma de preparação de um eletrodo quimicamente modificado é determinada pelas características analíticas desejadas do sensor.

A escolha do material para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá a modificação, é um aspecto muito importante da preparação de um EQM. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais podemos citar o ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono e pasta de carbono. Carbono vítreo reticulado, material plástico condutor e vidros condutores, estão incluídos entre os substratos menos usuais.

Esta grande variedade de materiais e possibilidades de combiná-los proporciona um grande campo de atuação destes dispositivos, sendo até mesmo utilizados em ambientes de difícil detecção de analitos, tais como o líquido intracelular, como por exemplo, na aplicação de um ultra-microeletrodo em medidas clínicas [72-73].

Ao reduzirem o tamanho dos eletrodos a ultramicroeletrodos (UME's), os eletroquímicos não só criaram um dispositivo adequado para medidas na escala micro, mas também obtiveram algumas vantagens [74] próprias dos UME's tais como facilidade em alcançar o estado estacionário, medidas em solventes de alta resistência ôhmica, medidas em fase gasosa, medidas sem necessidade de eletrólito de suporte, voltametria ultra-rápida, miniaturização, baixa queda ôhmica, redução da corrente capacitiva e possibilidade de medidas *in vivo* [75-76].

Desta forma a utilização de EQM's é uma área em franca expansão, principalmente no aspecto do desenvolvimento de novos materiais e novos métodos de modificação de superfície de eletrodos, como na utilização de cerâmicas [77], filmes de metal-hexacianoferrato [78] e macromoléculas, tais como DNA [79], o que visa ampliar e potencializar as aplicações destes dispositivos que em muitos casos já estão disponíveis no mercado, como os sensores eletroquímicos, conhecidos como "relógios" para monitoramento de glicose, muito

utilizados por diabéticos e atletas [65], da mesma forma que os existentes para uréia. Também, pode-se destacar o programa Sensors 2000, desenvolvido pela National Aeronautical and Space Administration (NASA) [80], visando o desenvolvimento tecnológico de sensores e sistemas que possam operar sobre gravidade zero e em ambientes onde a substituição ou reparo é difícil. Desta forma, os EQM's vêm sofrendo contínuos avanços e encontrando inúmeras aplicações.

### I.5 MÉTODOS DE MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE ELETRODO

Na história de EQM, o uso de camadas de agentes modificadores sobre a superfície do eletrodo base tem sido a forma mais comum de modificar a superfície de um eletrodo.

De forma geral, os métodos [81] mais importantes utilizados para a introdução de um agente modificador sobre o eletrodo base consistem em adsorção irreversível direta, ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo, recobrimento com filmes poliméricos ou ainda a preparação de eletrodos à base de pasta de carbono com um modificador pouco solúvel em água para sua adsorção neste tipo de substrato, como resumido na Tabela 1.

Tabela 1. Métodos de modificação de superfície de eletrodos

Modificações	Características
Adsorção	Incorporação simples e rápida de compostos em uma ampla gama de eletrodos base.
Ligação covalente	Incorporação de substância de maneira estável através da manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes na superfície do eletrodo
Filmes poliméricos	Imobilização de camadas da espécie ativa na superfície do eletrodo – Ampliação da resposta eletroquímica
Materiais compósitos	Possibilidade da modificação interna do material eletródico. Exemplos: pasta de carbono, grafite-epóxi, etc

Devido às características e possibilidades apresentadas pelos materiais compósitos, daremos uma maior abordagem sobre este tópico, destacando o emprego de eletrodos de pasta de carbono (EPC) e matrizes inorgânicas.

### I.5.1 Formação de Compósitos

Os materiais compósitos como o próprio nome indica são formados pela combinação de duas ou mais fases de natureza diferente. Cada fase mantém suas características individuais, mas a mistura pode apresentar novas características físicas, químicas ou biológicas. Compósitos com características condutoras são utilizados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos com excelentes resultados [82], como por exemplo, o emprego de compósitos de grafite-epóxi na determinação amperométrica de pesticidas [83].

Os polímeros envolvidos nestes materiais fornecem uma certa estabilidade da mesma forma que os compósitos gerados passam a adquirir características eletroquímicas particulares. Materiais à base de carbono, tais como: eletrodo de pasta de carbono, de grafite-epóxi, "screen printed" e pastilhas, formam fases condutoras ideais na elaboração de matérias compósitos, o que o torna muito empregado em sensores amperométricos [84]. Estes materiais são bastante inertes quimicamente, apresentam grande intervalo de potencial de trabalho, baixa resistência e baixa corrente residual [82].

Os eletrodos preparados à base de pasta de carbono oferecem versatilidade, baixa corrente de fundo, ruído semelhante ao apresentado por eletrodos metálicos, baixo custo, modificação conveniente e facilidade de renovação da superfície. Devido a essas propriedades, os eletrodos à base de pasta de carbono estão em extensivo uso em eletroanálise [85].

Pasta de carbono é uma mistura de grafite em pó e um líquido orgânico que é imiscível em contato com soluções aquosas. A superfície dos eletrodos de pasta de carbono é muito complexa com muitas possibilidades de interações. O líquido orgânico, denominado aglutinante, serve para fixar a pasta ao eletrodo, preencher

as cavidades entre as partículas de grafite e possibilitar o emprego deste tipo de eletrodo em soluções aquosas.

Uma das principais vantagens de pasta de carbono para a construção de sensores é que esses eletrodos possibilitam a modificação interna do material eletródico, diferente do que ocorre com os eletrodos sólidos convencionais em que a modificação ocorre apenas na superfície. Isto significa que é possível a co-imobilização de enzimas, cofatores, mediadores, estabilizadores, resultando numa configuração de eletrodo sem a necessidade de adição de reagentes durante a determinação. Mas também é importante frisar que compósitos a base de pasta de carbono apresentam alguns problemas, principalmente, relacionados a perda gradual das espécies incorporadas para a solução de trabalho, prejudicando a estabilidade do eletrodo. Em vista destes problemas, novas matrizes e tecnologias de imobilização vem sendo incorporadas, visando o melhoramento dos materiais compósitos.

Os eletrodos modificados com materiais inorgânicos praticamente formam uma nova categoria dos eletrodos quimicamente modificados. No entanto, os materiais inorgânicos podem ser incorporados a materiais compósitos, geralmente, com a finalidade de aumentar a estabilidade das espécies eletroativas imobilizadas. Várias matrizes inorgânicas têm sido usadas como agentes modificadores de eletrodos convencionais. Estas incluem sílica-gel e sol-gel, óxidos e fosfatos metálicos,  $\gamma$ -alumina, zeólitas, entre outros tipos.

A variedade de materiais à base de sílica juntamente com a química de sua superfície implica num grande potencial para a aplicação dessas espécies em eletroquímica. Algumas das propriedades deste material tais como capacidade de adsorção, química ácido-base, estabilidade térmica, podem ser vantajosamente exploradas, por exemplo, no acúmulo de espécies eletroativas antes da sua detecção eletroquímica. Além disso, a sílica pode ser enxertada com uma variedade de grupos funcionais levando a um considerável enriquecimento de suas propriedades de superfície. A alta área superficial de sílicas sintéticas, quando combinada a sua química de superfície, torna esse material útil como suportes para vários catalisadores.

Apesar da fórmula simples do dióxido de silício,  $\text{SiO}_2$ , a sílica existe em diferentes formas. Cada uma destas é caracterizada por uma estrutura (cristalina ou amorfa) e propriedades físicas e químicas tanto da estrutura quanto de sua superfície. A química da sílica tem sido extensivamente revisada, estando disponíveis na literatura na forma de livros, monografias e revisões, tratando a respeito de sua síntese, caracterização, modificação química, reatividade de superfície e usos práticos [86-87].

Rocha *et al.* e Perez *et. al.* [88-89] tem realizado trabalhos explorando a versatilidade da sílica-gel em imobilizar vários componentes tais como filmes de óxidos ou espécies eletroativas. Muitos dos estudos foram baseados na preparação de sílica-gel modificada com óxidos metálicos e utilização dos materiais resultantes como suporte para imobilização de vários mediadores de transferência de elétrons que se mostraram interessantes quando integrados a sensores ou biossensores amperométricos.

Outra matriz inorgânica bastante interessante, oriunda dos silicatos, são os chamados óxidos mistos, obtidos através do processo sol-gel que são do tipo  $\text{SiO}_2/\text{MO}_2$  (onde M é um metal de transição) que permite introduzir altas concentrações do metal de transição nestes materiais, promovendo homogeneidade na matriz e permitindo a obtenção de materiais com alta pureza e alta concentração destes metais na sua superfície [90]. Este processo consiste em uma técnica a baixa temperatura para produção de materiais cerâmicos por hidrólise e policondensação de alcóxidos. Estes materiais possuem algumas características tais como: 1) rigidez física; 2) inércia química; 3) estabilidade térmica; e 4) baixa taxa de biodegradação. A porosidade destes materiais é importante para o desenvolvimento de biossensores, e no caso de utilização de enzima, a mesma retém suas características funcionais por longo tempo [91-92].

Os óxidos mistos têm atraído considerável atenção dos pesquisadores como novos materiais, catalisadores heterogêneos e suportes de catalisadores. A adição de titânio ou zircônio promove interações nos óxidos mistos  $\text{SiO}_2/\text{MO}_2$  a nível molecular que geram 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 de titânio e zircônio nos óxidos mistos pode promover o aparecimento de propriedades trocadoras de íons e estruturais interessantes [93-94], podendo desta forma ser facilmente modificado e utilizado em desenvolvimento de sensores.

Dentro desta classe também podemos destacar o emprego do fosfato de zircônio que é muito bem conhecido devido à sua alta capacidade de troca-iônica e de suas propriedades de condutividade [52-53], tais características são muito atrativas na utilização destes materiais como matrizes para a imobilização de espécies eletroativas. Alguns trabalhos vêm demonstrando que estes materiais apresentam propriedades eletroquímicas importantes como o deslocamento do potencial formal do mediador adsorvido, tais como fenoxazinas, fenotiazinas entre outros para regiões mais positivas [51].

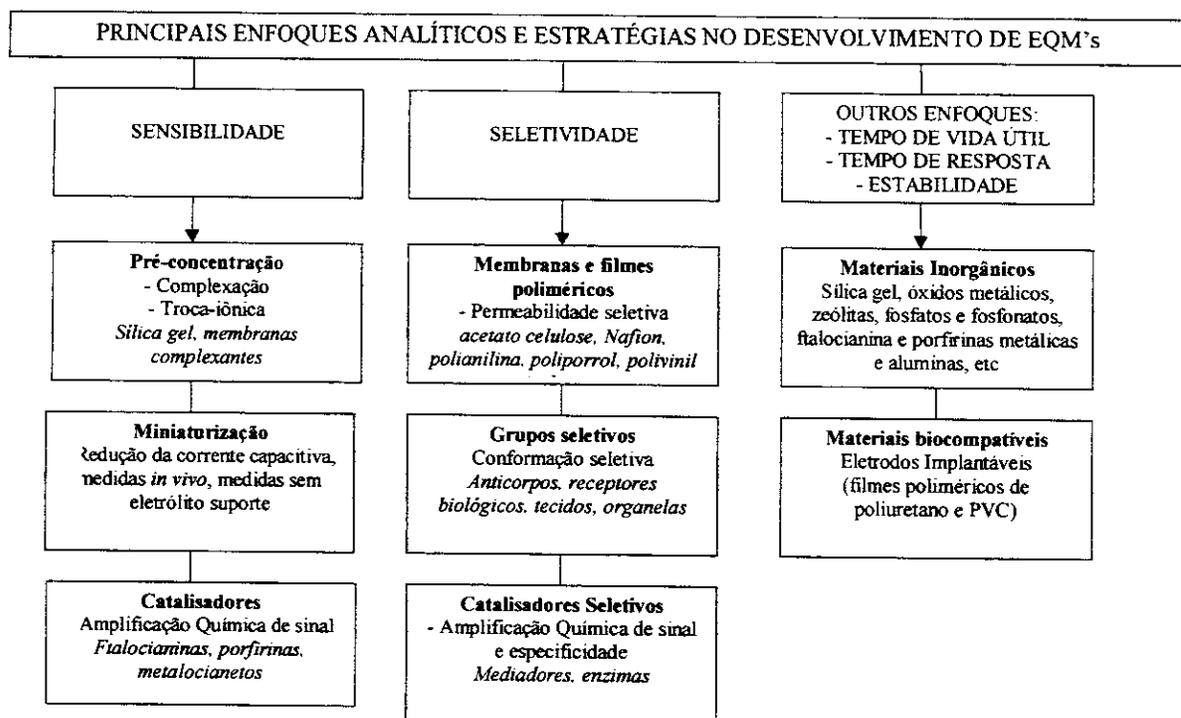
Outra classe a ser destacada envolve a utilização de zeólitas [95] e matrizes correlatas [96], sendo que, assim como os fosfatos, incorpora as espécies eletroativas por mecanismo de troca-iônica. Estas matrizes são empregadas para o estudo do mecanismo de transferência de elétrons envolvidos em processos redox para espécies imobilizadas por esta matriz inorgânica. As matrizes a base de zeólitas possuem outras propriedades importantes tais como: melhoria na seletividade baseada no tamanho e forma dos reagentes juntamente com a estrutura tridimensional da zeólita, o que pode proporcionar características eletrocatalíticas importantes deste material. As zeólitas estão sendo empregadas em detecção amperométrica para alguns analitos tais como: oxigênio [97], íons metálicos [98-102], além de substâncias orgânicas como glicose [103-105], hidrazina [106], fenol [107], dopamina [108] entre outras.

## **I.6 METAS DE EQM**

Há várias possibilidades para as funções básicas e aplicações de EQM's, e entre estas se destacam interações seletivas e pré-concentração de um analito na camada modificadora, eletrocatalise de reações redox de um analito com transferência lenta de elétrons sobre o eletrodo base, permeseletividade com uso

de membranas para inibir interferentes eletroativos; detecção eletroquímica de analitos iônicos não-redox; incorporação de biomoléculas, particularmente enzimas, no desenvolvimento de biossensores; incorporação de monocamadas em grupamentos pré-definidos em eletrodos auto arranjados [109-110], nas mais diversas funções de EQM's, bem como a incorporação de bicamadas lipídicas e monocamadas fosfolipídicas [111] explorando a permeabilidade destas membranas biológicas.

Em muitos casos estes conceitos e modificações estão combinados de tal forma que o sensor obtenha sensibilidade, seletividade, estabilidade, reprodutibilidade e aplicabilidade superiores àquelas de um eletrodo base sem prévia modificação. Isto pode ser melhor visualizado no Esquema 1 o qual retrata os principais enfoques analíticos e estratégias envolvidos no desenvolvimento de EQM's.



Esquema 1

### I.6.1 Pré- concentração do Analito

Nos EQM a pré-concentração dar-se-á através da complexação, troca iônica ou pela ligação covalente entre a espécie de interesse e um modificador imobilizado na superfície do eletrodo [112]. Este agente modificador apresenta particular afinidade pela espécie de interesse, o que confere sensibilidade e seletividade à medida voltamétrica [113-115]. Atualmente a utilização de sílica-gel em processos de pré-concentração vem despertando grande interesse em aplicações analíticas [116]. 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.6.2 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 à 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 [112; 117-119]. 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 e espécies neutras. Por sua vez, os filmes de acetato de celulose

atuam com base no tamanho das espécies envolvidas. Outra maneira de excluir interferentes com base nas interações eletrostáticas pode ser através do recobrimento da superfície do eletrodo com monocamadas, como no caso dos eletrodos com monocamadas auto-arranjadas. Por exemplo, a incorporação de uma monocamada de fosfolípídeo 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 [111].

### 1.6.3 Detecção de Espécies que não sofrem Processo Redox

A determinação de analitos iônicos é baseada no efeito causado por estes no comportamento de polímeros condutores (por exemplo, polipirrol e polianilina) ou filmes com par redox imobilizado, por exemplo, hexacianoferrato (II). Polipirrol pode ser oxidado apenas na presença de ânions pequenos, os quais são capazes de penetrar no filme e compensar a carga positiva da forma oxidada deste polímero. Na redução do polímero, estes ânions são liberados. Tais processos de dopagem–desdopagem têm sido empregados em sistemas em fluxo onde um transiente de corrente anódica serve como uma medida da concentração de ânions passando pelo eletrodo.

No caso de filmes com espécies negativamente incorporadas sobre a rede polimérica (por exemplo, cianocomplexos), o processo de dopagem–desdopagem é acompanhado pelo transporte de cátions pequenos da solução. A intercalação de cátions afeta a microestrutura do filme e conseqüentemente o potencial redox do mediador. Estes fenômenos são explorados para a determinação de metais alcalinos em sistemas em fluxo. Um importante aspecto destas análises é a possibilidade do controle de seletividade através do potencial aplicado ao sensor.

### 1.6.4 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 acarretando a redução do sobrepotencial de ativação em processos que podem ser eletroquímico-químico ou na ordem inversa, químico-eletroquímico [120-122]. O sobrepotencial de ativação consiste na aplicação de um potencial adicional ao  $E^0$  necessário para que o processo redox do sistema possa acontecer. Desta forma, mudanças no eletrodo que possam reduzir esta energia adicional, visando o aumento da velocidade da reação, são de grande importância no sentido de aplicação dos eletrodos resultantes. A redução do potencial aumenta a seletividade das medidas, uma vez que reduz a possibilidade de que os potenciais de eletrólise de espécies interferentes presentes sejam atingidos.

Dentre as espécies químicas utilizadas com o objetivo de diminuir o sobrepotencial, podemos destacar 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 na superfície do eletrodo. A Tabela 2 ilustra alguns exemplos de determinações voltamétricas e amperométricas, envolvendo EQM's com mediadores redox.

Tabela 2. Exemplos de determinações envolvendo EQM's com mediadores de elétrons

Sensor Base	Forma de Modificação	Analito	Ref.
Carbano vítreo	Eletrodo modificado com poli (4-vinilpiridina) contendo $\text{Mo}(\text{CN})_8^{4-}$	Ácido ascórbico	123
Pasta de carbono	Eletrodo modificado com sílica/fosfato de zircônio contendo diferentes mediadores	NADH	124
Carbano vítreo	Filme de polipirrol dopado com $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	Ácido ascórbico	125
Pasta de carbono	Eletrodo modificado com sílica/óxido de titânio/ ftalocianina de níquel tetrassulfonatada	Hidrazina	126
Pasta de carbono	Eletrodo modificado com sílica/óxido de zircônio/ $[\text{Ru}(\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA})\text{H}_2\text{O}]$	$\text{O}_2$	127
Carbano vítreo	Eletrodo modificado com acetato de celulose contendo 2,6-diclorofenolindofenol	$\text{S}^{2-}$	128
Grafite espectroscópico	Adsorção de Riboflavina sobre a superfície do eletrodo	Hemoglobina	129
Grafite espectroscópico	Adsorção de Riboflavina sobre a superfície do eletrodo	$\text{O}_2$	130

### 1.6.5 Biossensores Eletroquímicos

Biossensor é um dispositivo capaz de fornecer informação analítica quantitativa ou semiquantitativa, usando um elemento de reconhecimento biológico, o qual está em contato espacial direto com um elemento de transdução. O elemento transdutor deve ser capaz de converter a energia de um evento químico de reconhecimento em um sinal quantificável, podendo ser potenciométrico, amperométrico, condutimétrico, óptico, entalpimétrico ou ainda piezelétrico [131]. Os elementos biológicos mais comuns incluem enzimas, antígenos, anticorpos, DNA, organelas, tecidos, entre outros.

Biossensores enzimáticos tem se tornado muito úteis em aplicações analíticas, devido a possibilidade de se combinar a seletividade e sensibilidade da enzima com a simplicidade dos transdutores eletroquímicos.

A etapa fundamental no desenvolvimento de um biossensor é a imobilização e estabilização das enzimas ou proteínas sobre a superfície da matriz, no intuito de melhorar a estabilidade química destes materiais catalíticos.

Desta forma, materiais que possam permitir a imobilização de espécies mediadoras e moléculas biológicas são de grande potencial para o desenvolvimento de sensores e biossensores.

Dentre os tipos de biossensores eletroquímicos, os condutométricos são usualmente não específicos e tem uma pobre razão sinal/ruído [132], por isso os métodos potenciométrico e principalmente o amperométrico têm sido os mais utilizados. O sensor amperométrico geralmente é mais rápido, mais sensível e preciso que o potenciométrico, pois não é necessário alcançar o equilíbrio químico entre as espécies envolvidas no processo. Além disso, a resposta é linear em uma faixa relativamente ampla de concentração do analito.

Os biossensores amperométricos são geralmente baseados em enzimas oxidorreduções, as quais comumente utilizam oxigênio (enzimas oxidases) ou coenzimas contendo anel piridínico [ $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, nicotinamida adenina dinucleotídeo] (enzimas de-hidrogenases ou hidroxilases) como aceptores de elétrons, regenerando a enzima após a reação com o substrato [69].

As enzimas de-hidrogenases formam o maior grupo de enzimas redox conhecido atualmente e diferem das oxidases, por necessitarem de um cofator fisiológico solúvel, que podem ser um acceptor de elétrons (NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup>) ou um doador de elétrons (NADH/NADPH). Cerca de 250 enzimas dependem do par NAD<sup>+</sup>/NADH e cerca de 150 de NADP<sup>+</sup>/NADPH. Assim, um dado substrato poderia ser determinado através de sua reação com o NADP<sup>+</sup> ou NAD<sup>+</sup> e então o NADPH ou NADH poderia ser monitorado através da sua reoxidação eletroquímica.

Contudo, a necessidade de aplicação de um sobrepotencial elevado para oxidação direta do NAD(P)H [133] limita sua aplicação para fins práticos, pois

permite reações paralelas, provocando interferências no sistema e envenenamento da superfície do eletrodo. Um caminho para solucionar este problema é a utilização de mediadores imobilizados sobre a superfície de eletrodos, constituindo, assim, os chamados eletrodos quimicamente modificados (EQM). Estes tem como propriedades o deslocamento do potencial de oxidação de NAD(P)H para regiões onde ocorre minimização de interferentes, melhora na transferência de elétrons, além de aliar seletividade, sensibilidade com um baixo custo de análise. A imobilização de mediadores de elétrons para a eletroxidação do NADH, tem sido extensivamente investigada nas últimas duas décadas [69;134], haja visto o grande número de enzimas NADH dependentes.

## 1.7 ELETROOXIDAÇÃO DE NADH

Devido a sua importância como cofator de várias enzimas que promovem reações de interesse analítico, além da sua função de transportador de elétrons em células vivas, o mecanismo envolvendo a eletroxidação do NADH vem sendo muito estudado [17; 135-138]. A eletroquímica, aliada a outras técnicas tais como espectroscopia, tem sido uma poderosa ferramenta na compreensão das reações envolvidas sobre a superfície dos eletrodos sólidos e quimicamente modificados para a oxidação do NADH. As técnicas eletroquímicas mais comumente utilizadas para tais estudos são as voltamétricas e amperométricas as quais, em muitos casos, são empregadas juntamente com eletrodos de disco rotatório.

### 1.7.1 Eletroxidação Direta de NADH (Eletrodos não modificados)

A oxidação do NADH em meio aquoso, sobre a superfície do eletrodo depende do material do eletrodo utilizado, e requer um alto valor de potencial aplicado. Usando a técnica de voltametria cíclica, um único pico de oxidação foi observado em torno de 0,4; 0,7 e 1V vs. ECS (eletrodo de calomelano saturado), para eletrodos de carbono, platina e ouro, respectivamente [133; 139]. A pior definição do pico de oxidação ocorre quando se utiliza eletrodo de platina [140]. As reações envolvidas nesses tipos de sistemas são irreversíveis, decorrentes da

adsorção dos produtos gerados durante o processo de oxidação do NADH sobre a superfície do eletrodo.

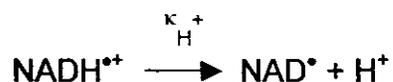
O mecanismo proposto para a eletrooxidação do NADH é do tipo eletroquímico-químico-eletroquímico (ECE) [141-146], como mostra o esquema a seguir.



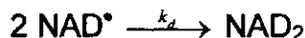
O alto valor de sobrepotencial observado durante a oxidação eletroquímica direta do NADH sobre a superfície do eletrodo é atribuído ao elevado potencial da formação do cátion radical (etapa limitante):



A desprotonação da segunda etapa pode ser considerada como irreversível, devido à alta acidez estimada para o cátion radical,  $\text{pK}_a \approx -4$ , com rápida velocidade de desprotonação,  $k_{\text{H}^{+}} > 10^6 \text{ s}^{-1}$  [147].



Uma possível dimerização do radical  $\text{NAD}^{\cdot}$  durante a formação de  $\text{NAD}^{+}$  [19; 143] tem sido proposta,



com uma constante de dimerização muito alta,  $k_d$ , na ordem de  $10^6$ - $10^7$  mol<sup>-1</sup> L s<sup>-1</sup> [133; 148-150]. A formação de NAD<sup>+</sup> ocorre, posteriormente, através da oxidação de dímeros:



Outra reação que pode estar envolvida é:



Estas oxidações ocorrem sobre superfícies metálicas ou de carbono e são altamente irreversíveis, isto porque, ocorre adsorção dos produtos gerados sobre o eletrodo.

A Figura 2 mostra um resumo da oxidação eletroquímica do NADH, apresentada em uma revisão feita por Gorton *et al.* [28].

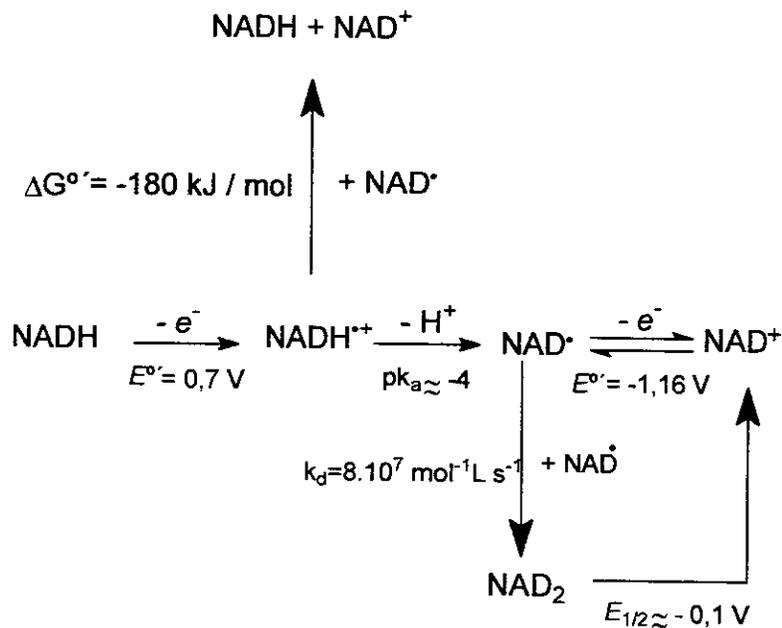


Figura 2. Resumo das etapas da oxidação eletroquímica do NADH. O potencial dado é referente ao ECS, em pH 7,0

## 1.7.2 Eletrodos modificados

Existem duas formas para diminuir o sobrepotencial necessário para a eletrooxidação do NADH, uma delas é através do tratamento da superfície do eletrodo e a outra é pela imobilização de mediadores sobre a superfície do eletrodo os quais serão abordados a seguir.

### 1.7.2.1 Tratamento da superfície do eletrodo

Blaedel e Jenkins [139], mostraram a possibilidade de diminuir o sobrepotencial da eletrooxidação do NADH através do pré-tratamento do eletrodo, sendo mais pronunciado quando se utiliza o eletrodo de carbono. Este fato foi atribuído a grupos oxigenados presentes sobre a superfície do eletrodo em uma forma equivalente a quinona, cujo mecanismo foi proposto anos mais tarde por Samec e Elving [133], como mostra a Figura 3. Neste mecanismo, o próton da posição C(4) do NADH é transferido a uma terceira espécie aceptora de prótons, molécula de H<sub>2</sub>O, através da formação de uma ligação intermediária com o átomo de oxigênio da superfície do eletrodo.

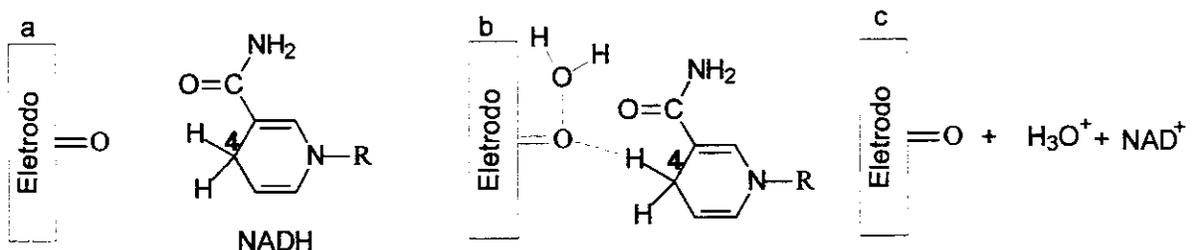


Figura 3. Etapa da transferência do próton, proveniente da oxidação do NADH, para molécula de H<sub>2</sub>O [133]

Apesar do potencial aplicado nos eletrodos tratados ser relativamente menor que aqueles aplicados nos eletrodos não tratados, os primeiros apresentam baixa estabilidade, a qual pode ser resultado do bloqueio e/ou passivação da superfície do eletrodo, devido aos produtos gerados durante a oxidação do NADH.

Por outro lado, efetuando adequadamente os processos de pré-tratamento e condicionamento do eletrodo é possível a obtenção de resultados reprodutíveis [142; 145; 151], entretanto, este tipo de procedimento não torna o eletrodo seletivo para a oxidação do NADH.

A partir dos estudos de Blaedel e Jenkins [139], várias quinonas e seus derivados foram imobilizadas em superfícies de eletrodos com o intuito de diminuir o potencial da oxidação do NADH e melhorar a seletividade do eletrodo.

### **1.7.2.2 Imobilização de mediadores**

O processo de imobilização tem um papel fundamental nas características de sensores e biossensores, uma vez que está relacionada com a orientação e proximidade das moléculas de mediador à superfície do eletrodo, podendo favorecer ou não a transferência de elétrons. Dependendo da metodologia empregada para a imobilização, esta pode afetar nas características da resposta do eletrodo, tais como: constante de ligação do substrato, velocidade máxima da reação, pH ótimo, sensibilidade e estabilidade. A imobilização deve ser realizada de tal forma que a espécie ativa esteja em contato íntimo com o eletrodo, mantendo sua atividade, proporcionando livre difusão de substratos e produtos na camada biocatalítica. Do ponto de vista analítico, a vantagem da imobilização da espécie ativa (mediador ou enzima) é a possibilidade de sua reutilização com diminuição no custo por análise, maior estabilidade, maior sensibilidade e menor interferência de compostos indesejáveis [152].

## **1.8 MEDIADORES PARA A ELETROOXIDAÇÃO DO NADH**

O primeiro trabalho descrito na literatura utilizando eletrodo modificado capaz de diminuir o sobrepotencial de eletroxidação do NADH foi descrito por Tse e Kuwana [153], os quais imobilizaram 3,4-di-hidroxibenzilamina (derivado da quinona) sobre a superfície de eletrodo de carbono vítreo. Tal é a importância deste estudo, que crescente número de publicações sobre eletrodos modificados

com mediadores para a eletrooxidação do NADH têm resultado em um número considerável de revisões [17; 28; 36; 68; 120-121].

Os mediadores servem como uma ponte transferindo elétrons provenientes da oxidação do NADH para o eletrodo de forma mais rápida, além de possibilitar a diminuição do sobrepotencial requerido, e na maioria dos casos, aumentando a seletividade do eletrodo ao NADH. Uma representação esquemática dos eletrodos modificados para a oxidação de NADH é mostrada na Figura 4.

Entre algumas das características básicas que um composto deve apresentar para ser empregado como mediador redox para a eletrooxidação de NADH, pode-se destacar:

- Rápida transferência de elétrons entre o mediador imobilizado e o eletrodo ( $k_s$ ).
- Alto valor de constante global de velocidade de reação ( $k_{obs}$ ).
- Boa reversibilidade.
- Estável na forma oxidada e reduzida.
- O potencial formal deve ser baixo, de tal forma que o sobrepotencial requerido para oxidação do NADH seja reduzido. O intervalo de potencial considerado ótimo para a detecção amperométrica de NADH varia de -0,1 a 0,0 V vs. ECS [121]; pois nesta região de potenciais, as interferências eletroquímicas são minimizadas.

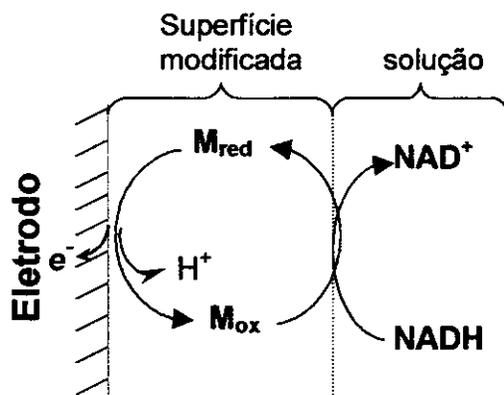


Figura 4. Representação esquemática da oxidação do NADH utilizando eletrodo modificado com mediador.  $M_{ox}$ : mediador oxidado;  $M_{red}$ : mediador reduzido

Os mediadores usados podem ser classificados em dois tipos [135]: compostos que aceitam apenas elétrons, e compostos que aceitam elétrons e prótons. Estes últimos englobam os compostos orto e para-quinonas, quinonaiminas, fenilenodiaminas, flavinas, dentre outros. A constante global de velocidade de reação,  $k_{obs}$ , devido à eletrooxidação do NADH para os eletrodos modificados com mediadores que aceitam dois elétrons e um ou dois prótons, em geral, é superior àqueles que aceitam apenas elétrons [17; 69; 120].

### 1.9 TIPOS DE MEDIADORES UTILIZADOS NA MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS PARA NADH

Mediadores adequados para a oxidação do NADH devem ter estruturas que permitam a transferência de prótons e elétrons do NADH para a forma oxidada do mediador, cujo mecanismo pode ser resumidamente representado pela Figura 5 [17; 154].

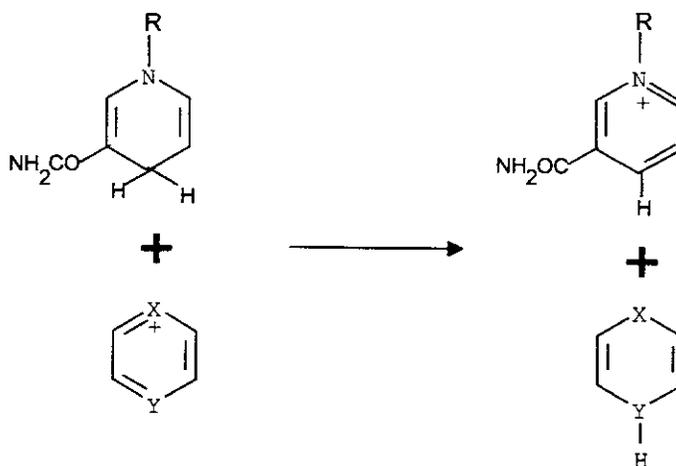


Figura 5. Mecanismo geral proposto para a eletrooxidação do NADH utilizando mediador, onde (X = O, S) e (Y = N)

Vários pesquisadores têm utilizado mediadores com estruturas semelhantes aos mostrados na Figura 5, porém com um maior número de anéis aromáticos, desta forma há uma melhora significativa na estabilidade do eletrodo para a eletrocatalise do NADH. Dentre esses mediadores uma série de compostos

orgânicos derivados da fenotiazina, fenoxazina, fenazina e flavinas têm sido usados (Figura 6).

Os valores do  $E^{\circ}$  dos eletrodos modificados com corantes orgânicos por ligação covalente [155; 156] e por eletropolimerização [157-158], são dependentes do pH da solução. Estes materiais são bastante estáveis, e quando imobilizados sobre materiais inorgânicos, tais como sílica gel modificada com óxido metálico ou fosfato de zircônio; verificou-se mudanças no valor do  $E^{\circ}$  para regiões mais positivas, além do  $E^{\circ}$  independente do pH da solução [59; 159]. Esta mudança do  $E^{\circ}$  foi atribuída à acidez da matriz.

Gorton [17] verificou que existe uma correlação entre o  $E^{\circ}$  do mediador com a velocidade de reação da eletrooxidação do NADH, para os corantes orgânicos, como pode ser observado na Figura 7. Nesse sentido, muitos pesquisadores buscam encontrar mediadores e métodos de imobilização que resultem em  $E^{\circ}$  na região considerada ideal de trabalho.

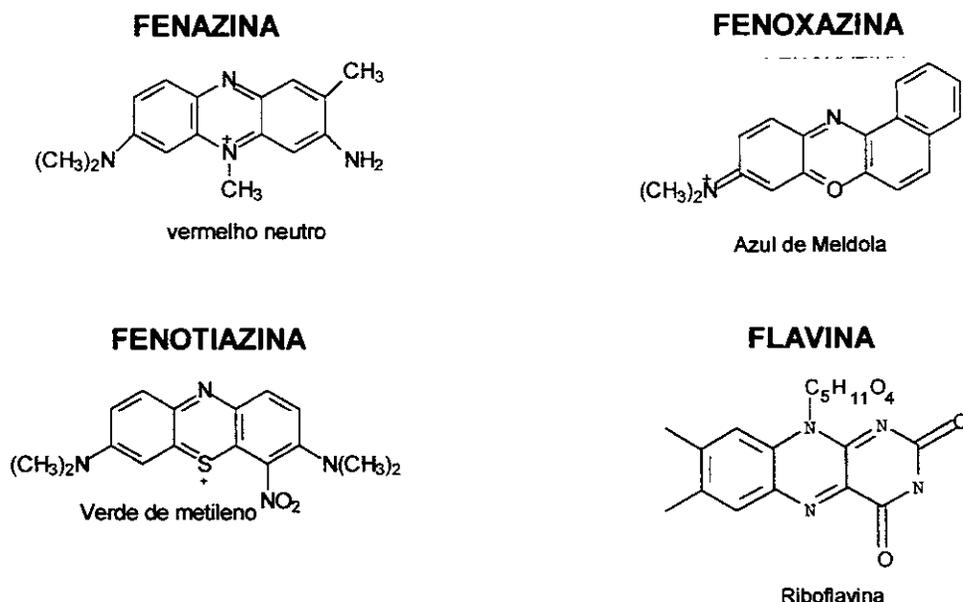


Figura 6. Estruturas de derivados de fenazina, fenoxazina, fenotiazina e flavinas

Flavinas vêm sendo imobilizadas sobre a superfície de diferentes tipos de eletrodos sólidos, tais como: ouro, platina e carbono, cujo valor do  $E^{\circ}$  em função do pH da solução apresenta comportamento semelhante da flavina em solução

[40; 160; 129]. No entanto, alguns trabalhos [52-53] têm mostrado que o valor do  $E^{\circ}$  da flavina quando imobilizada sobre fosfato de Zr ou Ti, incorporada em eletrodo de pasta de carbono, desloca para regiões mais positivas quando comparado com seu valor em solução. Outro fato bastante interessante é que o  $E^{\circ}$  é independente do pH da solução. A mudança do valor de  $E^{\circ}$  da riboflavina decorrente da imobilização, assim como a independência de seu valor em função do pH da solução pode fornecer informações preciosas, uma vez que, possibilita estudar a influência do pH sobre a velocidade de reação entre flavina e NADH [52; 121; 161].

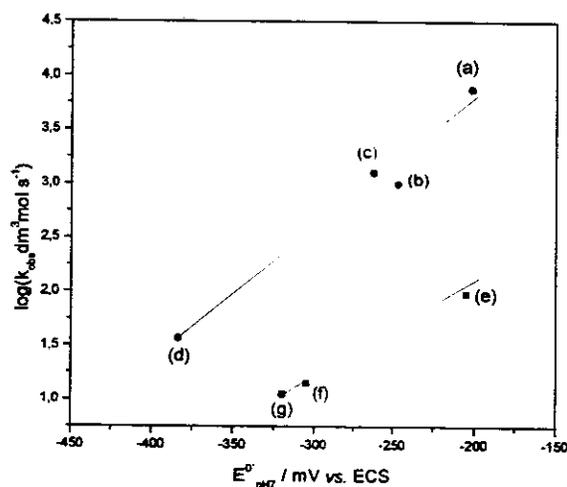


Figura 7. Variação da constante global de velocidade de reação em função do potencial formal dos derivados de fenoxazina em 0,25 mol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato, pH 7: (a) 7-dimetilamino-1,2-benzofenoxazínio (azul de meldola); (b) 1,2 -benzofenoxazina-7-ona; (c) 3-hidroxifenoxazina-7-ona (Resorufin); (d) 3-amino-7-dietilamino-1,2-benzofenoxazínio (azul de nilo); (e) ácido 7-dimetilamino-4-hidroxi-3-oxo-3 H-fenoxazina-1-carboxílico (galocianina); (f) 3,7-bis(dimetilamino)fenoxazínio (metil azul de capri); (g) 3,7-bis(dietilamino)fenoxazínio (etil azul de capri) [17]

Outra classe de mediador pouco explorada por métodos eletroquímicos para a eletrooxidação do NADH é a pirroloquinolina quinona [162-165], PQQ, que assim como as flavinas, é um cofator importante de várias enzimas

de-hidrogenases [166-168]. Da mesma forma que as quinonas, este composto apresenta boa atividade eletroquímica e alta estabilidade, e tem sido imobilizado sobre a superfície do eletrodo juntamente com enzimas [169] e anticorpos [170]. O grupo de Willner tem imobilizado a PQQ covalentemente ligada a superfície do eletrodo de ouro modificada com monocamada de cisteamina. A PQQ imobilizada apresenta capacidade de eletrooxidar o NADH e esta propriedade eletrocatalítica aumenta consideravelmente na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  [171].

Através de outros trabalhos, como o de Pariente *et al.* [172] também é possível observar um significativo aumento da corrente eletrocatalítica da oxidação do NADH na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , utilizando como mediador, filme de derivado de 3,4-dihidroxibenzaldeído eletrodepositado sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo. Nesse mesmo sentido, Cai e Xue [173] utilizaram eletrodo de carbono vítreo modificado com poli(azul de toluidina) usando diferentes cátions ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{NH}_4^+$ ). O maior aumento na propriedade eletrocatalítica foi observado apenas para íons  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , aumento de cerca de 2 vezes em relação à catálise na ausência destes íons. Cai e Xue [173] concluíram que esse efeito dos íons deve ser um processo semelhante ao descrito por Katz, ou seja, a formação de um complexo ternário durante o processo de transferência de carga é responsável pelo aumento na corrente eletrocatalítica de oxidação do NADH, do mesmo modo, houve um aumento na estabilidade do eletrodo na presença desses íons. A forma como esses cátions divalentes atuam no aumento da propriedade eletrocatalítica do NADH ainda não está totalmente esclarecida.

Como pode ser observado, existe na literatura uma ampla variedade de mediadores que, com o desenvolvimento de novos métodos de imobilização, tem possibilitado a construção de novos tipos de configurações de eletrodos modificados para NADH.

Baseado nestes aspectos apresentados até aqui, esta Tese teve por finalidade enfatizar a importância do estudo de flavinas em diferentes suportes, buscando o entendimento e a compreensão dos efeitos destes suportes no comportamento eletroquímico destes compostos. Além disso, outra proposta deste

trabalho, é uma investigação das propriedades eletrocatalíticas de diferentes sistemas empregando flavina imobilizada frente à soluções de NADH.

Outro ponto importante deste trabalho é a investigação do comportamento da eletrooxidação catalítica do NADH empregando *o*-fenilenodiamina imobilizada e um aprofundamento no estudo do mecanismo desta reação, empregando as metodologias dos estudos de cinética de reação.

É importante ressaltar que, devido às dificuldades observadas pelos pesquisadores ao se trabalhar com a *o*-fenilenodiamina, existem poucos trabalhos na literatura envolvendo este composto. Desta forma, este trabalho ilustrará as suas potencialidades e contribuirá para que futuras aplicações empregando este composto sejam feitas.

TESE DE DOUTORADO

## **II. OBJETIVOS**

## **II. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi o de caracterizar eletroquimicamente diferentes compostos orgânicos eletroativos, tais como: riboflavina (RF), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e *o*-fenilenodiamina (FDA) os quais foram imobilizados em diferentes matrizes inorgânicas.

Além destes aspectos, a tentativa de elucidar o mecanismo de transferência de elétrons/prótons entre estes mediadores e o NADH, foi o foco principal deste trabalho de Tese.

Desta forma, o projeto teve os seguintes objetivos:

- 1 ) Promover a modificação da sílica gel ou material sol-gel com óxido de nióbio ou fosfato de nióbio;
- 2 ) Estudar o comportamento eletroquímico dos sistemas a base de riboflavina (RF), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e *o*-fenilenodiamina (FDA) adsorvidos nas diferentes matrizes e misturados em pasta de carbono;
- 3 ) Avaliar os efeitos de acidez, área superficial e porosidade, das matrizes empregadas sobre o comportamento eletroquímico dos diferentes sistemas;
- 4 ) Avaliar a cinética da transferência de elétrons entre as espécies imobilizadas e o eletrodo;
- 5 ) Estudar a oxidação eletrocatalítica do NADH, usando os eletrodos modificados
- 6 ) Determinar os parâmetros cinéticos da oxidação eletrocatalítica do NADH frente aos sistemas desenvolvidos, empregando eletrodo de disco rotatório.

TESE DE DOUTORADO

## **III. PARTE EXPERIMENTAL**

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### III.1 Reagentes

Antes de ser utilizada a sílica gel (Fluka) com diâmetro médio dos poros de 6 nm, com tamanho de partículas entre 0,050-0,200  $\mu\text{m}$  (Merck) e área específica de  $520 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , foi ativada durante 2 horas à  $150^\circ\text{C}$ . O procedimento de modificação da superfície da sílica gel com óxido de nióbio (V) será descrito posteriormente. Esta matriz, denominada (**SN**), foi numa etapa seguinte enxertada com fosfato (**SNP**) e o procedimento também será descrito adiante. Além desta matriz, também foi utilizado nesta Tese, um material modificado com óxido de nióbio V obtido pelo processo sol-gel, cuja obtenção também será descrita adiante, o qual foi denominado (**SN<sub>sol-gel</sub>**). Este material foi numa outra etapa enxertado com fosfato e denominado de (**SNP<sub>sol-gel</sub>**).

Os reagentes, grafite em pó (Aldrich), óleo mineral (Nujol), riboflavina - RF (Sigma), flavina adenina dinucleotídeo - FAD (Sigma) e o-fenilenodiamina - FDA (Sigma) eram de pureza superior a 98 % e foram utilizados sem tratamento prévio, bem como os demais reagentes descritos abaixo:

-  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) na forma reduzida 98 % (Merck). O coeficiente de absorvidade molar do NADH a 340 nm [52] é de  $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , o qual foi utilizado para conferir a concentração real do NADH em solução durante a realização dos experimentos.

- **Soluções Tampões:** HEPES (Sigma), PIPES (ácido 1,4-piperazina-dietano sulfônico) (Sigma), TRIS 99% (Sigma),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Synth),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Synth).

- **Eletrólitos de suporte:** NaCl (Nuclear),  $\text{NaNO}_3$  (Nuclear),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Nuclear),  $\text{NaClO}_4$  (Merck),  $\text{KNO}_3$  (Nuclear),  $\text{LiNO}_3$  (VETEC),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Nuclear),  $\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Synth)

- **Ácido e base para ajuste de pH das diversas soluções:** HCl (Merck),  $\text{HNO}_3$  (Merck), NaOH (VETEC), LiOH (HACH),  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Nuclear) e  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Synth). O pH das soluções foi ajustada sempre utilizando o ácido ou a base contendo o íon comum do eletrólito de suporte empregado.

Água purificada pelo sistema Milli Q foi utilizada no preparo das soluções.

### III.2 Equipamentos

- A quantidade de nióbio ou fosfato depositada sobre as diferentes matrizes inorgânicas utilizadas, foi determinada por fluorescência de raio X, empregando um espectrômetro modelo Tracor 5000 da Spectrace.

- Um aparelho da Micrometrics Instrument Corporation, modelo FlowSorb 2300, foi empregado para determinar a área superficial específica das diferentes matrizes.

- Os diâmetros médios dos poros, para os diferentes materiais, foram determinados empregando-se um analisador de poros e área superficial ASAP 2010 da Micrometrics Instrument Corporation.

- Um Potenciostato modelo PGSTAT30 (*EcoChemie*) da AUTOLAB® interfaceado a um microcomputador (Software : GPES 4,8), foi empregado para as medidas eletroquímicas;

- Um Potenciômetro Corning 350 e um eletrodo de vidro combinado, foram empregados para o ajuste do pH das diferentes soluções.

- Um Analisador Elementar 2400 CHN, Perkin Elmer, foi utilizado na determinação do teor de flavinas ou fenilenodiamina estudadas nos diferentes experimentos realizados.

### III.3. Modificação da superfície da sílica gel com óxido de nióbio (V)

Para a modificação da superfície da sílica gel esta foi previamente ativada em estufa a aproximadamente 100° C por 4 horas.

Pesou-se 22 g de pentacloreto de nióbio ( $NbCl_5$ ) o que equivale a 0,081 mol os quais foram lentamente dissolvidos em 40 mL de etanol anidro. Após esta etapa foi adicionado 300 mL de tetracloreto de carbono a esta solução.

Na sequência foram adicionados cerca de 50 g de sílica ativada e a mistura resultante foi refluxada por 20 horas sob agitação constante [174]. O produto da reação foi filtrado, lavado com tetracloreto de carbono e etanol e, então, seco por 4 horas à temperatura de 140° C. O material seco foi imerso em água bidestilada

por várias horas para que fosse hidrolisado. O produto final foi seco à temperatura de 100 °C por 4 horas.

Este material foi denominado de **SN**.

A Figura 8 ilustra o sistema utilizado durante a modificação da superfície da sílica gel com óxido de nióbio (V).

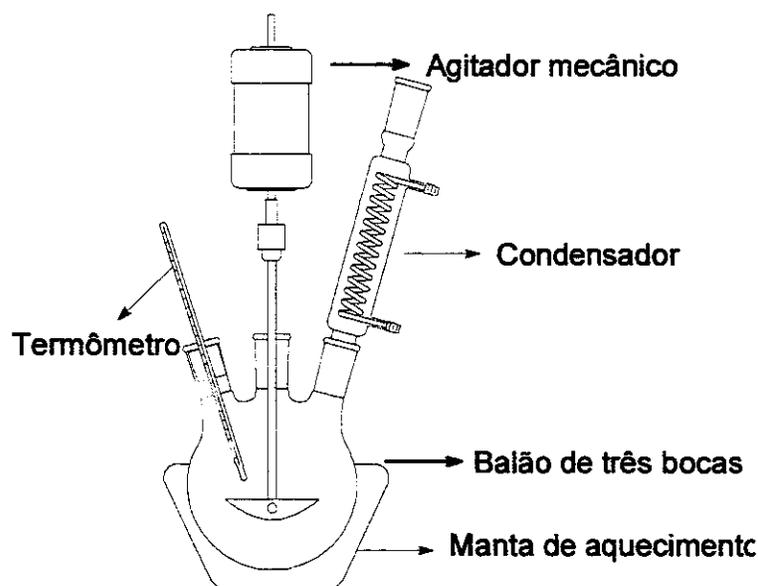


Figura 8. Sistema empregado durante o processo de modificação da superfície da sílica gel com óxido de nióbio (V)

#### III.4 Material modificado com óxido de nióbio V obtido pelo processo sol-gel

Este material foi fornecido pelo Prof. Dr. Yoshitaka Gushikem do Departamento de Química Inorgânica do IQ/UNICAMP e o procedimento experimental desta síntese é descrito na literatura [175].

Nesta Tese, este material foi denominado de **SN<sub>sol-gel</sub>**.

#### III.5 Enxerto de fosfato sobre a superfície de SN e SN<sub>sol-gel</sub>

A 25 mL de uma solução de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>, adicionou-se 1 g do material original, SN ou SN<sub>sol-gel</sub>, e manteve-se esta mistura em repouso, a temperatura ambiente, por cerca de 2 horas. Após esta etapa, a mistura foi filtrada e o material

obtido foi lavado exaustivamente com água deionizada para retirar o excesso de ácido, até neutralização.

Os materiais obtidos foram denominados **SNP** e **SNP<sub>sol-gel</sub>**, respectivamente.

### III.6 Caracterização dos materiais modificados com óxido de nióbio (**SN** e **SN<sub>sol-gel</sub>**) e enxertada com fosfato (**SNP** e **SNP<sub>sol-gel</sub>**)

Na quantificação de nióbio sobre a sílica gel modificada, por fluorescência de raio X de energia dispersiva, foram preparados padrões utilizando-se sílica gel (230-400 mesh) e óxido de nióbio ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ). É importante a homogeneização da amostra (uniformidade da granulometria) devido à sensibilidade da análise por fluorescência de raio-X depender do tamanho das partículas, no sentido de diminuir os desvios nas medidas de intensidade de raio X (contagem por segundo (CPS)).

Utilizou-se nesta etapa do trabalho um espectrômetro modelo Tracor 5000 da Spectrace.

As condições de irradiação para quantificar o nióbio seguiram os seguintes parâmetros:

Vtagem no tubo de raios X: 30 kV

Corrente no tubo de raios X: 0,02 mA

Filtro: fino

Tempo de irradiação: 100 s

Atmosfera: ar

O material sol-gel (fornecido pelo Prof. Dr. Yoshitaka Gushikem) já havia sido caracterizado quanto à quantidade de nióbio e as condições de irradiação para quantificar este metal foram as mesmas empregadas para a sílica gel modificada.

Na quantificação de fósforo foram preparados padrões utilizando-se fosfato de sódio previamente seco a 100°C e os parâmetros otimizados de irradiação para a determinação de P foram os seguintes:

Voltagem no tubo de raios X: 10 kV  
Corrente no tubo de raios X: 0,05 mA  
Filtro: nenhum  
Tempo de irradiação: 100 s  
Atmosfera: vácuo

O uso de vácuo se justifica na quantificação de elementos leves (fósforo) já que seus coeficientes de absorção para raio X são baixos. Com isso, para melhorar a eficiência da interação deve-se remover qualquer empecilho ao feixe, incluindo átomos e moléculas presentes no ar.

Ainda como parte da caracterização da matriz foram determinadas as áreas superficiais para a sílica gel pura e modificada com óxido de nióbio através do método BET de multipontos, utilizando-se um aparelho da Micrometrics Instrument Corporation, modelo FlowSorb 2300.

### III.7 Imobilização da riboflavina sobre **SN**, **SNP**, **SN<sub>sol-gel</sub>** e **SNP<sub>sol-gel</sub>**

A 25,0 mL de uma solução aquosa de RF 0,01% (m/v) foram adicionados 200,0 mg da matriz previamente preparada. A mistura foi mantida sob agitação por cerca de 2 horas à temperatura ambiente e o material obtido, de coloração fortemente amarela foi filtrado e lavado 10 vezes com água deionizada. Finalmente o sólido contendo a riboflavina imobilizada foi seco a 50° C por 30 minutos. Estes materiais foram denominados como: SNRF, SNPRF, SNRF<sub>sol-gel</sub> e SNPRF<sub>sol-gel</sub>.

#### III.7.1 Imobilização de FAD sobre SN

O procedimento descrito no item anterior foi empregado para a imobilização de FAD sobre a superfície de SN. O material obtido foi denominado de SNFAD.

### III.7.2 Imobilização de o-fenilenodiamina (FDA) sobre SN

A 25,0 mL de uma solução de FDA 0,02% (m/v) foram adicionados 200,0 mg de SN. Esta mistura foi mantida sob agitação por cerca de 2 horas à temperatura ambiente. Após esta etapa, a mistura foi filtrada e o material obtido, de coloração levemente amarela, foi seco à temperatura ambiente e armazenado em dessecador. Este material foi denominado de SNFDA.

### III.8 Caracterização da riboflavina adsorvida nas diferentes matrizes

Para a análise do teor de riboflavina adsorvida nas diferentes matrizes, utilizou-se uma massa de 5,0 mg do material a ser analisado e os resultados serão mostrados adiante.

Utilizou-se nesta etapa um Analisador Elementar CHN 2400 da Perkin Elmer.

Através deste mesmo procedimento experimental os materiais SNFAD e SNFDA também foram caracterizados.

### III.9 Célula Eletroquímica e Eletrodos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula de vidro contendo seis orifícios: três para os eletrodos, um para entrada, um para saída de gás ( $N_2$  de alto grau de pureza) e um para adição de reagentes, como pode ser observado na Figura 9.

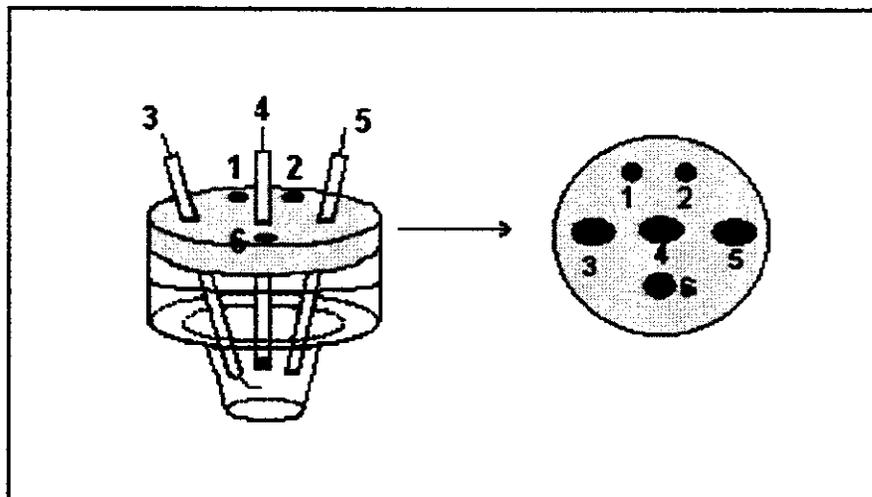


Figura 9. Representação esquemática da cela eletroquímica. Entrada de gás na superfície (1) e na solução (2), eletrodo auxiliar (3), eletrodo de trabalho (4), eletrodo de referência (5) e local de injeção da amostra (6)

Estas medidas foram realizadas num potenciostato modelo PGSTAT 30 da Autolab.

A pasta de carbono para a maioria dos estudos realizados, foi preparada a partir da mistura de 10 mg de grafite, 15 mg de modificador (sílica + espécie eletroativa) e 40  $\mu\text{L}$  de óleo mineral para a obtenção de uma mistura homogênea. Esta pasta foi colocada na cavidade do eletrodo de trabalho com profundidade de 0,1 cm e diâmetro interno de 0,4 cm, ilustrado na Figura 10.

O eletrodo contendo a pasta de carbono foi polido sobre a superfície de papel sulfite até a obtenção de uma superfície lisa.

O eletrodo auxiliar utilizado consistiu de um fio de platina em forma de espiral e como eletrodo de referência utilizou-se um eletrodo de calomelano saturado (ECS). Antes de cada experimento, a solução de trabalho foi borbulhada com  $\text{N}_2$  e, durante a realização do mesmo, o fluxo de gás foi mantido apenas sobre a superfície da solução.

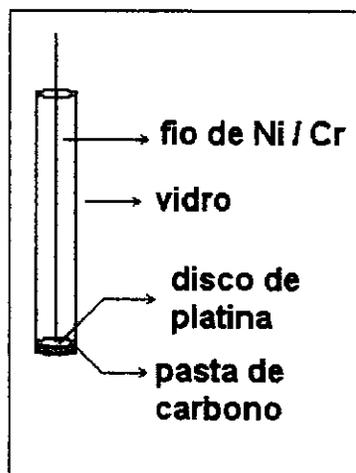


Figura 10. Representação esquemática do eletrodo de trabalho (pasta de carbono)

As medidas para o estudo da cinética do processo eletrocatalítico do NADH, envolvendo variação da velocidade de rotação do eletrodo, foram realizadas utilizando-se um eletrodo de disco rotatório, conforme ilustrado na Figura 11.

Este eletrodo foi construído na Oficina Mecânica do IQ/UNICAMP, e é constituído de um bastão de Teflon 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 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.

Inicialmente a cavidade deste eletrodo era preenchida pela pasta de carbono contendo a SNFDA e para a determinação de  $\Gamma$  (cobertura da superfície do eletrodo com os mediadores de elétrons, em  $\text{mol cm}^{-2}$ ), que é um parâmetro muito importante na determinação das constantes cinéticas da reação entre o mediador imobilizado e o NADH, empregou-se voltametria cíclica à velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  em 5,0 mL de solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

Após esta etapa, preparou-se uma solução estoque de NADH na concentração de  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  e adicionou-se  $20 \mu\text{L}$  desta na cela eletroquímica contendo a solução tampão fosfato. A partir deste ponto, variou-se a velocidade de

rotação de 30 a 400 rpm e com dados obtidos construiu-se uma curva do inverso da corrente eletrocatalítica em função do inverso da raiz quadrada da velocidade de rotação, a fim de se determinar o  $\kappa_{\text{obs}}$  (constante global da reação) para uma primeira concentração de NADH neste valor de pH (7,0).

Na seqüência, adicionou-se novamente, 20  $\mu\text{L}$  de NADH, e repetiu-se o procedimento descrito acima, a fim de se determinar as demais constantes cinéticas da reação a pH 7,0.

Estes estudos foram realizados num intervalo de pH de 5,0 a 8,5 e para todos estes valores, determina-se inicialmente o  $\Gamma$  e repetia-se as demais etapas como descrito acima.

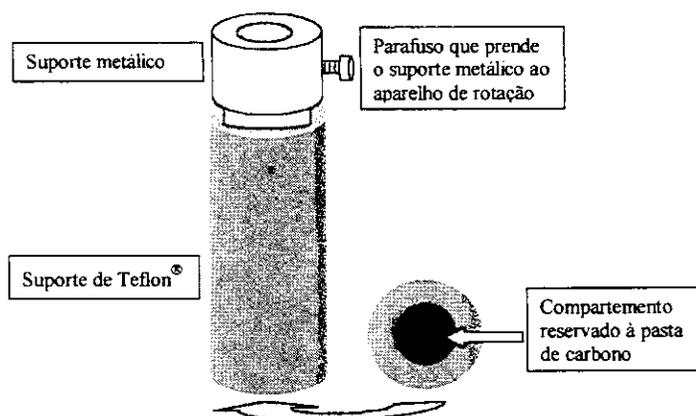


Figura 11. Eletrodo utilizado nos estudos de disco rotatório

### III.10 Otimização da preparação do eletrodo de trabalho por planejamento fatorial

Um planejamento fatorial  $2^3$  (estudo de 3 fatores em 2 níveis de resposta) foi empregado a fim de otimizar a preparação do eletrodo de pasta de carbono contendo RF imobilizada, utilizando-se para tal diferentes procedimentos de preparação deste eletrodo. A importância deste estudo é que este eletrodo otimizado seria empregado, numa etapa posterior desta Tese, na caracterização eletroquímica da RF imobilizada.

Neste estudo, foram utilizados eletrodos de pasta de carbono contendo RF imobilizada em sílica gel modificada com óxido de nióbio (SNRF) para a obtenção de sinal analítico através de voltametria cíclica (VC) no intervalo de potencial de -600 a 0 mV a  $v=20 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de  $\text{NaNO}_3$  (pH 7,0), de onde foram obtidas as respostas da corrente de pico anódico ( $I_{p_a}$ ) para o planejamento fatorial  $2^3$ .

Os fatores analíticos estudados foram: a relação entre as quantidades de grafite e sílica modificada contendo a RF imobilizada (denominado fator proporção), a forma de preparação dos eletrodos (fator mistura) e a concentração do eletrólito suporte (fator concentração).

Diferentes procedimentos de preparação do eletrodo de pasta de carbono foram realizados sendo variadas as proporções entre grafite e SNRF nos seguintes valores: 50% de grafite / 50% de SNRF (nível -) e 40% de grafite / 60% de SNRF (nível +); na mistura entre estes dois reagentes, onde, no primeiro caso, misturou-se inicialmente, grafite e SNRF e após isto adicionou-se o óleo mineral (mistura 1, nível -) e num segundo processo, preparou-se inicialmente, uma pasta com grafite e óleo mineral e posteriormente adicionou-se a SNRF (mistura 2, nível +). Finalmente, as respostas foram obtidas em solução de  $\text{NaNO}_3$  nas concentrações de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (nível -) e  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (nível +).

TESE DE DOUTORADO

**IV. RESULTADOS**

**E**

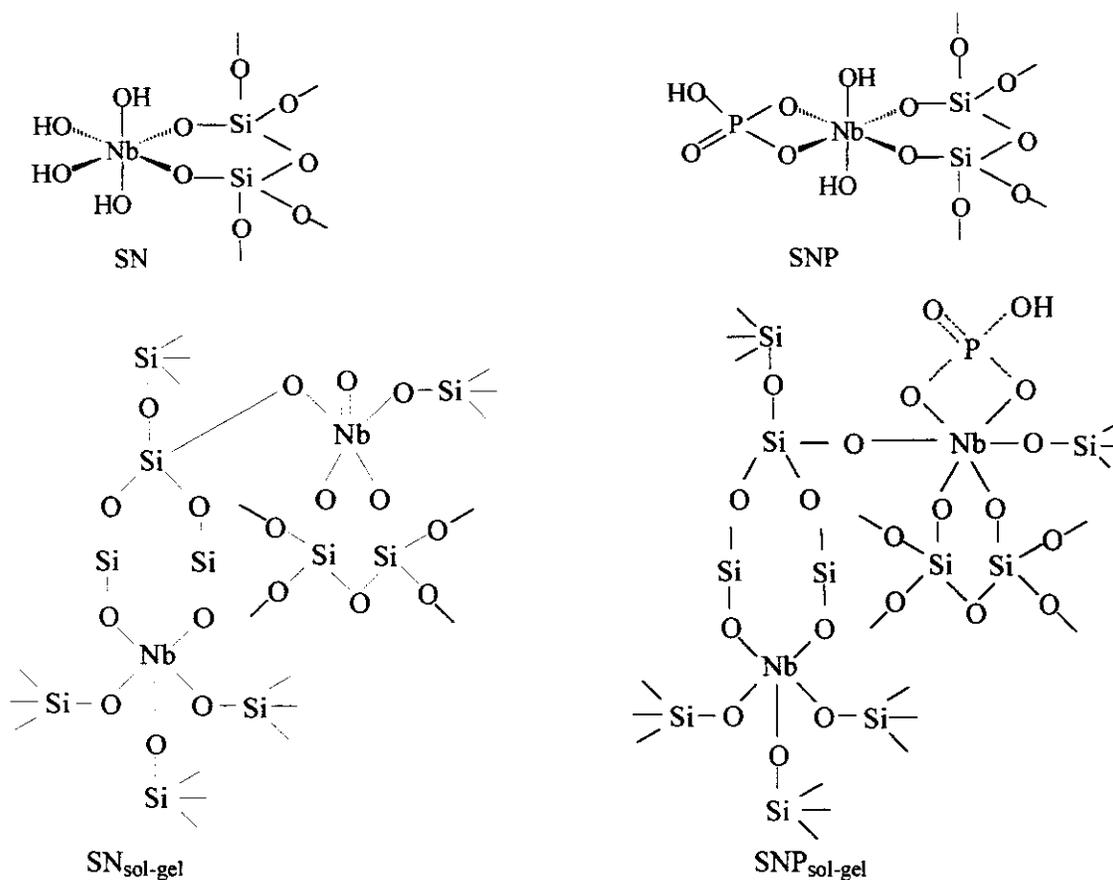
**DISCUSSÕES**

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### IV. 1 Caracterização dos Materiais

A modificação da superfície da sílica gel com óxido de nióbio ocorreu de acordo com o procedimento descrito na literatura [174], onde, nesta reação, o pentacloreto de nióbio foi dissolvido em álcool etílico, formando o etanoato de nióbio, o qual é solúvel em tetracloreto de carbono, que foi o solvente empregado nesta reação. É importante destacar, que o pentacloreto de nióbio ( $\text{NbCl}_5$ ) é insolúvel neste meio.

Os grupos hidroxilas do óxido de nióbio,  $(\text{=SiO})_n\text{Nb}(\text{OH})_{5-n}$ , que é o sítio dos materiais obtidos, são bem conhecidos por serem ácidos, os quais devem ser os responsáveis pela adsorção da RF nestas matrizes. O Esquema 2 ilustra os sítios de adsorção dos diferentes materiais ( $\text{SN}$ ,  $\text{SNP}$ ,  $\text{SN}_{\text{sol-gel}}$  e  $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$ ) empregados nesta tese.



Esquema 2. Sítios de adsorção dos diferentes materiais.

A quantidade de nióbio aderido sobre a superfície da sílica gel, determinada por espectrometria de fluorescência de raio-X, foi  $1,4 \text{ mmol g}^{-1}$ . Esta quantidade é maior quando comparada com os resultados descritos na literatura [174], para outros óxidos metálicos tais como titânio e zircônio. Entretanto, este valor foi ligeiramente menor que  $1,6 \text{ mmol g}^{-1}$  apresentado pelo sistema  $\text{SN}_{\text{sol-gel}}$ . Esta diferença é devida ao processo de imobilização de nióbio desde que para SN este metal está presente apenas sobre a superfície da sílica gel, ou seja, o nióbio é depositado (imobilizado) sobre a superfície da sílica gel que é um sólido.

Por outro lado, a  $\text{SN}_{\text{sol-gel}}$  é uma matriz preparada, ou seja, temos dois precursores principais, quais sejam : TEOS (tetraetoxissilano) e  $\text{NbCl}_5$  (pentacloreto de nióbio) dissolvido em etanol, que são misturados e portanto o metal deve estar distribuído em toda a matriz, incluindo também o interior da mesma, o que justifica a maior quantidade de nióbio presente na matriz preparada pelo processo sol-gel em relação a SN.

Utilizando também a espectrometria de fluorescência de raio X, determinou-se as quantidades de fosfato presentes nos materiais SNP e  $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$ , sendo que os valores obtidos foram:  $1,1 \text{ mmol g}^{-1}$  e  $0,78 \text{ mmol g}^{-1}$ , respectivamente.

Tendo em vista que a reação entre a sílica gel modificada com óxido de nióbio (SN) e o grupo fosfato deveria ocorrer na proporção 1:1, e que os resultados obtidos experimentalmente conduziram a uma relação de aproximadamente 1:0,8, é possível afirmar que, a reação se processa com boa eficiência. Provavelmente a pequena diferença entre os valores encontrados para nióbio e fosfato decorre da inacessibilidade de alguns átomos de nióbio pelo fosfato. Para o material sol-gel, a relação entre a quantidade de fosfato e nióbio apresenta valor de proporção nióbio-fosfato de aproximadamente 1:0,5, e isto pode ser explicado pelo fato de que os átomos de nióbio na matriz sol-gel estão distribuídos por todo o material e, portanto, aproximadamente a metade dos átomos de nióbio presentes na matriz sol-gel estão no interior do material e inacessíveis para reagirem com o fosfato. Estas observações sugerem ainda, que provavelmente, os materiais preparados pelo processo sol-gel devem apresentar diâmetro médio de poros menores que os materiais preparados pelo processo gel,

fato este explicado pela dificuldade de interação entre o fosfato e o nióbio nos mesmos.

As áreas específicas para a sílica gel pura e modificada com óxido de nióbio foram obtidas pelo método de multipontos BET. Este método baseia-se na determinação da quantidade de gás que é adsorvido formando uma camada monomolecular na superfície do material analisado. Depois da modificação, um pequeno decréscimo,  $496 \pm 7 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , comparado à área inicial,  $520 \pm 8 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , foi observado. Este decréscimo está relacionado ao bloqueio dos poros menores da sílica durante o processo de modificação, assim como a coalescência de alguns poros [174, 176]. A área superficial específica para a sílica sol-gel modificada com óxido de nióbio apresentou um valor de  $703 \pm 13 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . Este valor é muito atrativo visando a imobilização de espécies eletroquimicamente ativas, entretanto o número de sítios ativos também deve ser considerado. A área superficial para as matrizes fosfatadas (SNP e  $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$ ), apresentaram valores menores (Tabela 3) que as respectivas matrizes não fosfatadas (SN e  $\text{SN}_{\text{sol-gel}}$ ). Esta diminuição se deve provavelmente a coalescência dos poros das matrizes originais.

Outro aspecto importante diz respeito a determinação do tamanho de poro dos diferentes materiais (Tabela 3). A sílica gel apresentou diâmetro médio dos poros igual a 6,0 nm, enquanto o material sol-gel apresentou valor de 2,4 nm, sendo que esta diferença pode influir nas características eletroquímicas da RF imobilizada sobre estes materiais. A discussão sobre este efeito será abordada adiante.

A quantidade de RF adsorvida sobre a superfície da sílica modificada, obtida por análise elementar é mostrada na Tabela 3. Os resultados são próximos daqueles observados na literatura [177] para sistemas similares. A maior quantidade de RF adsorvida sobre SNP do que sobre SN é atribuída a maior quantidade de grupos ácidos do fosfato presentes sobre a superfície da sílica modificada com nióbio. Isto sugere que a adsorção das moléculas de RF ocorre preferencialmente nos sítios ácidos da matriz, devido aos grupos fosfato. Portanto, a interação ácido-base deve ser a responsável pela imobilização da RF sobre a superfície do material.

As maiores quantidades de RF adsorvida sobre sílica sol-gel do que sobre a sílica gel é atribuída à maior área superficial dos materiais sol-gel. A interação da riboflavina com as matrizes SN e SN<sub>sol-gel</sub> ocorre possivelmente através do nitrogênio básico da RF e o sítio ácido do material ( $\equiv\text{SiO}$ )<sub>n</sub>Nb(OH)<sub>5-n</sub>. Nas matrizes fosfatadas a interação deve ocorrer através do nitrogênio básico da RF e o sítio ácido do fosfato presentes sobre as matrizes.

Tabela 3. Diâmetro médio dos poros, área superficial e quantidades de nióbio, fósforo e riboflavina (RF) adsorvidas sobre as diferentes matrizes utilizadas

Material	Diâmetro médio dos poros (nm)	Área superficial (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	μmol de Nb / g de material	μmol de P / g de material	μmol de RF / g de material*
SN	6,0	496±7*	1400±20	-	27±1
SNP	6,0	471±7	1400±20	1100±20	31±1
SN <sub>sol-gel</sub>	2,4	703±13	1600±20	-	36±1
SNP <sub>sol-gel</sub>	2,4	665±11	1600±20	780±15	44±2

\* Os resultados apresentados nesta Tabela e nas demais foram obtidos em triplicata e são estimativas do desvio padrão

Finalizando esta etapa de caracterização dos materiais, propomos como um etapa futura a determinação da acidez dos diferentes (acidez de Lewis e de Bronsted), a fim de confirmar as discussões realizadas ao longo deste trabalho, onde o comportamento eletroquímico da RF imobilizada é avaliado em termos do efeito da acidez, área superficial e porosidade, dos materiais empregados.

#### IV. 2. Justificativa para o emprego de diferentes materiais

A imobilização de mediadores de elétrons sobre superfícies para produzir eletrodos quimicamente modificados para uso em eletroanálise, vem sendo amplamente investigado durante as últimas duas décadas [63, 178-180]. Eletrodos modificados com quinonas, flavinas e outras classes de compostos quinóicos, tais como: fenoxazina, estão sendo amplamente explorados para o desenvolvimento de sensores [69, 121, 129, 181].

A importância de flavinas em catálises enzimáticas tem motivado os estudos do comportamento eletroquímico de monocamadas ou agregados contendo flavinas sintéticas [41]. A flavina nucleotídeo tem a habilidade única de transferir um ou dois elétrons e promover a redução de oxigênio molecular [182]. As flavinas também trabalham como coenzimas redox em muitas transformações biológicas e, conseqüentemente, elas tem sido utilizadas como mediadores redox entre o eletrodo e várias enzimas [183]. Além disso, as flavinas são mediadores eficientes para a oxidação bioeletroquímica da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) [138]. Portanto, há um especial interesse no estudo da reação entre flavina com NADH [39, 43-44]. Entretanto o maior obstáculo encontrado neste tipo de estudo é a relativamente, baixa diferença entre os valores de  $E^0$  do NADH e da flavina livre, a qual resulta numa reação cineticamente lenta e termodinamicamente desfavorável.

Através do desenvolvimento de novos eletrodos modificados, vários caminhos alternativos tem sido mostrados para mudar o  $E^0$  de uma reação/catálise como um resultado do processo de imobilização [85, 184]. Diferentes materiais de eletrodo estão sendo empregados, tais como: diferentes carbonos, ouro, platina, etc. [38, 185-186]. O material do eletrodo usualmente afeta o  $E^0$  das espécies eletroativas [165], e a estabilidade depende do procedimento de imobilização [161]. Muitas tentativas estão sendo feitas para deslocar o  $E^0$  dos compostos eletroativos para inserí-los dentro do intervalo de potencial considerado ideal (-100 a 0 mV) com o propósito de desenvolver biossensores [165,187] e para aumentar a atividade electrocatalítica.

Os eletrodos de pasta de carbono são os mais utilizados, desde que estas superfícies são facilmente renovadas, apresentam baixa corrente de fundo e um amplo intervalo de potencial de trabalho [188]. Apesar disso, a incorporação de espécies em eletrodos de pasta de carbono ainda necessita ser melhorada, principalmente do ponto de vista dos aspectos de estabilidade e reprodutibilidade [189].

Baseado neste contexto, materiais que permitam a imobilização de mediadores e moléculas biológicas são de grande potencial para o

desenvolvimento de sensores e biossensores [190]. Vários trabalhos utilizando zeólitas, argilas, fosfato de zircônio e sílica modificada como suportes para imobilização foram publicados [191-193].

Atualmente, reagentes incorporados sobre a superfície de sílica gel e sílica sol-gel têm se tornado um procedimento comum para obtenção de suportes para catalisadores [61, 194], materiais para empacotar colunas em cromatografia líquida de alta eficiência [195], adsorventes de íons metálicos em solução [196] e matrizes para imobilização de várias espécies, tais como enzimas [197] e mediadores de elétron [197]. Esta performance faz da sílica uma excelente matriz a ser utilizada em eletrodos modificados. A sílica apresenta algumas características importantes, tais como: rigidez, porosidade e estabilidade química, tornando-as matrizes promissoras para estes propósitos [120].

O uso de sílica quimicamente modificada em uma interface eletrodo-solução tem atraído muita atenção, por explorar a versatilidade da sílica gel na imobilização de diferentes componentes, tais como espécies eletroativas. Sílica gel vem sendo modificada com óxidos metálicos, especialmente Ti(IV), Zr(IV), V (V), e Nb(V), resultando em materiais para imobilizações de mediador de elétron [61]. As sílicas modificadas obtidas com óxidos metálicos ou fosfato são conhecidas como bons trocadores iônicos por causa da forte acidez da superfície do material.

Matrizes fosfatadas apresentam propriedades de troca iônica bem conhecidas, devido aos seus grupos fosfato [198]. Estes materiais são bons condutores iônicos e materiais ácidos [199]. Matrizes fosfatadas têm sido utilizadas em diversos campos da pesquisa, como catalisadores, em cerâmicas, como trocadores iônicos e como materiais de eletrodo [200]. Em um trabalho recente [201], a imobilização de flavinas, fenazinas, fenoxazinas e fenotiazinas foi atribuída a uma reação de troca iônica entre o fosfato de zircônio e estes corantes orgânicos.

A modificação de materiais sol-gel também vem recebendo grande atenção para desenvolver novos sensores e biossensores, devido às características e versatilidade do processo sol-gel [175]. O processo de imobilização sol-gel é

simples, versátil e oferece boa retenção das propriedades bioquímicas e de reconhecimento, aumentando a estabilidade, e podendo também melhorar as propriedades eletroquímicas das espécies imobilizadas.

Considerando estes aspectos, esta etapa do trabalho descreve o uso de quatro matrizes para a imobilização de riboflavina (RF), onde, o efeito da acidez, área superficial e porosidade, dos materiais empregados, nas respostas eletroquímicas, assim como a cinética da transferência de elétrons entre a RF e o eletrodo, foram avaliados.

### IV.3 PARÂMETROS REFERENTES A PREPARAÇÃO DO ELETRODO DE TRABALHO

É importante citar que a preparação dos eletrodos de trabalho, a fim de estudar as propriedades eletroquímicas dos diferentes materiais empregados nesta Tese, foram otimizados e, os dados obtidos para o sistema EPC/SNRF foram empregados para os demais sistemas. Neste item serão mostradas as etapas da otimização, bem como um planejamento fatorial  $2^3$  realizado com este intuito.

O estudo da variação da porcentagem de SNRF presente na pasta é ilustrado nas Figuras 12 e 13, onde na primeira observa-se um aumento na intensidade de corrente de pico anódica, sendo o resultado esperado, já que a riboflavina é a espécie eletroativa. No entanto, inicialmente os eletrodos foram preparados com 60 % (m/m) de SNRF, uma vez que acima deste valor a pasta não apresentava boa consistência e a superfície do eletrodo mudava com o tempo devido à perda de material para a solução de trabalho.

Além disto, verifica-se na Figura 13 (estudo da porcentagem de SNRF na pasta em função do  $\Delta E_p$ ), que os eletrodos preparados com porcentagem de SNRF acima de 60 %, apresentavam uma grande separação de picos. A principal desvantagem na preparação de eletrodos com altas porcentagens de SNRF é que a transferência de elétrons é dificultada, devido ao aumento da resistência elétrica da pasta.

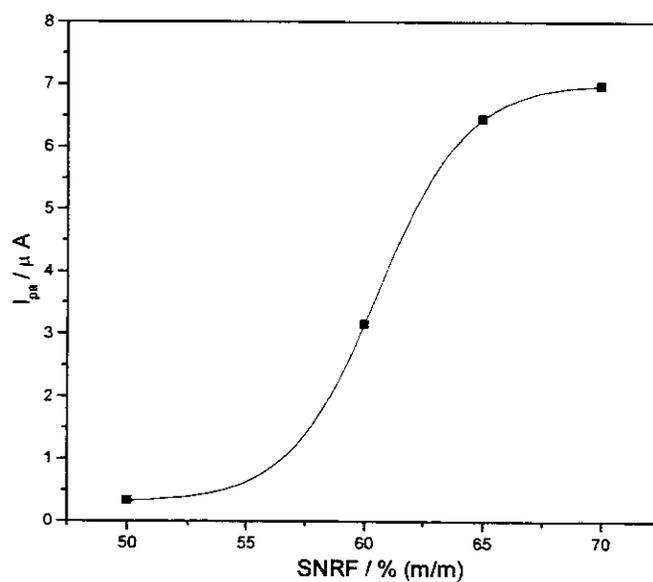


Figura 12. Variação da  $I_{pa} / \mu A$  em função da porcentagem de SNRF (m/m) na pasta de carbono. Solução de  $NaNO_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$

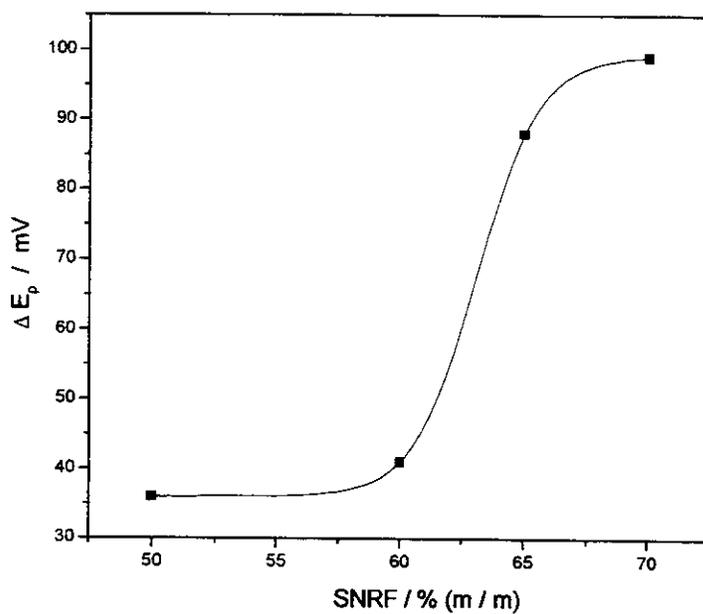


Figura 13. Variação do  $\Delta E_p / mV$  em função da porcentagem de SNRF (m/m) na pasta de carbono. Solução de  $NaNO_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$

#### IV.3.1 Otimização da Preparação do Eletrodo de Pasta de Carbono por Planejamento Fatorial 2<sup>3</sup>

Nesta etapa do projeto realizou-se o planejamento fatorial 2<sup>3</sup> a fim de otimizar a preparação do eletrodo de pasta de carbono.

Embora tenhamos analisado a resposta do sistema em função da intensidade de corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ) e  $\Delta E_p$  (Figuras 12 e 13, respectivamente), neste Planejamento Fatorial, utilizou-se como resposta, para este estudo, a intensidade de corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ), uma vez que buscava-se o desenvolvimento de um sensor para NADH (empregando RF imobilizada sobre SN). Sabe-se que para este propósito, o parâmetro analítico comumente empregado para a caracterização de um sensor é a corrente de pico anódico (corrente de oxidação) em função da concentração do analito, neste caso, o NADH, e desta forma, justifica-se tal escolha.

A Tabela 4 apresenta os coeficientes de contrastes para um fatorial 2<sup>3</sup>, enquanto que a Tabela 5 mostra os resultados do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, onde o número entre parênteses é a ordem de realização dos ensaios. Para evitar a ocorrência de distorção estatística nos resultados, isto é, para impedir que erros atípicos sejam obrigatoriamente associados a determinadas combinações de níveis, os ensaios devem ser realizados em ordem totalmente aleatória [202].

Conforme descrito na Parte Experimental desta Tese (item III.10), os fatores analíticos estudados foram: a relação entre as quantidades de grafite e sílica modificada contendo a RF imobilizada (denominado fator proporção), a forma de preparação dos eletrodos (fator mistura) e a concentração do eletrólito suporte (fator concentração).

A Figura 14 mostra que a melhor condição para a obtenção do sinal está nos níveis (+ - +), o que corresponde à proporção 40% de grafite : 60 % de SNRF, tipo de mistura 1 (grafite + SNRF/óleo mineral) e concentração de eletrólito 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Isto demonstra que a resposta aumenta quando a RF está em maior proporção na pasta, o óleo mineral deve ser adicionado por último na preparação do eletrodo de pasta de carbono e em solução de eletrólito mais concentrada.

Tabela 4. Coeficientes de contraste para um planejamento fatorial  $2^3$ 

		(-)	(+)
Fatores:	1: Proporção (%)	50/50	40/60
	2: Mistura (tipo)	1	2
	3: Concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ )	0,1	0,5

Ensaio	Fator A	Fator B	Fator C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Tabela 5. Resultados do planejamento fatorial  $2^3$ 

Ensaio	Resposta 1* ( $I_{pa} / \mu\text{A}$ )	Resposta 2* ( $I_{pa} / \mu\text{A}$ )	Média ( $I_{pa} / \mu\text{A}$ )	Estimativa do desvio padrão ( $I_{pa} / \mu\text{A}$ )
1	0 (4)	0 (9)	0	0
2	1,72 (5)	2,10 (13)	1,91	0,27
3	0,64 (12)	0,66 (1)	0,65	0,01
4	1,15 (3)	1,17 (16)	1,16	0,01
5	0 (10)	0 (2)	0	0
6	2,04 (6)	2,41 (11)	2,23	0,26
7	0,76 (7)	0,66 (15)	0,71	0,07
8	1,63 (8)	1,44 (14)	1,54	0,13

\* Os experimentos foram realizados em duplicata

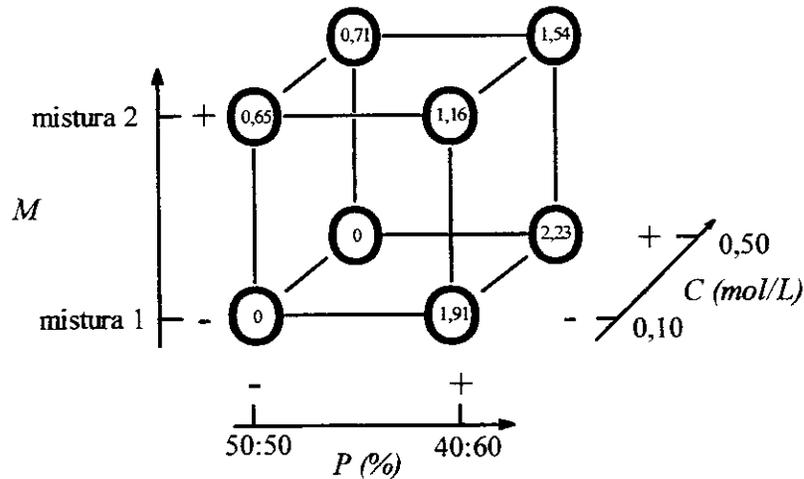


Figura 14. Diagrama para interpretação dos efeitos proporção, mistura e concentração do eletrólito no planejamento  $2^3$ . Os valores apresentados neste diagrama representam a média das resposta de  $I_{pa}$  para cada ensaio

A Tabela 6, contém todos os sinais necessários para o cálculo dos efeitos. O divisor é 8 para a média, uma vez que esta coluna possui apenas sinais positivos, e 4 para cada um dos efeitos. Empregando os sinais apropriados como coeficientes das respostas médias observadas e em seguida aplicando os divisores, calculou-se os sete efeitos e a média global. Em todos os cálculos foram utilizadas todas as respostas.

Todas as colunas da Tabela 6, exceto a primeira, têm quatro sinais positivos e quatro negativos. Qualquer efeito, portanto, pode ser interpretado como a diferença entre duas médias, cada uma das quais contendo metade das observações. Chamando de  $X$  a matriz  $8 \times 8$  com os sinais algébricos da tabela de coeficientes de contraste e com elementos +1 e -1, os efeitos serão dados, a menos dos divisores, pelo produto  $X^t y$ , onde  $X^t$  é a matriz transposta de  $X$  e  $y$  é o vetor coluna contendo as respostas médias dos ensaios.

Tabela 6. Coeficientes de contraste para um fatorial  $2^3$ . A última coluna contém os valores das médias das respostas ( $I_{pa} / \mu A$ ) obtidas nos ensaios

Média Global	1	2	3	12	13	23	123	$\bar{Y}$
+	-	-	-	+	+	+	-	0
+	+	-	-	-	-	+	+	1,91
+	-	+	-	-	+	-	+	0,65
+	+	+	-	+	-	-	-	1,16
+	-	-	+	+	-	-	+	0
+	+	-	+	-	+	-	-	2,23
+	-	+	+	-	-	+	-	0,71
+	+	+	+	+	+	+	+	1,54

Temos então:

$$X'y = \begin{bmatrix} +8,19 \\ +5,47 \\ -0,09 \\ +0,75 \\ -2,81 \\ +0,63 \\ +0,11 \\ -0,01 \end{bmatrix}$$

Dividindo o primeiro elemento por 8 e os demais por 4, obtém-se o vetor dos efeitos:

$$\begin{bmatrix} \bar{y} \\ 1 \\ 2 \\ 3 \\ 12 \\ 13 \\ 23 \\ 123 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} +1,02 \\ +1,37 \\ -0,02 \\ +0,19 \\ -0,70 \\ +0,16 \\ +0,03 \\ +0,0 \end{bmatrix}$$

Os efeitos aparecem no vetor em ordem idêntica à das colunas da matriz X. Foram calculados os erros padrão dos efeitos através da equação:

$$V(y) = s^2 = d_i^2/2N$$

onde N é o número de ensaio, o qual, neste caso é igual a 8, e  $d_i$  é a diferença entre as duas observações correspondentes ao  $i$ -ésimo ensaio.

Para variáveis independentemente distribuídas, como ocorre neste caso, a variância da combinação linear,  $\sigma_y^2$ , é dada por:

$$\sigma_y^2 = \sum a_i^2 \sigma_i^2$$

Cada um dos efeitos calculados é uma combinação linear de oito valores, com coeficientes  $a_i$  iguais a  $+1/4$  ou  $-1/4$ . Se admitirmos que, graças à autenticidade das repetições e à aleatoriedade da ordem de realização dos ensaios, esses valores são independentes e também de mesma variância  $\sigma_y^2$ , podemos aplicar a equação acima, com  $a_i^2 = 1/16$ , para calcular a variância de um efeito(V):

$$V(\text{efeito}) = (1/16 + \dots + 1/16) \sigma_y^2 = 1/2 \sigma_y^2$$

Lembrando que cada  $\bar{Y}_i$  é a média de duas observações independentes, pode-se considerar que  $\sigma_y^2 = \sigma^2/2$ , onde  $\sigma^2$  é a variância de uma observação

individual. Usando-se o valor da estimativa da variância  $s^2 = 0,02050$ , no lugar de  $\sigma^2$ , obtemos uma estimativa, com oito graus de liberdade, do erro padrão de um efeito:

$$V(\text{efeito}) = (8/16) \times (0,02050/2) = 0,0051.$$

O erro padrão de um efeito é a raiz quadrada desse valor, que é aproximadamente 0,072. O erro padrão da média será a metade disso, 0,036, porque os coeficientes da combinação linear nesse caso são todos iguais a 1/8, ao invés de  $\pm 1/4$ . A Tabela 7 mostra os valores calculados para todos os efeitos e seus erros padrão.

Tabela 7. Efeitos calculados para o planejamento fatorial  $2^3$  e seus erros padrão

Média:		1,024±0,036
Efeitos Principais:		
	1 (Proporção)	1,367±0,072
	2 (Mistura)	-0,022±0,072
	3 (Concentração)	0,187±0,072
Interação de 2 fatores		
	12	-0,702±0,072
	13	0,157±0,072
	23	0,027±0,072
Interação de 3 fatores		
	123	-0,002±0,072

A resposta deste sistema ( $I_{pa}$ ) pode ser representada através de um modelo, que em quimiometria é chamado de modelo estatístico [202]. Através deste modelo calculou-se as estimativas dos coeficientes (b) através da seguinte equação:

$$\mathbf{b} = (1/8)\mathbf{X}'\mathbf{y} = \begin{bmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_{12} \\ b_{13} \\ b_{23} \\ b_{123} \end{bmatrix} \cong \begin{bmatrix} +1,02 \\ +0,68 \\ -0,01 \\ +0,09 \\ -0,35 \\ +0,08 \\ +0,01 \\ +0,00 \end{bmatrix}$$

Para sabermos qual destes valores são significativamente diferentes de zero, empregou-se a distribuição de Student [202] para testar a significância dos valores estimados. O intervalo de confiança é dado por:

$$\mathbf{b} \pm t_n (\text{erro padrão de } \mathbf{b})$$

No intervalo de confiança de 95% o valor de  $t_{8, (95\%)}$  (Student test) é igual a 2,306, sendo este um valor tabelado [202].

O erro padrão da estimativa é dado por:

$$V(\mathbf{b}) = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}s^2$$

Através das equações anteriores foram efetuados os cálculos, de onde concluiu-se que apenas o fator 1 (proporção) e a interação 12 (proporção/mistura) são estatisticamente significativos com intervalos de confiança de 95 %.

A equação que melhor descreve este modelo é a seguinte:

$$Y = 1,02 (\pm 0,05) + 0,68 (\pm 0,05) X_1 - 0,35 (\pm 0,05) X_1 X_2$$

onde, Y é a resposta,  $X_1$  e  $X_2$  são as variáveis codificadas correspondentes à proporção e mistura, enquanto que os valores numéricos indicam respectivamente a média das respostas, a estimativa do efeito proporção e a estimativa da interação proporção/mistura. Os valores entre parênteses são os erros padrão das

estimativas.

Os voltamogramas cíclicos obtidos durante esta etapa de otimização foram caracterizados eletroquimicamente através do estudo de  $\Delta E_p$  e a relação  $I_{pa}/I_{pc}$ , de onde se confirmou a discussão feita anteriormente, ou seja, o eletrodo preparado nas condições ótimas, apresentou  $\Delta E_p = 55$  mV e  $I_{pa}/I_{pc} = 0,98$ , enquanto um outro eletrodo preparado em condição experimental diferente, estes valores foram:  $\Delta E_p = 60$  mV e  $I_{pa}/I_{pc} = 6,33$  (reversibilidade muito baixa). Estes voltamogramas estão ilustrados na Figura 15.

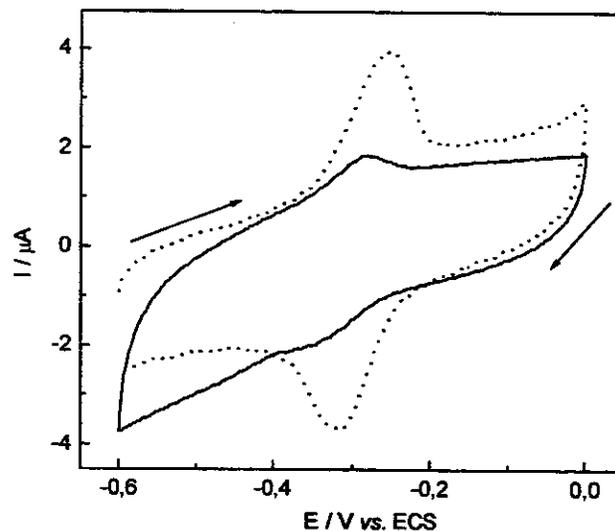


Figura 15. Voltamogramas cíclicos correspondentes aos ensaios 6, onde as condições foram: proporção 60% de SNRF e 40 % de grafite, mistura tipo 1 e concentração do eletrólito  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (·····) e 7, onde as condições foram: proporção 50% de SNRF e 50 % de grafite, mistura tipo 2 e concentração do eletrólito  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (—) para o planejamento fatorial  $2^3$

Estes dados são importantes e demonstram que, embora o parâmetro analítico utilizado como resposta durante esta etapa de otimização da preparação do eletrodo de trabalho tenha sido a  $I_{pa}$ , foi possível, através destes estudos,

otimizar também o parâmetro analítico  $\Delta E_p$ , o qual é evidente na discussão realizada sobre a Figura 15.

A partir desta verificação, os eletrodos foram preparados nas condições experimentais do ensaio 6, a fim de se estudar as propriedades eletroquímicas da RF imobilizada sobre as diferentes matrizes.

#### IV.4 PROPRIEDADES ELETROQUÍMICAS DOS DIFERENTES MATERIAIS

Investigações sobre as propriedades eletroquímicas da RF, adsorvida nas diferentes matrizes, foram realizadas para todos os sistemas. Por exemplo, a curva A na Figura 16 mostra o voltamograma cíclico (VC) de um eletrodo de pasta de carbono (EPC) contendo SN (EPC/SN), no qual nenhum pico redox pode ser observado. Por outro lado, a curva B da Figura 16 apresenta um par redox da RF com um potencial formal ( $E^0$ ) de  $-283$  mV vs. ECS. (sendo,  $E^0 = (E_{pa} + E_{pc})/2$ , onde  $E_{pa}$  é o potencial de pico anódico e  $E_{pc}$  é o potencial de pico catódico [203]).

Comparando este valor de potencial formal com aqueles obtidos para riboflavina solubilizada em solução aquosa ( $-470$  mV vs. ECS [47]), um deslocamento de  $187$  mV para valores mais positivos é observado. Este comportamento sugere uma interação entre a RF e a matriz estabilizando a forma reduzida da RF. Uma possível explicação para este comportamento é a alta acidez do material, ou uma interação do átomo de nitrogênio do mediador com SN [23]. Comportamento similar vem sendo verificado para fenoxazina, fenotiazina e fenazina adsorvidas em fosfato de zircônio [159] e fosfato de titânio [59].

Estes estudos foram realizados para os outros sistemas desenvolvidos: EPC/SNRF<sub>sol-gel</sub> (Figura 16 C); EPC/SNPRF (Figura 17 B); EPC/SNPRF<sub>sol-gel</sub> (Figura 17 C), e os diferentes voltamogramas cíclicos mostraram claramente a presença de pares redox da RF imobilizada. Os valores de  $E^0$  e  $\Delta E_p$  obtidos para estes sistemas serão apresentados adiante.

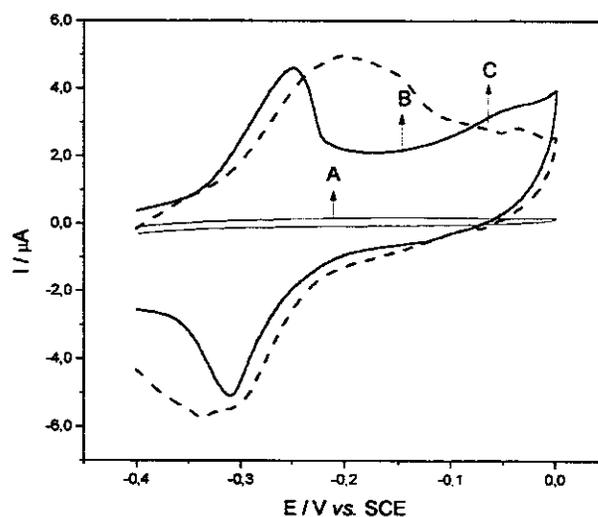


Figura 16. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 para eletrodo de pasta de carbono modificado com SN (A); SNRF (B) e  $\text{SNRF}_{\text{sol-gel}}$  (C) a velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$

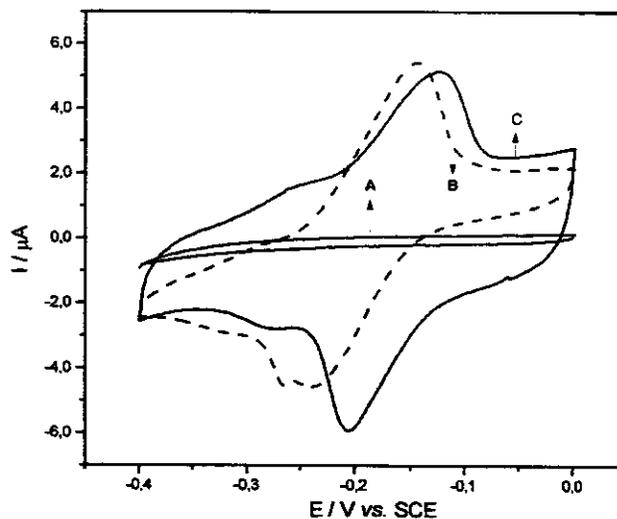


Figura 17. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 para eletrodo de pasta de carbono modificado com SN (A); SNPRF (B) e  $\text{SNPRF}_{\text{sol-gel}}$  (C) a velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$

Continuando a caracterização eletroquímica da RF imobilizada nas diferentes matrizes empregadas (SN, SNP, SN<sub>sol-gel</sub> e SNP<sub>sol-gel</sub>), através de experimentos de estabilidade da RF imobilizada sobre estas matrizes, verificou-se que, ciclando os diferentes eletrodos por muitas vezes com uma velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup>, o nível de corrente permaneceu praticamente constante (Tabela 8), indicando que o mediador não lixivia da superfície do eletrodo para a solução, mesmo depois de várias horas de uso.

Este comportamento sugere uma forte interação entre a RF e as matrizes. Esta característica é muito atrativa para desenvolver novos sensores e biossensores com melhor estabilidade [204].

Tabela 8. Densidade de corrente de pico ( $\mu\text{A cm}^{-2}$ ) para os diferentes sensores após sucessivos voltamogramas cíclicos obtidos em solução de NaNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0, a velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup> no intervalo de varredura de potencial de -0,5 a -0,1 V

Ciclos	20	40	50	80	100	120
EPC/SNRF	11,6±0,1	11,6±0,1	11,7±0,1	11,6±0,1	11,7±0,1	11,7±0,1
EPC/SNPRF	12,8±0,1	12,8±0,1	12,8±0,1	12,9±0,1	12,9±0,1	12,9±0,1
EPC/SNRF <sub>sol-gel</sub>	13,6±0,3	13,7±0,3	13,6±0,3	13,7±0,3	13,8±0,3	13,8±0,3
EPC/SNPRF <sub>sol-gel</sub>	16,2±0,3	16,1±0,3	16,3±0,3	16,3±0,3	16,2±0,3	16,3±0,3

A transferência de elétrons da RF sobre o eletrodo é um aspecto importante a ser considerado em todos os sistemas desenvolvidos, como pode ser observado pela separação de pico, mesmo em baixa velocidade de varredura (Tabela 9). Verificou-se que a transferência não é totalmente reversível, apresentando uma pequena resistência dos materiais empregados. Portanto, a resistência observada através da separação de pico pode ser atribuída a queda ôhmica da pasta de carbono. Este comportamento pode ser atribuído à dificuldade das espécies do eletrólito suporte difundirem através da superfície do eletrodo para manter a eletroneutralidade do sistema, desde que a RF está fortemente adsorvida.

Pode ser observado (Tabela 9) que os sistemas EPC/SNRF<sub>sol-gel</sub> e EPC/SNPRF<sub>sol-gel</sub> apresentaram valores maiores de  $\Delta E_p$  que os sistemas

EPC/SNRF e EPC/SNPRF, devido provavelmente à dificuldade no processo de difusão apresentado pelas espécies do eletrólito suporte através dos poros menores do material sol-gel (2,4 nm) em relação à sílica gel (6,0 nm).

O efeito do eletrólito suporte sobre a RF adsorvida nas diferentes matrizes foi investigado e comportamentos eletroquímicos distintos da RF imobilizada nos diferentes materiais foram observados (Tabela 9). A separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e potencial formal ( $E^0$ ) para todos os eletrólitos investigados foram quase os mesmos, analisando cada sistema isoladamente. Provavelmente, os eletrólitos de suporte não interagem de uma forma forte com as matrizes e não afetam a RF adsorvida sobre as matrizes. Para os diferentes sistemas existe um pequeno efeito observado para íons  $Ca^{2+}$ , os quais conduzem a um deslocamento do potencial médio para valores menos negativos, sugerindo uma interação entre  $Ca^{2+}$  e riboflavina, estabilizando a forma reduzida da espécie eletroativa. Provavelmente isto é provocado pela retirada de densidade eletrônica da RF pelo íon cálcio carregado positivamente. Um outro aspecto importante foi observado no caso do sistema EPC/SNPRF<sub>sol-gel</sub>, onde um pequeno efeito foi verificado para os íons  $SO_4^{2-}$ , deslocando o  $E^0$  para valores mais negativos, indicando uma interação entre  $SO_4^{2-}$  e riboflavina, estabilizando sua forma oxidada. Provavelmente isto deve ser provocado pela doação de densidade eletrônica do íon sulfato carregado negativamente para a RF.

Um outro ponto interessante é a independência do potencial formal da RF adsorvida sobre as diferentes matrizes com o pH da solução entre 3,0 e 8,0 (Tabela 10). Este comportamento pode ser atribuído ao efeito de proteção das matrizes, minimizando o efeito do próton sobre a RF adsorvida. Outra proposta para este comportamento é que este efeito de proteção deva ocorrer através de uma interação bastante forte e estável entre os sítios ácidos (ácido de Lewis) das diferentes matrizes empregadas e o anel aloxazina da riboflavina (base de Lewis), formando um complexo, o qual não pode ser dissociado pelo pH do meio. Este comportamento pode ser atrativo para aspectos práticos e estudos mecanísticos da reação entre NADH e RF adsorvida sobre estas matrizes. A eliminação da influência do  $H^+$  durante o processo redox da RF adsorvida nestas diferentes

matrizes é muito importante para verificar o efeito do potencial termodinâmico sobre a reação entre RF e outras espécies.

Tabela 9. Separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e potencial formal ( $E^0$ ) obtidos para os diferentes sensores em diferentes eletrólitos de suporte na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, para uma velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$

Eletrólitos de Suporte	SNRF		SNPRF		SNRF <sub>(sol-gel)</sub>		SNPRF <sub>(sol-gel)</sub>	
	$\Delta E_p$	$E^0$	$\Delta E_p$	$E^0$	$\Delta E_p$	$E^0$	$\Delta E_p$	$E^0$
KNO <sub>3</sub>	49±2	-282±5	36±2	-253±2	83±3	-250±5	80±3	-170±3
LiNO <sub>3</sub>	48±2	-281±5	32±2	-254±2	85±3	-250±5	80±3	-170±3
NaNO <sub>3</sub>	41±2	-283±5	32±2	-250±2	93±3	-260±5	70±3	-165±3
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	46±2	-270±5	26±2	-236±2	87±3	-240±5	60±3	-150±3
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	47±2	-282±5	34±2	-248±2	90±3	-260±5	60±3	-170±3
NaCl	55±2	-286±5	46±2	-253±2	133±3	-260±5	80±3	-175±3
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	49±2	-282±5	39±2	-256±2	154±3	-260±5	60±3	-200±3
NaClO <sub>4</sub>	50±2	-287±5	42±2	-261±2	145±3	-255±5	70±3	-175±3

Tabela 10. Potencial formal ( $E^0$ ) e separação de pico ( $\Delta E_p$ ) em função do pH da solução de NaNO<sub>3</sub>  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , obtidos para os diferentes sensores a velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$

pH	SNRF		SNPRF		SNRF <sub>(sol-gel)</sub>		SNPRF <sub>(sol-gel)</sub>	
	$\Delta E_p$	$E^0$	$\Delta E_p$	$E^0$	$\Delta E_p$	$E^0$	$\Delta E_p$	$E^0$
3	39±2	-285±5	31±2	-255±4	85±3	-249±4	60±3	-160±3
4	37±2	-286±5	32±2	-258±4	90±3	-250±4	60±3	-165±3
5	36±2	-293±5	29±2	-262±4	86±3	-253±4	70±3	-165±3
6	38±2	-292±5	26±2	-260±4	97±3	-262±4	70±3	-165±3
7	41±2	-283±5	32±2	-250±4	93±3	-261±4	70±3	-165±3
8	45±2	-291±5	35±2	-254±4	98±3	-262±4	60±3	-170±3

A Tabela 11 mostra a influência de diferentes sistemas tampões, quais sejam: ácido (N-[2-hidroximetil] piperazine-N'-[2-etanossulfônico]) ou HEPES

( $C_8H_{17}N_2O_4SNa$ ); ácido piperazine-N,N'-bis[2-etanossulfônico] ou PIPES ( $C_8H_{16}N_2O_6S_2Na_2$ ); Fosfato ( $Na_2HPO_4$  e  $NaH_2PO_4$ ) e (Tris[hidroximetil] amino-metano) ou TRIS [( $OCH_3$ ) $_3$ CNH $_2$ ], sobre o processo redox da riboflavina adsorvida. Estes dados mostraram que os processos apresentam as melhores respostas em solução tampão fosfato. Este comportamento pode ser relacionado à interação das moléculas do tampão fosfato com as diferentes matrizes ou mesmo com a riboflavina, tornando a transferência de elétrons mais fácil.

Em todos os casos, os valores mais negativos de  $E^o$  observados em solução tampão TRIS foram atribuídos a uma interação entre os constituintes do tampão TRIS ( $(OCH_3)_3CNH_2$ ) e a RF, estabilizando a forma oxidada da espécie eletroativa. Os maiores valores de  $\Delta E_p$  observados podem ser atribuídos à adsorção destas moléculas (grupo  $NH_2$  com o óxido de nióbio) sobre a superfície do eletrodo, tornando a transferência mais difícil.

Tabela 11. Efeito de Tampão sobre o potencial formal ( $E^o$ ) e a separação de pico ( $\Delta E_p$ ) em para os diferentes sensores em solução tampão 0,1 mol L $^{-1}$ , pH 7,0 obtidos para os diferentes sensores a velocidade de varredura de 10 mV s $^{-1}$

Solução Tampão	SNRF		SNPRF		SNRF <sub>(sol-gel)</sub>		SNPRF <sub>(sol-gel)</sub>	
	$\Delta E_p$	$E^o$	$\Delta E_p$	$E^o$	$\Delta E_p$	$E^o$	$\Delta E_p$	$E^o$
Fosfato	32±1	-252±4	36±1	-239±3	49±2	-254±4	30±1	-160±3
Hepes	45±2	-291±5	42±2	-263±4	67±2	-258±4	40±2	-170±3
Pipes	50±2	-286±5	41±2	-259±4	88±2	-270±4	50±2	-190±3
Tris	127±4	-391±5	80±3	-317±5	130±3	-289±5	90±3	-210±3

A influência da velocidade de varredura nos diferentes sistemas desenvolvidos também foi estudada. Na Figura 18, embora os picos anódico e catódico não sejam totalmente imagem uma da outra, em contraste ao caso teórico para espécies imobilizadas [205], uma boa reversibilidade no processo redox do sistema EPC/SNRF pode ser observado. Comportamento similar foi verificado para os demais sistemas estudados.

Outro aspecto que deve ser enfatizado é a correlação entre a intensidade de corrente de pico e a velocidade de varredura. Nos casos dos sistemas EPC/SNRF e EPC/SNPRF (Figura 19) uma correlação linear entre  $I_{pa}$  vs.  $v$  foi observada sugerindo que a RF está adsorvida sobre a superfície do eletrodo.

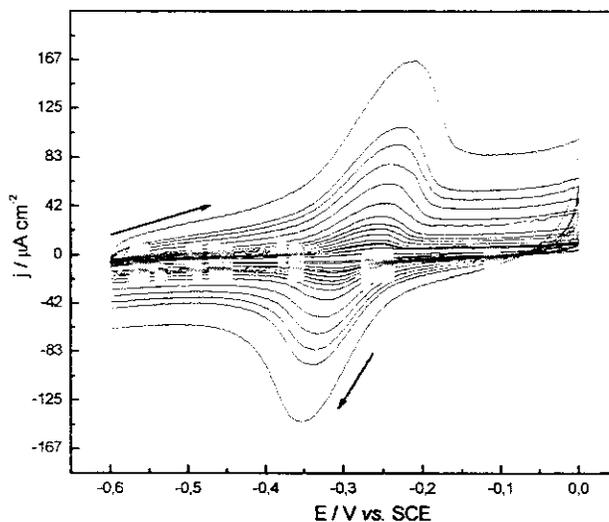


Figura 18. Voltamogramas cíclicos obtidos para um eletrodo de pasta de carbono modificado com SNRF em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0, em diferentes velocidades de varredura ( $5\text{-}500 \text{ mV s}^{-1}$ )

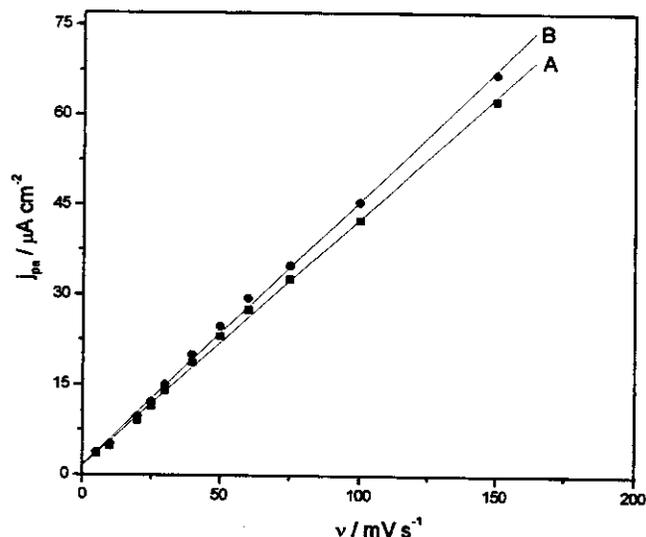


Figura 19. Dependência da densidade de corrente de pico anódico ( $j_{pa}$ ) como uma função da velocidade de varredura para EPC/SNRF (A) e EPC/SNRF (B) em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0

Estes estudos também foram realizados para os sistemas  $\text{SNRF}_{\text{sol-gel}}$  e  $\text{SNPRF}_{\text{sol-gel}}$  e uma dependência linear da corrente de pico pela raiz quadrada da velocidade de varredura,  $v^{1/2}$ , pode ser observada (Figura 20). Este comportamento é similar a um processo redox controlado por difusão. Certamente as características dos materiais sol-gel (pequeno tamanho de poro) estão afetando o processo de difusão, uma vez que o tamanho do poro dos materiais sol-gel é de 2-4 nm menores que os poros da sílica gel (SN ou SNP), e os íons do eletrólito suporte não podem difundir facilmente para manter a eletroneutralidade da superfície do eletrodo.

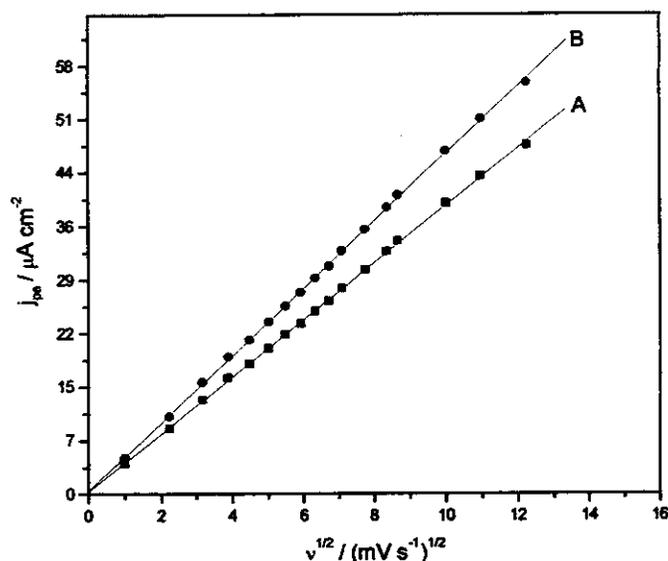


Figura 20 Dependência da densidade de corrente de pico anódico ( $j_{pa}$ ) como uma função da raiz quadrada da velocidade de varredura para EPC/SNRF<sub>sol-gel</sub> (A) e EPC/SNPRF<sub>sol-gel</sub> (B) em solução de NaNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0

Além disso, nenhum decréscimo na corrente de pico depois da repetição de muitos ciclos (Tabela 8) foi observado, indicando que a RF está adsorvida sobre as matrizes SN<sub>sol-gel</sub> e SNP<sub>sol-gel</sub>, embora a correlação linear entre a corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 20) indique um processo redox controlado por difusão. Desta forma, o processo redox para a RF adsorvida em matrizes sol-gel poderia ser controlado pela difusão dos contra-íons para manter a eletroneutralidade sobre a superfície do eletrodo. Outras possibilidades para este comportamento são devidos à resistência do material ou um mecanismo de transferência de elétrons ocorrendo por um mecanismo de elétron “hopping” [201] ou ainda por fluxo de prótons através dos poros.

Complementando os estudos referentes ao parâmetro  $\Delta E_p$ , a Figura 21, ilustra o efeito da separação dos potenciais de pico em função da velocidade de varredura, onde é possível observar que ocorre um aumento de  $\Delta E_p$  com o aumento da velocidade de varredura, o qual é mais evidente à velocidades

maiores. Este comportamento indica que a cinética de transferência de elétrons está sendo afetada pela resistência do próprio material de eletrodo, uma vez que, o óleo mineral e o próprio material modificado não são bons materiais condutores.

Sabe-se que  $\Delta E_p$  indica a resistência do sistema à transferência de elétrons e na Figura 21, pode ser observado que os sistemas desenvolvidos com os materiais sol-gel apresentaram valores maiores de  $\Delta E_p$  em função da velocidade de varredura, do que os sistemas gel, devido ao efeito de difusão, o qual é uma etapa limitante do processo de transferência de elétrons para os sistemas sol-gel. Outro aspecto importante observado nesta Figura é o efeito do fosfato, o qual torna a transferência de elétrons mais fácil.

O baixo valor de  $\Delta E_p$  mesmo a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (entre 80 e 100 mV para os diferentes sistemas estudados), em contraste com aqueles observados para azul de metileno e azul do nilo (250 e 115 mV a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , respectivamente) adsorvido em fosfato de zircônio [159], sugere uma melhor transferência de elétrons no presente caso.

A Figura 22 ilustra a dependência dos potenciais de pico (anódico e catódico) em função da velocidade de varredura, para o sistema EPC/SNRF, onde é possível observar inclinações das curvas bastante parecidas para os processos anódicos e catódicos. Este comportamento indica que os processos de oxidação e redução deste sistema ocorrem com a mesma facilidade, ou seja, não há um processo preferencial. A difusão de cátions e ânions ocorre de tal forma, que não

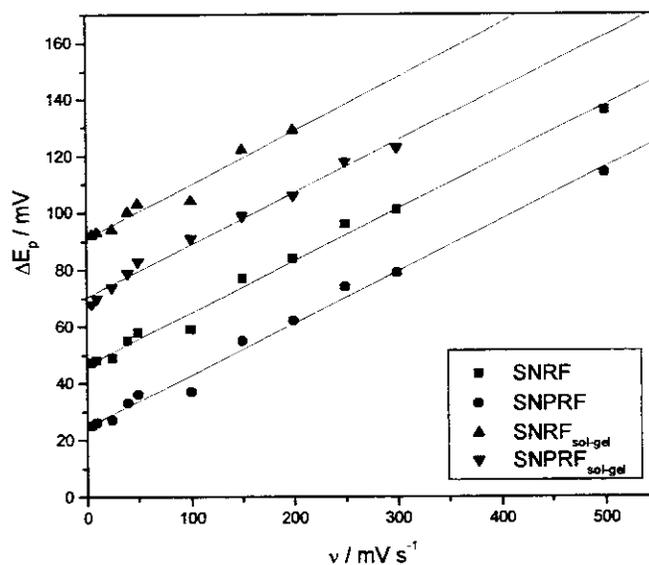


Figura 21. Dependência da variação de potencial de pico ( $\Delta E_p$ ) como função da velocidade de varredura para os diferentes sistemas desenvolvidos

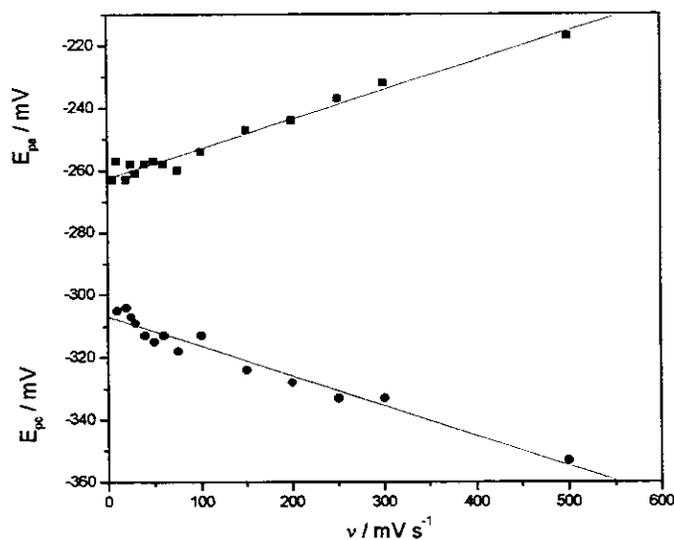


Figura 22. Dependência dos potenciais de pico anódico e catódico em função da velocidade de varredura obtida para o eletrodo de paste de carbono modificado com SNRF em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0

se observa influência de maneira diferenciada no comportamento eletroquímico da RF imobilizada na matriz SN.

Além disso, pode-se concluir que não ocorre interação da espécie eletroativa com as espécies do eletrólito de suporte, no sentido de dificultar a transferência de elétrons. Os mesmos efeitos foram verificados para os demais sistemas estudados.

#### IV.4.1 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS PARA A RF ADSORVIDA NAS DIFERENTES MATRIZES

De modo a estudar a cinética de transferência de elétrons entre a RF e o eletrodo, foram estimados parâmetros tais como:  $\alpha$  (coeficiente de transferência de elétrons) e  $\kappa$  (constante de velocidade de transferência de elétrons) para a RF adsorvida sobre as diferentes matrizes. A corrente de pico para espécies eletroativas adsorvidas é idealmente dada por [206, 207]:

$$I_p = n^2 F^2 A v \Gamma / 4(RT)$$

onde  $I_p$  é a intensidade de corrente de pico,  $F$  a constante de Faraday,  $A$  a área do eletrodo,  $v$  a velocidade de varredura,  $\Gamma$  a quantidade de mediador adsorvido sobre a superfície do material ( $\text{mol cm}^{-2}$ ),  $R$  a constante dos gases,  $T$  a temperatura e  $n$  o número de elétrons participando na reação. O valor de  $n$  pode ser determinado através da equação descrita acima, se os outros parâmetros são conhecidos. Entretanto a teoria demonstra que a largura da meia altura do pico,  $\delta_{0,5}$ , deve ser igual a  $90,6/n$  para o caso ideal [206, 208]. O sistema SNRF apresentou a baixas velocidades de varredura ( $5 \text{ mV s}^{-1}$ ) um  $\delta_{0,5}$  em torno de 48 mV. Para as diferentes matrizes estudadas foi encontrado valores de  $\delta_{0,5}$  como sendo  $48 \pm 4$  mV. Isto possivelmente indica que 2 elétrons participam da reação redox, especialmente porque é conhecido que 2 elétrons participam do processo redox de flavinas em ambientes aquosos, tanto quando dissolvida [209-210] como quando adsorvida sobre grafite [54]. Aplicando esta relação para as diferentes matrizes foram encontrados valores de  $n$  como sendo  $1,9 \pm 0,2$ .

Os experimentos para verificar a influência da velocidade de varredura sobre os diferentes sistemas mostraram que a curva  $I_p$  vs.  $v$  foi linear para os sistemas EPC/SNRF e EPC/SNPRF em um intervalo de 5-200  $\text{mV s}^{-1}$  (Figura 19), o qual sugere que as espécies eletroativas estão adsorvidas sobre a pasta, sendo possível aplicar o método de Laviron [211]. No entanto, torna-se necessário neste ponto do trabalho, mencionar que este método é idealmente aplicado quando a isoterma de Langmuir é obedecida, ou seja, a espécie eletroativa deve se encontrar adsorvida como uma monocamada. Desta forma, foi utilizada neste trabalho uma estimativa desta condição, uma vez que o sistema obtido, constituído de grafite, RF imobilizada sobre as diferentes matrizes e óleo mineral, possui uma estrutura bastante complexa.

É possível também obter uma curva linear de  $I_p$  vs.  $v^{1/2}$  embora as espécies eletroativas estejam adsorvidas sobre a matriz como observado para as matrizes sol-gel, Figura 20. Este fenômeno pode se explicado devido à transferência não ser totalmente reversível, apresentando uma pequena resistência dos sistemas sol-gel.

Este comportamento pode ser atribuído à dificuldade das espécies do eletrólito suporte de difundir através da superfície do eletrodo, devido ao pequeno tamanho dos poros destes materiais, tornando a difusão das espécies do eletrólito suporte como a etapa limitante do processo redox. Desta forma, o método de Laviron foi aproximado para os sistemas empregando matrizes de sílica sol-gel, SNRF<sub>sol-gel</sub> e SNPRF<sub>sol-gel</sub>, os quais são controlados por difusão.

De modo a observar o efeito de difusão nas propriedades cinéticas da RF imobilizada sobre as matrizes obtidas pelo processo sol-gel e comparar com os dados obtidos para os sistemas SNRF e SNPRF, os coeficientes de transferência de elétrons ( $\alpha$ ) foram determinados pelo método de Laviron [211] para as diferentes matrizes, utilizando-se as seguintes expressões:

$$|s_a| = 2,3 RT / (\alpha_a)nF \text{ para o pico anódico}$$

e

$$|s_d| = -2,3 RT / (\alpha_c)nF \text{ para o pico catódico}$$

onde  $|s_a|$  e  $|s_c|$  são os coeficientes angulares para as equações das duas retas obtidas através da relação entre potencial de pico anódico e catódico em função do  $\log$  da velocidade de varredura (Figura 23). Estas relações lineares foram ajustadas pelas seguintes equações descritas abaixo para o sistema SNRF:

$$E_{pa} = -0,401(\pm 0,004) + 0,068(\pm 0,001)\log v$$

e

$$E_{pc} = -0,202(\pm 0,004) - 0,055(\pm 0,004)\log v$$

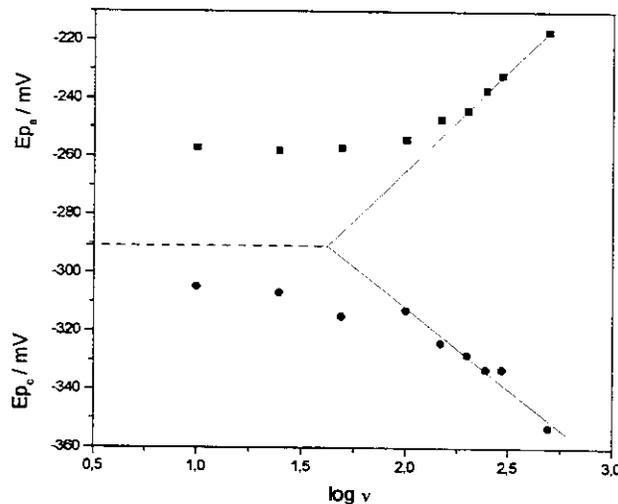


Figura 23 Efeitos da velocidade de varredura sobre o potencial de pico anódico e potencial de pico catódico estimados para o sistema EPC/SNRF. Experimentos realizados em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0

Portanto, os valores de  $\alpha_a$  foram obtidos e os correspondentes valores estão listados na Tabela 12. Estes valores indicam que os processos redox não são totalmente reversíveis para os diferentes sistemas. Os valores de  $\alpha_a$  foram obtidos também pela curva de Tafel (Figura 24), e os resultados obtidos foram similares àqueles determinados pelo método de Laviron (Tabela 12).

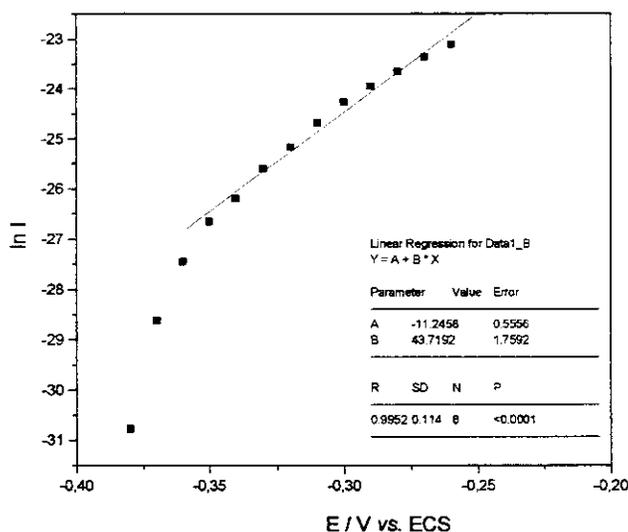


Figura 24. Curva de Tafel obtida para o sistema SNRF em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0

Além dos coeficientes de transferência de elétrons, outro parâmetro determinado foi a constante de velocidade de transferência de elétrons,  $\kappa$ , calculado [211] pela seguinte equação:

$$\kappa = \alpha_c n F v_d / RT = \alpha_a n F v_d / RT$$

Os valores estimados de  $\kappa$  para a velocidade de varredura de  $1 \text{ V s}^{-1}$  também estão apresentados na Tabela 12. Estes valores em conjunto com os valores de  $\alpha_a$ , sugerem que os diferentes sistemas são *quasi-reversíveis* e com alta velocidade de reação. Estes resultados estão mostrando que a RF imobilizada pode atuar como um excelente mediador de elétron apresentando alta estabilidade devido a uma boa adsorção obtida empregando as diferentes matrizes inorgânicas.

Dos dados da Tabela 12, pode ser observado que a RF adsorvida sobre as matrizes sol-gel apresenta menores valores de  $\kappa$ . Este comportamento é provavelmente devido ao efeito de difusão do eletrólito suporte através dos poros pequenos destes materiais. Um outro ponto importante é que os valores de  $\kappa$

obtidos para as matrizes fosfatadas são maiores, sugerindo que a acidez da matriz afeta a velocidade de transferência de elétrons, indicando que os prótons possuem um importante papel na transferência de elétrons.

Estes estudos dos parâmetros cinéticos também mostraram que a RF imobilizada possibilita uma rápida velocidade de transferência de elétrons e uma melhor reversibilidade para todos os sistemas estudados comparado a outros sistemas reportados na literatura empregando matrizes inorgânicas e flavinas [212]. Além disso, todos os sistemas estudados possuem cinética apropriada de transferência de elétrons para serem empregados nos estudos de mecanismos de reação envolvendo RF adsorvida e coenzimas tais como NADH, as quais são muito importantes no aspecto biológico. É importante mencionar que a maioria dos mediadores de elétrons quando imobilizados e empregados em estudos de eletrooxidação de NADH apresentam, assim como os diferentes sistemas apresentados nesta etapa desta Tese, comportamento *quasi-reversível*.

Os valores de  $\kappa$  mostram que a velocidade de transferência de elétrons entre RF e o eletrodo é suficientemente alta para permitir a utilização destes materiais como sensores para substâncias eletroativas tais como o NADH.

Tabela 12. Valores estimados de  $\alpha$  (coeficiente de transferência de elétrons) e  $\kappa$  (constante de velocidade de transferência de elétrons) para a RF adsorvida sobre as diferentes matrizes

Sensor	$\alpha_{Tafel}$	$\alpha_{Laviron}$	$\kappa$ (s <sup>-1</sup> )
EPC/SNRF	0,57±0,02	0,56±0,02	43,6±0,9
EPC/SNPRF	0,59±0,02	0,58±0,02	45,9±0,9
EPC/SNRF <sub>(sol-gel)</sub>	0,41±0,02	0,43±0,02	33,5±0,5
EPC/SNPRF <sub>(sol-gel)</sub>	0,45±0,02	0,45±0,02	35,2±0,5

#### IV.4.2 Estudo da Eletrooxidação de NADH através da RF imobilizada sobre diferentes matrizes

Como descrito na literatura [52], riboflavina solubilizada em solução aquosa eletrocatalisa a oxidação de NADH muito lentamente em meio neutro, devido à diferença de  $E^0$  e  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ser muito baixa para permitir que a reação seja rápida e termodinamicamente favorável. Portanto, um deslocamento do  $E^0$  da RF para valores mais positivos, por intermédio da imobilização, vem recebendo bastante atenção por parte dos pesquisadores [213] no intuito de melhorar a velocidade de reação entre a RF e o NADH. O excelente deslocamento de  $E^0$  da RF quando imobilizada sobre as diferentes matrizes (obtidas através do processo gel ou sol-gel), poderiam ser bons sistemas para estudar a eletrocatalise da oxidação de NADH.

Desta forma, avaliou-se a capacidade eletrocatalítica da RF imobilizada através dos testes em soluções de NADH preparadas em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0. Na Figura 25, a qual ilustra os voltamogramas cíclicos obtidos na ausência, Figura 25 A, e na presença, Figura 25 B, de  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , observou-se a atividade eletrocatalítica do sistema  $\text{EPC}/\text{SNPRF}_{\text{sol-gel}}$  frente ao NADH. O efeito da RF utilizada como mediador é similar aos trabalhos previamente publicados [24, 214], exceto pelo fato de que a concentração de NADH necessária para a obtenção de um nível de corrente quantificável foi muito alta neste caso. O efeito catalítico vem sendo explicado [69, 120], assumindo que o NADH difunde para a superfície do eletrodo onde é reduzido pelo mediador, o qual se encontra na forma oxidada ( $\text{M}_{\text{ox}}$ ), formando  $\text{NAD}^+$ . Finalmente, o mediador na forma reduzida, é eletroquimicamente reoxidado na superfície do eletrodo, gerando sinal analítico.

A capacidade da RF imobilizada sobre as diferentes matrizes, com a finalidade de eletrooxidar o NADH foi investigada, e através da Tabela 13, observa-se que o sistema  $\text{EPC}/\text{SNPRF}_{\text{sol-gel}}$  apresentou a melhor resposta. Isto provavelmente ocorre, devido ao grande deslocamento do potencial formal da RF imobilizada nesta matriz, para valores mais positivos, comparado aos deslocamentos ocorridos nos outros três sistemas desenvolvidos. Este

deslocamento, provavelmente aumenta a diferença de potencial entre o NADH e a RF imobilizada, aumentando a velocidade desta reação. Os dados apresentados na Tabela 13 revelam que a acidez da matriz é o efeito mais importante na eletrooxidação do NADH, uma vez que, a variação entre as matrizes menos ácidas e mais ácidas é em torno de 70 %, ao passo que o efeito de porosidade apresenta uma variação de aproximadamente 20 %.

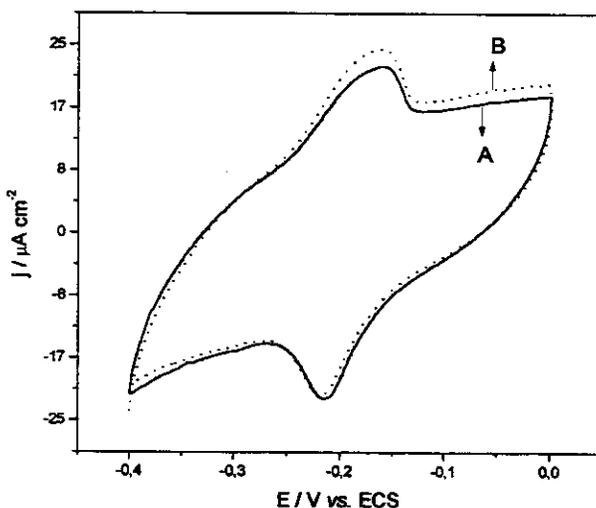


Figura 25. Voltamogramas cíclicos obtidos para o sistema EPC/SNPRF<sub>sol-gel</sub> na ausência (A) e presença de  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de NADH (B), a velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , preparada em solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0

Tabela 13. Densidade de corrente catalítica obtida para a eletrooxidação de NADH ( $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) nas diferentes matrizes empregadas na imobilização da RF. Experimentos realizados em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0

Sensor	EPC/SNRF	EPC/SNPRF	EPC/SNRF <sub>(sol-gel)</sub>	EPC/SNPRPF <sub>(sol-gel)</sub>
$\Delta j / \mu\text{A cm}^{-2}$	$0,75 \pm 0,01$	$0,92 \pm 0,01$	$1,08 \pm 0,01$	$1,83 \pm 0,02$

Entretanto, o nível de corrente catalítica obtida pelos diferentes sistemas desenvolvidos, não foi da grandeza esperada, para que outros estudos, a fim de se obter maiores informações a respeito do mecanismo de reação entre RF e NADH, fossem realizados

A explicação para este fenômeno pode ser dada basicamente por dois motivos:

- o potencial médio da RF imobilizada, embora tenha sido deslocado para valores mais positivos, ainda pode ser insuficiente para que a catálise seja efetiva, em menores concentrações de NADH, e
- um provável efeito de matriz (superfície das diferentes sílicas), pode estar dificultando a interação entre a RF e o NADH, no sentido de dificultar a difusão do NADH.

Apesar dos diferentes sistemas estudados não apresentarem atividade catalítica suficiente para o estudo do mecanismo da reação entre RF e NADH, foram desenvolvidos outros sistemas utilizando-se a matriz sol-gel fosfatada ( $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$ ), devido às propriedades apresentadas pela RF quando imobilizada nesta matriz e discutidas anteriormente. Desta forma, variou-se a concentração de RF imobilizada sobre esta matriz, diluindo-se a solução original de RF utilizada no desenvolvimento de todos os sistemas estudados e apresentados até aqui (0,010 % m/v), duas, cinco e dez vezes. É importante mencionar que, tentou-se preparar um sensor com concentração maior que 0,010 % m/v, no entanto, acima desta concentração a RF é insolúvel.

Os sensores assim preparados foram denominados de **Sensor 1**, **Sensor 2**, **Sensor 3** e **Sensor 4**, respectivamente.

Estes estudos foram embasados basicamente por duas observações, quais sejam: 1) trabalhos da literatura [52, 201], nos quais foi possível estudar o mecanismo da reação RF e NADH, empregando baixa concentração de RF imobilizada sobre fosfato de zircônio e 2) o efeito da acidez da matriz  $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$  sobre a RF em concentração mais baixa, o qual poderia deslocar o  $E^0$  da RF para valores ainda mais positivos, melhorando os aspectos termodinâmicos da reação.

Portanto, esta etapa da Tese teve por objetivo estudar a influência da concentração de RF no processo de eletrooxidação do NADH, na tentativa de melhorar a transferência de elétrons entre RF e NADH.

#### IV.5 ESTUDO DAS PROPRIEDADES ELETROQUÍMICAS DA RF IMOBILIZADA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NA MATRIZ $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$

O advento da tecnologia sol-gel e a subsequente descoberta [215-216] de que biomoléculas resistem à severas condições de preparação, tais como a utilização de catalisadores ácidos e solventes alcoólicos, deu início a uma grande atividade na área das matrizes inorgânicas derivadas da tecnologia sol-gel. A grande área superficial destas matrizes é um fator muito importante para o processo de adsorção da RF, onde, certamente a quantidade de RF immobilizada na matriz  $\text{SNPRF}_{\text{sol-gel}}$  influenciará o comportamento eletroquímico e as propriedades eletrocatalíticas destes sistemas.

Nesta etapa do trabalho, imobilizou-se RF em diferentes concentrações sobre a superfície do material sol-gel modificado com óxido de nióbio (V) e posteriormente fosfatado ( $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$ ). A Figura 26, mostra os voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de pasta de carbono contendo a matriz na ausência de RF (Figura 26 A). Observa-se claramente neste caso, a ausência de picos redox na região de potenciais entre  $-400$  e  $0$  mV. No entanto, na presença de RF (Figura 26 B) adsorvida sobre a matriz, é possível observar um par de picos redox bem definidos, sendo o pico anódico em  $-130$  mV e o pico catódico em  $-200$  mV. Desta forma o potencial formal da RF adsorvida sobre esta matriz (Sensor 1) é de  $-165$  mV.

Os valores de potencial da RF immobilizada sobre a matriz  $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$  para os demais sensores estão apresentadas na Tabela 14.

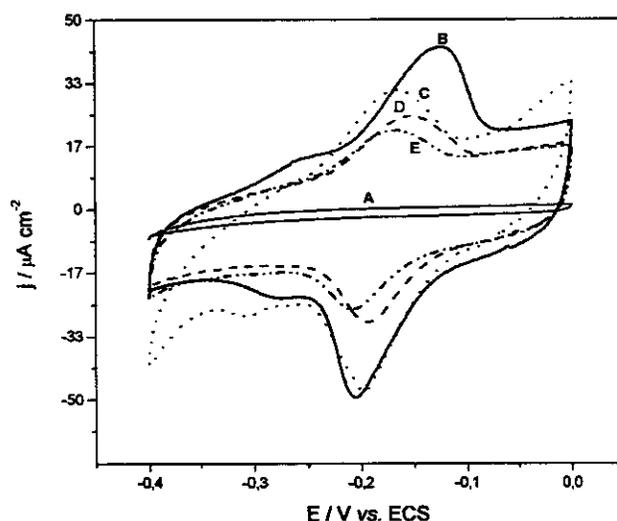


Figura 26. Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com  $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$  (A) e  $\text{SNPRF}_{\text{sol-gel}}$ , os quais são: Sensor 1 (B); Sensor 2 (C); Sensor 3 (D) e Sensor 4 (E) a  $20 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0

A quantidade de RF adsorvida na matriz  $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$  afeta as propriedades eletroquímicas dos diferentes sensores, como pode ser observado na Tabela 14. A separação de pico,  $\Delta E_p$ , aumenta em função da quantidade de RF adsorvida na matriz  $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$ , provavelmente devido a dificuldade no processo de difusão dos íons do eletrólito suporte através dos pequenos poros da matriz sol-gel.

Tabela 14. Separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e potencial formal ( $E^0$ ), obtidos para os diferentes sensores preparados com  $\text{SNPRF}_{\text{sol-gel}}$  em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a uma velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$

Sensor	$\Delta E_p$ (mV)	$E^0$ (mV)
1	$70 \pm 2$	$-165 \pm 3$
2	$50 \pm 1$	$-175 \pm 3$
3	$30 \pm 1$	$-170 \pm 3$
4	$20 \pm 1$	$-170 \pm 3$

A eficiência dos sensores foi estimada como uma função da quantidade de RF adsorvida na matriz  $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$  (Tabela 15). Como pode ser observado nesta Tabela, há uma correlação entre a quantidade de RF adsorvida e a corrente de pico obtida. Os sensores desenvolvidos com menores concentrações de RF apresentaram maior eficiência e este comportamento pode ser explicado devido a uma melhor distribuição da RF sobre o material sol-gel melhorando a transferência de elétrons.

Tabela 15. Eficiência dos diferentes sensores preparados com  $\text{SNPRF}_{\text{sol-gel}}$  como função da quantidade de RF adsorvida no material

Sensor	$I_{pa} / \mu\text{A}$	$\mu\text{mol de RF / g}$ of material	Fator de eficiência (A g / mol)
1	2,42±0,01	44±2	0,054±0,001
2	2,13±0,01	37±1	0,056±0,001
3	1,83±0,01	31±1	0,058±0,001
4	1,64±0,01	24±1	0,066±0,001

Outros estudos para verificar o comportamento eletroquímico dos diferentes sensores desenvolvidos foram realizados. Estudos sobre a influência do eletrólito suporte, pH da solução e solução tampão foram feitos e nenhuma mudança significativa foi observada em relação aos demais sistemas anteriormente avaliados:  $\text{SNRF}$ ,  $\text{SNPRF}$  e  $\text{SNRF}_{\text{sol-gel}}$ .

As propriedades eletroquímicas destes sensores foram avaliadas também por outros parâmetros.

O estudo de estabilidade, realizado com os diferentes sensores, evidenciou que após sucessivos ciclos de varredura (120 ciclos), não observou-se queda da intensidade de corrente e nem deslocamento de potencial formal da RF, sugerindo que a RF está fortemente adsorvida na matriz  $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$ . Os sensores foram estocados em refrigerador e mantiveram alta estabilidade por pelo menos 20 dias.

Os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (de 5 a 250  $\text{mV s}^{-1}$ ) no intervalo de potencial de -400 a 0 mV, mostraram que para concentrações maiores de RF (0,010 % e 0,005%), não foi possível trabalhar com

velocidades de varredura maiores que  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , uma vez que acima desta velocidade de varredura não há definição dos picos de oxidação e redução. Isto indica que quando se trabalha com concentrações menores de RF sobre a matriz (sensores 3 e 4), o número de espécies carregadas que precisam difundir até o eletrodo para manter a eletroneutralidade do sistema é menor. Portanto, o tempo necessário para ocorrer a transferência de elétrons através destas espécies carregadas e a RF presente nestes sensores, é provavelmente menor do que nos sensores 1 e 2. Este fato permite que se trabalhe com velocidades de varredura maiores, quando se utiliza os sensores contendo menores concentrações de RF, o que pode ser importante para determinação de alguns parâmetros cinéticos.

A relação entre corrente de pico e velocidade de varredura foi avaliada para todos os sensores desenvolvidos e como esperado, observou-se para todos os casos uma relação linear entre corrente de pico e raiz quadrada da velocidade de varredura. Este comportamento é similar a um processo redox controlado por difusão. Como anteriormente discutido, certamente, as características dos materiais sol-gel (pequeno tamanho de poro) estão afetando o processo de difusão, dificultando a difusão dos íons do eletrólito de suporte para manter a eletroneutralidade da superfície do eletrodo.

O estudo da dependência dos potenciais de pico (anódico e catódico) em função da velocidade de varredura, revelou que, para os quatro sensores desenvolvidos, os processos de oxidação e redução ocorrem de maneira similar, ou seja, não há um processo preferencial. Além disso, não deve ocorrer interação da espécie eletroativa com as espécies do eletrólito suporte.

Finalizando a caracterização eletroquímica da RF imobilizada, em diferentes concentrações, em  $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$ , avaliou-se o efeito da separação dos potenciais de pico ( $\Delta E_p$ ) em função da velocidade de varredura. Observou-se para todos os sensores desenvolvidos, um aumento de  $\Delta E_p$  com o aumento da velocidade de varredura, indicando que ocorrem problemas com a cinética da transferência de elétrons da RF, provavelmente relacionado com o próprio material do eletrodo.

Um interessante efeito observado durante este estudo, diz respeito ao sensor 1 (maior concentração de RF), cuja relação entre  $\Delta E_p$  e  $v$  (velocidade de varredura), apresentou uma tendência a atingir um patamar para maiores velocidades de varredura. Devido ao maior número de espécie eletroativa imobilizada neste sensor (44  $\mu\text{mol}$  de RF por grama de material), a difusão para a superfície do eletrodo, de uma maior quantidade de espécie carregada (positiva ou negativa) para manter a eletroneutralidade na superfície do eletrodo é necessária. Como é conhecido que  $\Delta E_p$  indica a resistência de um sistema à transferência de elétrons, e ainda, a transferência de elétrons através de espécies carregadas necessita de um determinado tempo para ocorrer; quando este tempo necessário para a observação deste efeito é diminuído, através do aumento da velocidade de varredura, um patamar da relação  $\Delta E_p$  versus  $v$ , pode ser observado, devido à limitação cinética da transferência de elétrons do sistema.

#### IV.5.1 DETERMINAÇÃO DE PARAMETROS CINÉTICOS PARA A RF ADSORVIDA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NA MATRIZ $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$

De modo a estudar e avaliar a cinética de transferência de elétrons entre a RF em diferentes concentrações e o eletrodo, parâmetros tais como:  $\alpha$  (coeficiente de transferência de elétrons) e  $\kappa$  (constante de velocidade de transferência de elétrons) para a RF adsorvida em diferentes concentrações sobre a matriz  $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$  foram estimados. Os métodos utilizados foram descritos anteriormente para a RF adsorvida sobre as diferentes matrizes e os parâmetros cinéticos calculados são apresentados na Tabela 16.

Como discutido anteriormente, todos os sensores estudados possuem cinética apropriada de transferência de elétrons para serem empregados nos estudos de mecanismos de reação envolvendo RF adsorvida e coenzimas tais como NADH.

Tabela 16. Valores estimados de  $\alpha$  (coeficiente de transferência de elétrons) e  $\kappa$  (constante de velocidade de transferência de elétrons) para os diferentes sensores preparados com SNPRF<sub>sol-gel</sub>

Sensor	$\alpha_{Tafel}$	$\alpha_{Laviron}$	$\kappa$ (s <sup>-1</sup> )
1	0,45±0,02	0,46±0,02	35±0,5
2	0,46±0,02	0,46±0,02	36±0,7
3	0,48±0,02	0,47±0,02	37±0,8
4	0,48±0,02	0,49±0,02	37±0,8

Os valores de  $\kappa$  mostram que a velocidade de transferência de elétrons entre RF e o eletrodo é suficiente para permitir a utilização destes materiais como sensores para substâncias eletroativas tais como o NADH.

#### IV.5.2 Estudo da Eletrooxidação de NADH através da RF imobilizada em diferentes concentrações sobre a matriz SNP<sub>sol-gel</sub>

Nesta etapa do trabalho, avaliou-se a capacidade eletrocatalítica da riboflavina, imobilizada em diferentes concentrações sobre esta matriz, em oxidar NADH. Foram feitos os testes em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0; com os quatro sensores desenvolvidos. Através da Figura 27, é possível observar que ocorreu eletrocatalise em todos os casos estudados, porém esta foi mais efetiva para os sensores construídos com menores concentrações de RF. No entanto, assim como discutido em outros sistemas anteriormente estudados (SNRF, SNPRF e SNRF<sub>sol-gel</sub>), a eletrocatalise apresentada por este sistema é pouco efetiva.

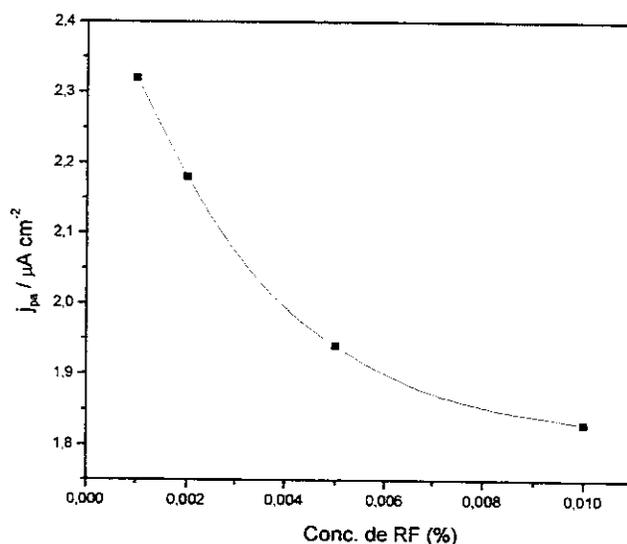


Figura 27. Dependência da densidade de corrente catalítica da eletrooxidação de NADH em função da concentração de RF utilizada na preparação dos diferentes sensores

O fato da catálise de NADH ser mais efetiva nos sensores construídos com menores concentrações de RF indica que provavelmente ocorra melhor distribuição da espécie eletroativa sobre a matriz e conseqüentemente sobre o eletrodo de trabalho, facilitando a difusão do NADH e a transferência de elétrons. Porém, ao mesmo tempo que a RF nestes sensores está melhor distribuída superficialmente e permite um melhor acesso do NADH ao sítio ativo desta, a quantidade de RF sobre esta matriz é relativamente pequena.

Como anteriormente discutido, para os demais sistemas estudados, o potencial formal da RF imobilizada, embora tenha sido deslocado para valores mais positivos, ainda pode ser insuficiente para que a catálise seja efetiva, em menores concentrações de NADH, e, ainda um provável efeito de matriz, pode estar dificultando a interação entre a RF e o NADH, no sentido de dificultar a difusão do NADH. Estes fatores podem explicar o fato da intensidade de corrente catalítica ser baixa mesmo com uma concentração de NADH no interior da solução de  $1,0\ 10^{-3}\ mol\ L^{-1}$ .

Após estas observações, iniciou-se para o estudo de outras moléculas

adsorvidas sobre estas matrizes, as quais foram: FAD e FDA. A justificativa para tal é que FAD é uma flavina que possui grupos fosfatos em sua estrutura, os quais poderiam melhorar a transferência de elétrons, e talvez apresentasse melhores propriedades eletrocatalíticas que a RF quando imobilizada na matriz SN. Porém os resultados obtidos para o sistema SNFAD foram similares aos apresentados pelos sistemas envolvendo a RF (ver ítem **VII. ANEXO**).

No caso da FDA, o objetivo de se estudar o comportamento desta molécula adsorvida sobre a matriz SN, é que esta possui uma estrutura mais simples que as flavinas, o que poderia melhorar a transferência de elétrons entre esta molécula e o NADH e, portanto, os grupos  $\text{NH}_2$  poderiam apresentar boa atividade catalítica frente ao NADH. Além disso, este composto é o precursor dos corantes orgânicos com estruturas similares às flavinas e existem poucos trabalhos na literatura explorando suas potencialidades na eletrocatalise de coenzimas, tais como o NADH.

## IV.6 SISTEMA EPC/SNFDA

Nesta etapa do trabalho, imobilizou-se a *o*-fenilenodiamina (FDA) sobre a superfície da sílica gel previamente modificada com óxido de nióbio (SN). A Figura 28 ilustra a estrutura da *o*-fenilenodiamina e através desta pode-se prever que a imobilização da FDA sobre a matriz SN ocorre através da interação dos grupos  $\text{NH}_2$  da espécie eletroativa com o sítio ácido de adsorção da matriz  $(\equiv\text{SiO})_n\text{Nb}(\text{OH})_{5-n}$  conforme o Esquema 3. Esta interação ácido-base, é provavelmente a responsável pela elevada estabilidade apresentada pelo sensor e que será discutida adiante.

A quantidade de FDA adsorvida sobre a superfície da sílica gel modificada com óxido de nióbio (SN), obtida por análise elementar foi de  $47 \mu\text{mol g}^{-1}$ , sendo similar a resultados obtidos na literatura [177] para sistemas similares.

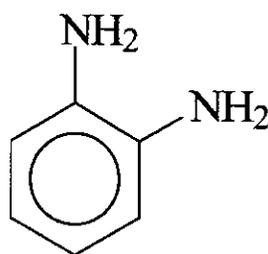
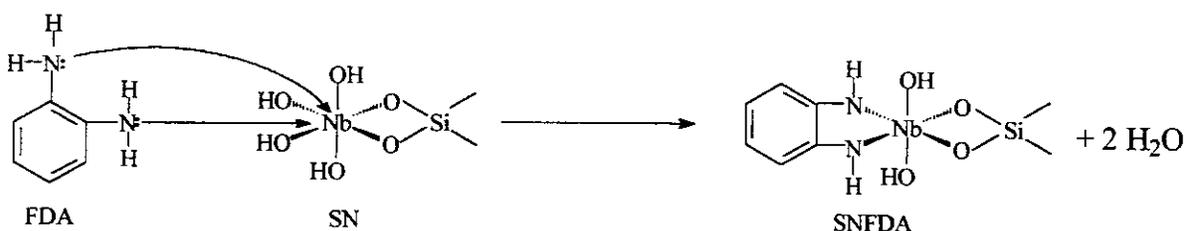


Figura 28. Estrutura da *o*-fenilenodiamina (FDA)



Esquema 3. Mecanismo de Adsorção da *o*-fenilenodiamina (FDA) sobre a SN

A Figura 29 A, mostra o voltamograma cíclico obtido com o eletrodo de pasta de carbono contendo a matriz na ausência de FDA. Observa-se neste caso a ausência de picos redox na região de potenciais entre  $-400$  e  $0$  mV. Além disso, o voltamograma cíclico obtido, empregando um eletrodo de pasta de carbono, neste mesmo intervalo de potencial, na presença de FDA em solução, numa

concentração de  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  também não revelou pico redox (Figura 29 B). No entanto, na presença de FDA adsorvida sobre a matriz foi possível observar um par de picos redox bem definidos, sendo o pico anódico em  $-130 \text{ mV}$  e o pico catódico em  $-150 \text{ mV}$  (Figura 29 C). Desta forma o potencial formal do sistema EPC/SNFDA é de  $-140 \text{ mV}$ .

Além disso, na Figura 30 é possível observar que após sucessivos ciclos de varredura de potencial nas mesmas condições citadas anteriormente, não houve

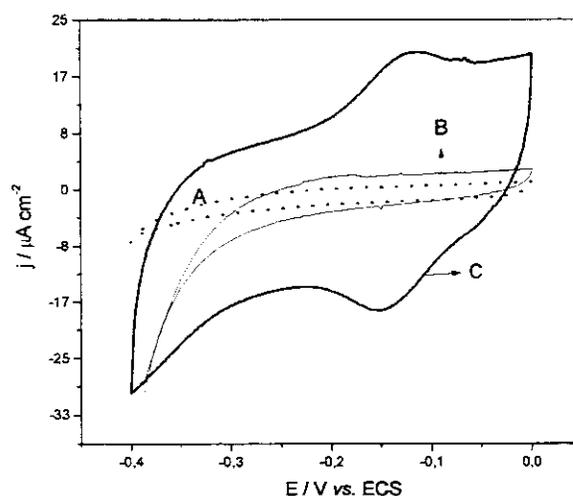


Figura 29. Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC modificado com SN (A); EPC na presença de FDA em solução ( $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e EPC modificado com SNFDA (C) a  $20 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0

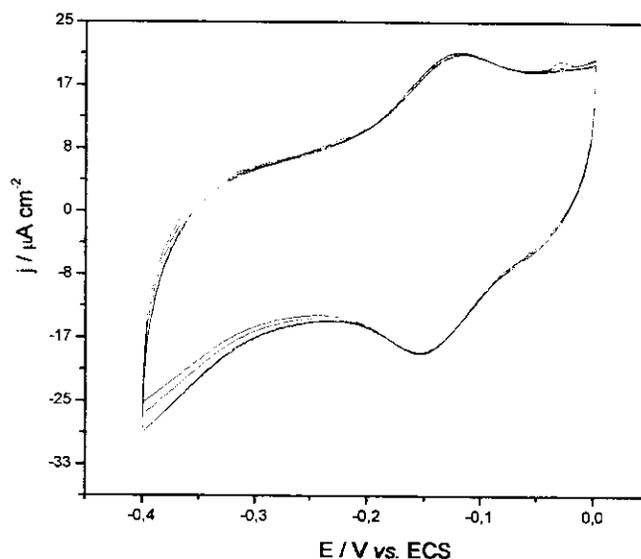


Figura 30. Voltamogramas cíclicos sucessivos (10<sup>o</sup>, 50<sup>o</sup> e 100<sup>o</sup> ciclos) obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFDA a 20 mV s<sup>-1</sup> em solução de NaNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0

queda da intensidade de corrente de pico e nem deslocamento do potencial médio, sugerindo uma grande estabilidade da FDA imobilizada sobre a SN, onde o nível de corrente mesmo depois de muitos ciclos (pelo menos 100) permanece constante. Consequentemente nenhuma lixiviação da FDA adsorvida sobre a SN foi observada.

É importante mencionar neste ponto do trabalho, que estudos realizados por Miller e colaboradores [137] levaram estes a concluir que a estrutura monomérica de fenilenodiaminas não possuem estabilidade química nem eletroquímica, além disso, elas não podem ser facilmente imobilizadas sobre a superfície de eletrodos e possuem potencial formal muito alto para aplicações reais. Outro ponto importante observado e que merece ser destacado foi o potencial anódico de aproximadamente 770 mV vs. ECS em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 e utilizando-se eletrodo de pasta de carbono como eletrodo de trabalho, com pobre estabilidade. Observou-se também (Figura 31) a ausência de pico catódico, indicando um processo anódico irreversível.

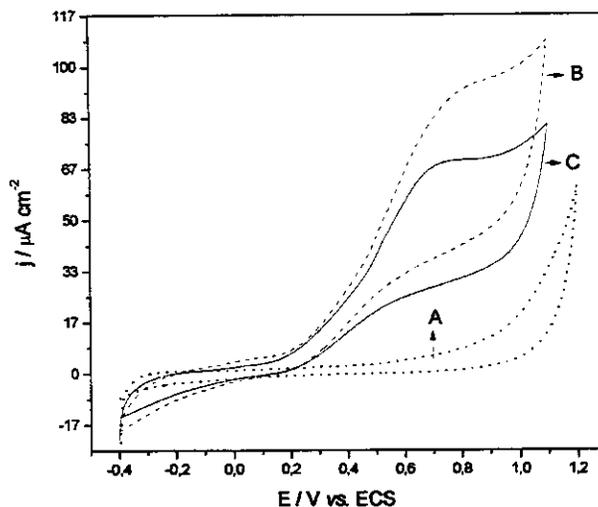


Figura 31. Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 (A), em solução de FDA 1 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> referente ao 1<sup>o</sup> ciclo (B) e ao 2<sup>o</sup> ciclo (C)

Portanto, através destes estudos, pode-se concluir que a matriz SN propicia propriedades interessantes à espécie eletroativa (FDA) quando imobilizada, tais como: elevada estabilidade e um deslocamento do potencial anódico para valores onde o efeito de espécies interferentes é minimizado.

Após a verificação da estabilidade da FDA imobilizada sobre a matriz SN, na etapa seguinte partiu-se para a caracterização eletroquímica do sistema EPC/SNFDA.

Através do estudo da influência da natureza de cátions e ânions (Tabela 17) nos valores da separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e potencial formal ( $E^0$ ) da FDA imobilizada sobre a sílica gel modificada com óxido de nióbio (SN) foi possível observar que os diferentes cátions estudados não afetam significativamente a resposta da espécie eletroativa, uma vez que os parâmetros analisados ( $\Delta E_p$  e  $E^0$ ) foram praticamente constantes. Provavelmente as interações das formas oxidadas e reduzidas da espécie eletroativa com os diferentes eletrólitos (diferentes soluções de cátions) ocorrem da mesma forma.

Estes resultados estão em concordância com aqueles apresentados em trabalhos reportados na literatura [51, 159, 217].

Tabela 17. Valores da separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e do potencial formal ( $E^0$ ) obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFDA em diferentes soluções de eletrólito de suporte, pH 7,0 a 20 mV s<sup>-1</sup>

Solução 0,1 M pH 7,0	$\Delta E_p$ / mV	$E^0$ / mV
NaNO <sub>3</sub>	20±1	-140±3
KNO <sub>3</sub>	25±1	-140±3
LiNO <sub>3</sub>	25±1	-140±3
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	25±1	-140±3
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	30±1	-130±3
NaCl	25±1	-140±3
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30±1	<b>-165±3</b>
NaClO <sub>4</sub>	25±1	<b>-170±3</b>

Para os ânions algumas influências sobre a espécie ativa foram observadas, onde, apenas um pequeno efeito sobre o sistema (deslocamento do potencial formal da FDA para valores mais negativos) foi verificado quando se trabalhou com solução de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e de NaClO<sub>4</sub>, e provavelmente este comportamento pode ser atribuído a uma interação entre estas espécies com a FDA, estabilizando a forma oxidada da espécie eletroativa.

No entanto, quanto ao parâmetro separação de potencial de pico, nenhum dos cátions e/ou ânions estudados apresentaram comportamento distinto (entre 20 e 30 mV), o que indica que o processo de transferência de elétrons não sofre influência do meio, ou seja, provavelmente as formas oxidadas e reduzidas do mediador interagem de maneira similar com os diferentes eletrólitos suportes.

Finalizando os estudos relativos ao efeito do eletrólito suporte sobre a FDA imobilizada, verificou-se através de estudos que, para concentrações de eletrólito de suporte maiores que 0,1 mol L<sup>-1</sup>, nenhuma influência significativa foi observada sobre os parâmetros  $\Delta E_p$  ou nível de corrente. Este comportamento sugere uma boa mobilidade dos contra-íons necessária para o transporte de carga ou para

manter a eletroneutralidade na superfície do eletrodo durante o processo redox.

A Tabela 18 mostra os dados relativos ao estudo do efeito pH e através desta observou-se que o potencial médio da FDA imobilizada manteve-se constante no intervalo de pH de 3 a 8, sendo que este comportamento está em contraste com aqueles observados para fenoxazinas, como o azul do Nilo solubilizado ou adsorvido sobre grafite [23]. Esta invariância do  $E^0$  pode ser atribuída a um efeito protetor da matriz, o qual minimiza a influência do pH sobre a espécie (FDA) adsorvida.

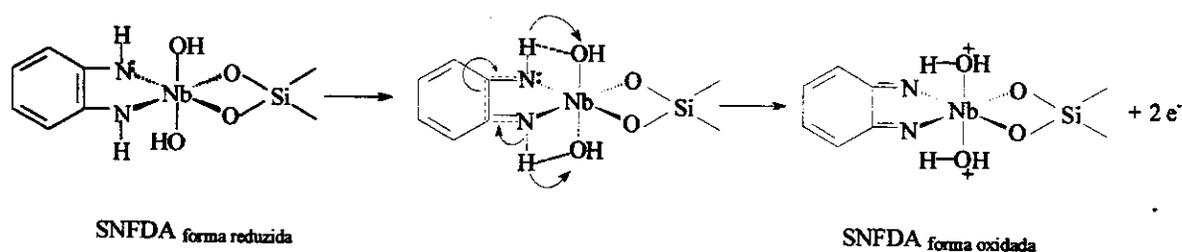
Este efeito de proteção deve ocorrer através de uma interação extremamente forte e estável entre os sítios ácidos (ácido de Lewis) da matriz SN e os grupos  $\text{NH}_2$  da FDA (base de Lewis), a qual não pode ser dissociada na solução no intervalo de pH estudado (3-8). Uma proposta deste efeito de proteção da matriz, evidenciando a independência do próton no processo redox da FDA imobilizada sobre SN, é apresentada no Esquema 4 e um mecanismo similar deve ocorrer nos sistemas anteriormente estudados envolvendo a RF (base de Lewis) e as diferentes matrizes modificadas com óxido de nióbio (ácidos de Lewis).

Este comportamento do potencial médio, entre pH 3 e 8, faz desta matriz uma fonte atrativa para o estudo do mecanismo de reação entre o NADH e a FDA adsorvida na matriz (SN), pois a eliminação da influência da concentração de  $\text{H}^+$  nesta faixa de pH durante o processo redox do sistema EPC/SNFDA, assegura que a eletrooxidação do NADH é afetada apenas pelo deslocamento do potencial formal do NADH. Este aspecto é muito importante para verificar o efeito do potencial termodinâmico na reação entre o NADH e a FDA.

Finalizando, é importante destacar que a literatura [17, 69, 120] sugere que o processo redox da o-fenilenodiamina envolve 2 prótons e 2 elétrons e através dos dados obtidos nesta etapa do trabalho, pode-se concluir que a FDA imobilizada na matriz SN mostrou independência de prótons ( $\text{H}^+$ ) e portanto a etapa determinante do mecanismo envolve a transferência de 2 elétrons e nenhum próton.

Tabela 18. Valores da separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e do potencial formal ( $E^0$ ) obtidos para eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFDA em solução de  $\text{NaNO}_3$  em diferentes valores de pH através de voltametria cíclica a  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$

pH	$\Delta E_p / \text{mV}$	$E^0 / \text{mV}$
3	$30 \pm 1$	$-138 \pm 3$
4	$30 \pm 1$	$-138 \pm 3$
5	$25 \pm 1$	$-140 \pm 3$
6	$20 \pm 1$	$-140 \pm 3$
7	$20 \pm 1$	$-140 \pm 3$
8	$20 \pm 1$	$-140 \pm 3$



Esquema 4. Processo redox da SNFDA

O estudo do efeito (composição) de tampão (Tabela 19) mostra os valores de separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e potencial formal ( $E^0$ ) obtidos para o sistema EPC/SNFDA em diferentes soluções tampões. É possível observar que o sistema sofre pequena influência da solução tampão TRIS, enquanto que as soluções tampões fosfato, HEPES e PIPES apresentaram valores praticamente constantes de separação de pico e potencial formal.

De um modo geral, através da Tabela 19 o sistema apresenta nas soluções tampões fosfato, PIPES e HEPES, em relação à solução tampão TRIS, menor resistência à transferência de elétrons (através do parâmetro  $\Delta E_p$ ).

Através deste estudo, é possível ainda observar que o tampão TRIS, assim como para os demais sistemas estudados empregando a RF como mediador de elétrons, influenciou a resposta do sistema, uma vez que o potencial formal da FDA imobilizada sobre SN apresenta valor mais negativo comparado com o potencial formal da FDA obtido com as demais soluções estudadas. Uma possível

explicação para este comportamento é que este meio pode estar fornecendo densidade eletrônica à espécie eletroativa imobilizada, fazendo com que a forma oxidada da espécie eletroativa esteja sendo estabilizada. Quanto ao parâmetro  $\Delta E_p$ , o qual apresentou o maior valor entre as diferentes soluções estudadas, a provável explicação para este comportamento é que esteja ocorrendo a adsorção destas moléculas sobre a superfície do eletrodo dificultando a transferência de elétrons.

Tabela 19. Valores da separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e do potencial formal ( $E^0$ ) obtidos para eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFDA em diferentes soluções tampões, pH 7,0 através de voltametria cíclica a  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$

Solução 0,1 M pH 7,0	$\Delta E_p / \text{mV}$	$E^0 / \text{mV}$
Fosfato	$20 \pm 1$	$-140 \pm 3$
HEPES	$20 \pm 1$	$-140 \pm 3$
PIPES	$20 \pm 1$	$-145 \pm 3$
TRIS	$50 \pm 3$	$-175 \pm 4$

Porém, para o estudo da eletrooxidação de NADH a solução tampão fosfato foi a escolhida, uma vez que neste meio o sistema apresentou boa reversibilidade química ( $I_{pa} / I_{pc} = 0,98$ ) e é conhecido da literatura que uma provável formação de um complexo entre o NADH e o fosfato, como num aduto, torna a eletrooxidação de NADH mais fácil [218]. Portanto, a composição da solução tampão pode afetar o  $E^0$  da espécie eletroativa ou até mesmo a estabilidade do eletrodo, se, os constituintes do tampão competem com a FDA pelos sítios ativos do material do eletrodo (óxido metálico), ou ainda, interagem com a FDA ou com ambos (FDA e óxido metálico).

A Figura 32 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (de 5 a  $150 \text{ mV s}^{-1}$ ) no intervalo de potencial de -400 a 0 mV, onde é possível observar que não ocorre nenhuma mudança no formato geral dos mesmos.

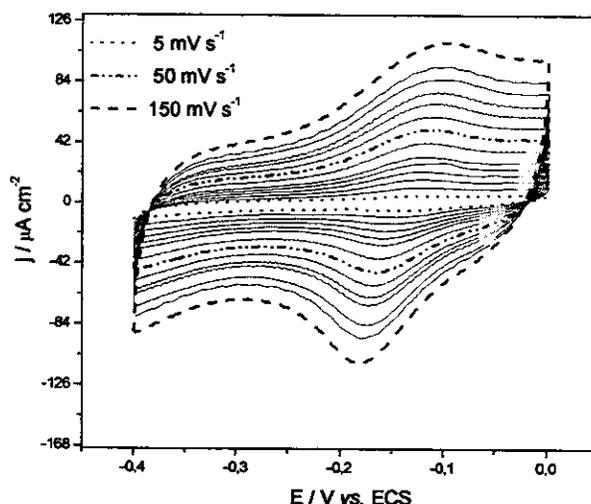


Figura 32. Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC modificado com SNFDA em diferentes velocidades de varredura ( $5\text{-}150\text{ mV s}^{-1}$ ) em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1\text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0

Após a obtenção dos voltamogramas cíclicos mostrados na Figura 32, construiu-se um gráfico de corrente de pico anódico em função da velocidade de varredura, e através da Figura 33, pode-se observar que esta relação é linear ( $r = 0,999$ ), sugerindo que a espécie eletroativa (FDA) está adsorvida sobre a superfície da matriz SN, a qual fora evidenciada, através dos dados mostrados na Figura 30, onde foi possível observar que não há lixiviação da espécie eletroativa da matriz (superfície do eletrodo) para a solução de trabalho, mesmo após longo período de uso. Além disso, este comportamento indica que a transferência de elétrons é eficiente [211].

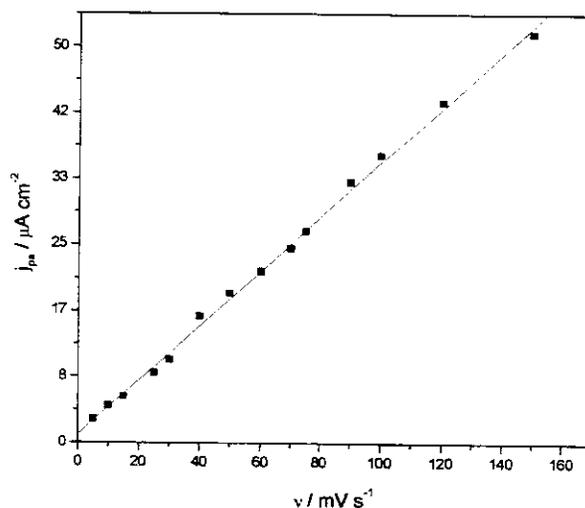


Figura 33. Variação da intensidade de corrente de pico anódico em função da velocidade de varredura

O efeito da separação dos potenciais de pico ( $\Delta E_p$ ) em função da velocidade de varredura (Figura 34), revela que ocorre um aumento de  $\Delta E_p$  com o aumento da velocidade de varredura.

Assim como já discutido para os sistemas envolvendo a RF imobilizada sobre diferentes matrizes, este comportamento indica que, também neste caso, devem estar ocorrendo problemas cinéticos durante a transferência de elétrons, os quais estão provavelmente relacionados à resistência do próprio material do eletrodo, pelo fato do óleo mineral e a própria sílica gel modificada não serem bons materiais condutores. O baixo valor de  $\Delta E_p$  mesmo a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (90 mV), comparado com sistemas similares apresentados na literatura [159] sugere uma melhor transferência de elétrons no presente caso.

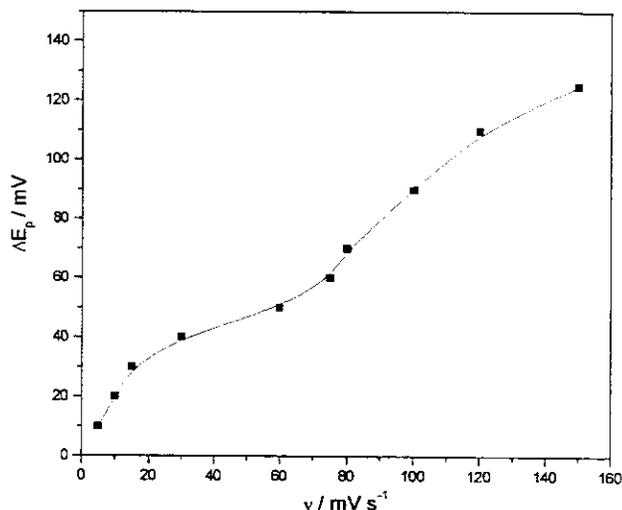


Figura 34. Variação da separação de potencial de pico ( $\Delta E_p$ ) em função da velocidade de varredura obtido com eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFDA em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0

A dependência dos potenciais de pico em função da velocidade de varredura (Figura 35), permite observar que não há variação significativa dos potenciais de pico anódico para o intervalo de velocidades de varredura estudado, ou seja, não ocorre nenhum problema sobre o sistema durante o processo de oxidação da FDA. No entanto, nesta Figura observa-se que há variação significativa dos potenciais de pico catódico em função da velocidade de varredura.

De acordo com o Esquema 4, após a formação da forma oxidada do sistema SNFDA, deve haver a formação de duas moléculas de água e o processo de redução deste sistema envolveria a entrada de água com a liberação do próton para o átomo de nitrogênio da FDA. Este processo deve ser difícil de ocorrer e esta dificuldade se reflete no comportamento do processo catódico ilustrado na Figura 35. Uma outra proposta para explicar este comportamento do sistema SNFDA seria que após a formação das cargas apresentadas no Esquema 4 (forma oxidada) poderia ocorrer a entrada de ânions na estrutura, estabilizando as

cargas do sistema, porém, a saída destes ânions durante o processo catódico do sistema também seria difícil refletindo o comportamento apresentado na Figura 35.

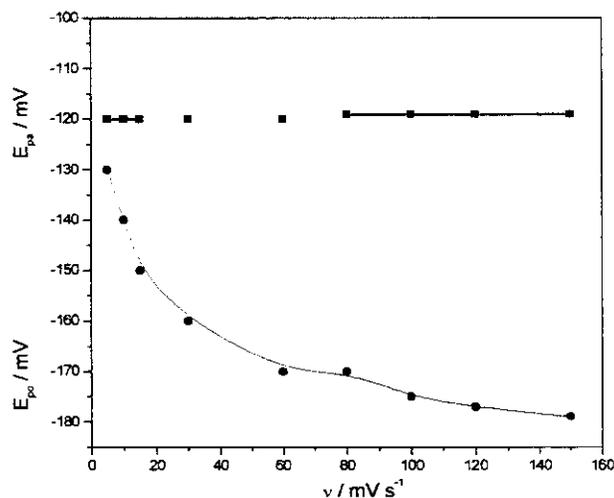


Figura 35. Dependência do potencial de pico em função da velocidade de varredura

#### IV.6.1 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS PARA A FDA ADSORVIDA NA MATRIZ SN

Dando continuidade à caracterização eletroquímica do sistema EPC/SNFDA, foram determinados alguns parâmetros cinéticos importantes tais como número de elétrons ( $n$ ), coeficiente de transferência de elétrons ( $\alpha$ ) e constante de velocidade de transferência de elétrons ( $\kappa$ ). O método utilizado para tal foi o de Laviron [211], o qual foi descrito anteriormente para os diferentes sistemas estudados, empregando a RF. O valor de  $n$  calculado através do voltamograma cíclico obtido a  $5 \text{ mV s}^{-1}$  foi de 1,92 o que indica que o processo redox da FDA envolve 2 elétrons. A partir da Figura 36, a qual ilustra a dependência do potencial de pico em função do  $\log$  da velocidade de varredura, calculou-se o coeficiente de transferência de elétrons, o qual foi igual a 1. Este valor de  $\alpha_a$  deve-se ao fato de que o potencial de pico anódico não varia com a velocidade de varredura e este comportamento já havia sido observado na Figura

35 (dependência do potencial de pico em função da velocidade de varredura). Porém, é importante destacar que, assim como na Figura 35, o processo catódico sofre influência da velocidade de varredura, evidenciando que o processo de redução da espécie eletroativa (FDA) apresenta alguma dificuldade para ocorrer.

No entanto, este valor de  $\alpha_a$  sugere que o sistema estudado apresenta reversibilidade muito boa, provavelmente devido à inexistência de limitação cinética durante o processo de transferência de elétrons. Portanto, o sistema deve ser totalmente reversível.

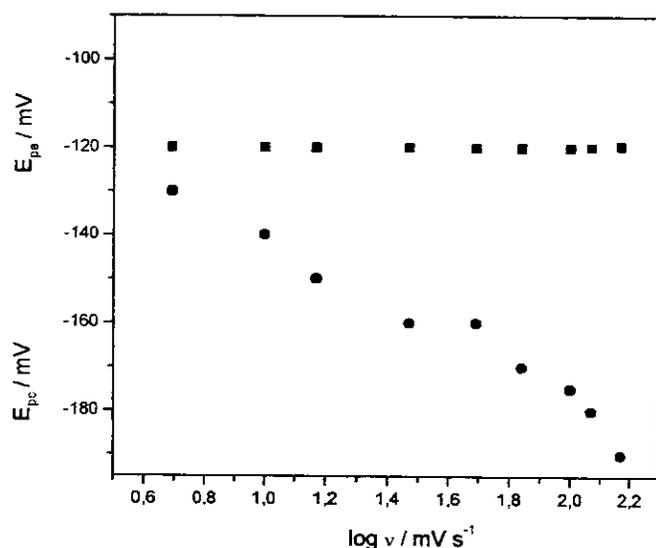


Figura 36. Potencial de pico anódico e catódico em função do  $\log$  da velocidade de varredura para o sistema EPC/SNFDA

A partir destas observações, pode concluir que o sistema EPC/SNFDA apresenta cinética de transferência de elétrons apropriada para permitir a utilização deste material como sensor para o NADH, na tentativa de investigar o mecanismo de reação entre a FDA imobilizada e esta coenzima.

#### IV.6.2 Estudo da eletrooxidação de NADH

A oxidação eletrocatalítica de NADH a potenciais abaixo de 0 mV vs. ECS [219], é muito útil para aplicações práticas, uma vez que há menos risco de reações eletroquímicas interferentes ocorrerem. Desta forma, há um grande interesse em encontrar mediadores ou formas de imobilizá-los em superfícies de eletrodos que resultem num aumento da velocidade de reação. Uma relação linear entre  $\log \kappa_{\text{obs}}$  (constante global da reação) e o potencial formal do mediador imobilizado vem sendo observada [17], evidenciando que quanto mais positivo o  $E^{\circ}$  do mediador imobilizado maior o  $\kappa_{\text{obs}}$  (Figura 7, página 27). Um aumento no  $\kappa_{\text{obs}}$  é, portanto, esperado também para a FDA adsorvida sobre a SN, em relação a FDA em solução, desde que o  $E^{\circ}$  da FDA é deslocado para o intervalo ideal de valores de potencial, a pH constante [24]. Outro fator é a invariância do potencial médio, em torno de -140 mV vs. ECS, entre pH 3 e 8 faz do sensor aqui desenvolvido (EPC/SNFDA), um instrumento interessante para o estudo do mecanismo de reação entre o NADH e FDA. Estudos prévios na variação de  $\kappa_{\text{obs}}$  com pH para aceptores de 2-elétrons e um ou dois prótons tem revelado que  $\kappa_{\text{obs}}$  é muito dependente do pH. Esta dependência não é totalmente esclarecida, podendo resultar da variação do potencial formal de ambos: o par  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  e do mediador imobilizado; portanto afetando o potencial termodinâmico da reação, isto é,  $\Delta E^{\circ}$ , para a reação de oxidação tão bem como de um inerente mecanismo dependente de pH [17,24]. Portanto, o estudo do comportamento da eletrocatalise do NADH frente a mediadores capazes de melhorar a velocidade de transferência de elétrons nesta reação é de grande importância.

O sensor EPC/SNFDA promoveu a oxidação eletrocatalítica de NADH como pode ser observada claramente pelos voltamogramas cíclicos obtidos na ausência e na presença (Figura 37) de  $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  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.

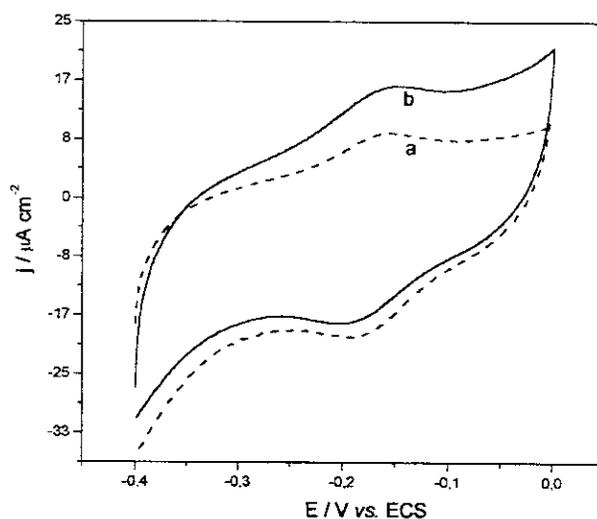


Figura 37. Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC/SNFDA na ausência (a) e na presença (b) de solução de NADH  $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0

Observa-se ainda, na Figura 37, um ligeiro deslocamento para potenciais mais negativos no pico de redução do sensor EPC/SNFDA. Este comportamento é atribuído à provável formação de um complexo de transferência de carga intermediário, entre o NADH e a FDA adsorvida na matriz de SN.

A dependência do potencial aplicado sobre a resposta do eletrodo a pH 7,0, obtido na presença de  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de NADH, é mostrada na Figura 38. A eletrooxidação de NADH começa em  $-300 \text{ mV}$  e atinge um máximo em  $-50 \text{ mV}$  vs. ECS. Este valor é intermediário comparado a 0 e  $-230 \text{ mV}$  vs. ECS observado para estudos anteriores realizados com azul de Meldola e azul do Nilo adsorvido sobre SN, respectivamente [220,184], com boa atividade para a oxidação do NADH.

A influência do pH da solução sobre a eletrooxidação do NADH (Tabela 20) é muito importante na obtenção de novas informações a respeito do mecanismo desta reação. Em soluções de pH entre 4 e 8, um efeito é observado na atividade catalítica, como evidenciado na Tabela 20, onde ocorre um ligeiro aumento na resposta do eletrodo quando o pH é aumentado.

Este comportamento é muito interessante, desde que o  $E^0$  do sistema EPC/SNFDA é constante neste intervalo de pH. Uma razoável explicação para isto é que, a oxidação do NADH é dependente do pH da solução. Uma mudança no pH da solução para um valor maior que 4 deve afetar apenas o  $E^0$  do par redox  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  (30 mV por unidade de pH [45]), ao passo que o  $E^0$  da FDA adsorvida sobre a SN permanece constante, desta forma, a resposta deve aumentar para maiores valores de pH, porque a reação de oxidação é favorecida.

Na verdade, esta hipótese está em concordância com o comportamento observado, indicando que o potencial termodinâmico para a transferência de elétrons está governando o processo. Entretanto, a formação do complexo de transferência de elétrons envolvida no mecanismo de reação redox entre o NADH e o mediador também pode ser afetado com o pH [24].

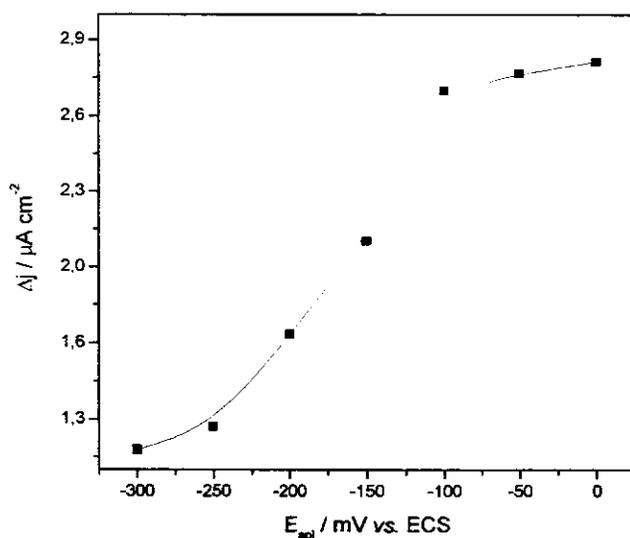


Figura 38. Dependência da corrente catalítica de NADH em função do potencial aplicado, obtida com EPC/SNFDA em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.  $[\text{NADH}] = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$

Este comportamento será comparado com os estudos cinéticos empregando EDR (eletrodo de disco rotatório), os quais mostrarão o efeito do pH na reação entre a FDA e o NADH.

Tabela 20. Efeito do pH da solução na eletrooxidação de NADH, utilizando EPC/SNFDA na presença de  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de NADH preparado em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, com o E<sub>apl.</sub> de -50 mV vs ECS

pH	4	5	6	7	8
$\Delta j / \mu\text{A cm}^{-2}$	2,38±0,02	2,63±0,03	2,74±0,03	2,80±0,03	2,90±0,03

A corrente catalítica em função da concentração de NADH apresentada nas Figuras 39 e 40, mostra claramente uma boa relação linear no intervalo de concentração de  $0,4 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> a  $8,0 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> com uma sensibilidade de 24,2 mA L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup>. O intervalo de resposta linear foi muito bom e a sensibilidade apresentou um valor intermediário comparado a 18 e 48 mA L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup> obtido para azul do Nilo e azul de Meldola adsorvido em SN, respectivamente [220, 184]. Estas características apresentadas por este sensor são importantes no estudo do mecanismo da reação entre a FDA e o NADH, pois permite que se trabalhe em baixas concentrações de NADH com uma boa sensibilidade.

A equação que descreve o intervalo da relação linear é  $\Delta j = -0,021 (\pm 0,014) + 2,91 (\pm 0,03) [\text{NADH}]$ , com um coeficiente de correlação de 0,998 para n= 20, onde  $\Delta j$  é a densidade de corrente dada em  $\mu\text{A cm}^{-2}$  e a concentração de NADH em  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. O limite de detecção nas condições otimizadas é  $7,1 \cdot 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, considerando como três vezes o sinal do ruído e uma precisão da repetibilidade de 2,1 % para 15 medidas, expressa em desvio padrão relativo.

O tempo de resposta deste sensor foi de 2,5 s (Figura 41), o qual é definido como o tempo necessário para a corrente catalítica atingir a resposta máxima. Este tempo de resposta é bastante razoável tratando-se 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.

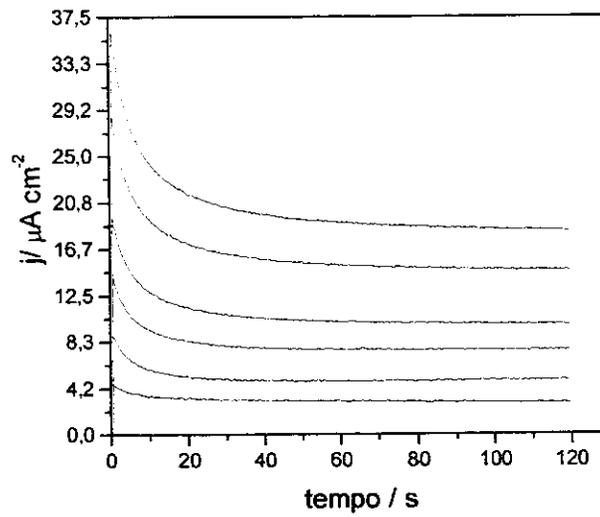


Figura 39. Amperogramas obtidos a  $-50$  mV com EPC/SNFDA em meio de solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0, através de incrementos de  $20 \mu\text{L}$  de uma solução de NADH  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$

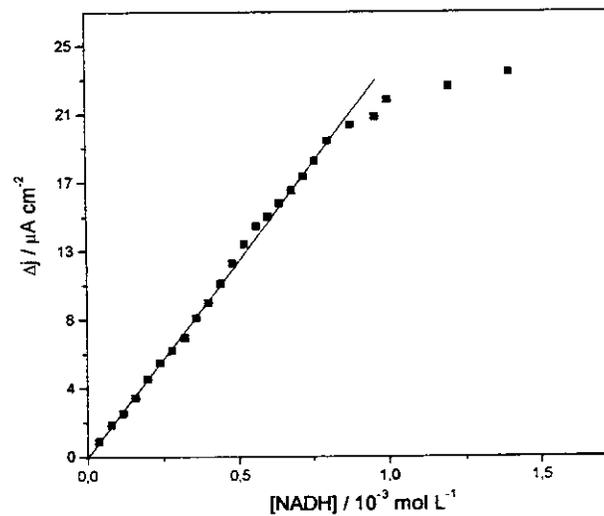


Figura 40. Curva analítica para NADH empregando o sensor EPC/SNFDA (tempo de 60 s)

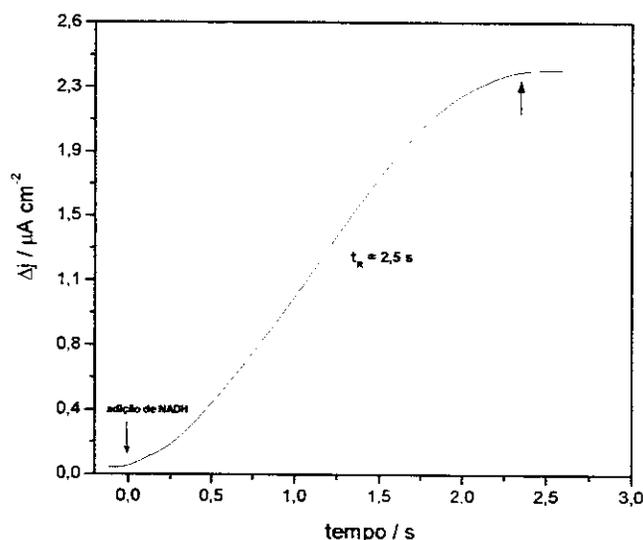


Figura 41. Determinação do tempo de resposta do sensor EPC/SNFDA em função da corrente catalítica, obtida em meio de solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0, através da adição de  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de NADH. O potencial aplicado foi de  $-50 \text{ mV vs. ECS}$

O eletrodo era muito estável permitindo 300 determinações sem nenhuma mudança significativa, ou pelo menos 1 mês quando estocado em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0, em refrigerador.

Considerando a região de saturação da curva analítica (intervalo de concentração de  $8,0 \cdot 10^{-4}$  a  $3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), um gráfico duplo-recíproco (Figura 42) foi obtido e a constante aparente de Michaelis-Menten,  $K_{Mapp}$ , foi estimada como sendo  $2,80 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Este valor é bastante baixo quando comparado a outros sistemas, tais como, Azul de Meldola adsorvido em grafite [21] e Azul do Nilo adsorvido em fosfato de zircônio [51], entretanto, é similar ao Meldola Blue adsorvido sobre SN [220],  $0,61 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Este baixo valor da constante aparente de Michaelis-Menten sugere uma grande afinidade de SNFDA pelo NADH para a formação de complexo de transferência de carga.

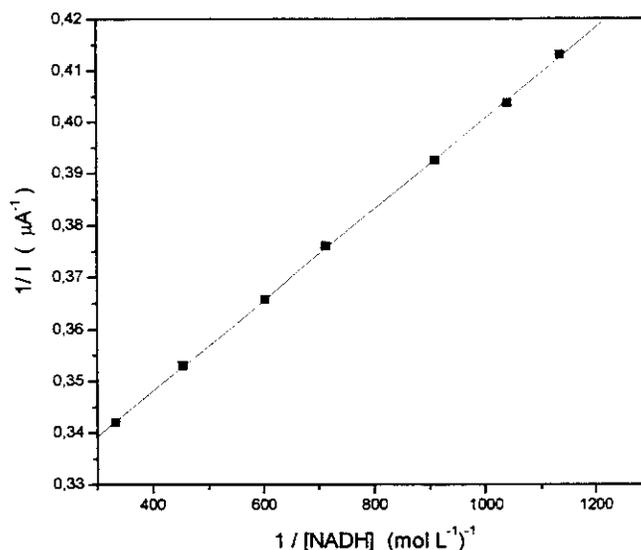


Figura 42. Gráfico do duplo-recíproco para a obtenção de  $K_{Mapp}$

A literatura mostra um trabalho de Lobo e colaboradores [221], no qual um sensor para NADH é desenvolvido através da eletropolimerização, sobre eletrodo de pasta de carbono, de um filme polimérico condutor de poli(o-fenilenodiamina), em solução aquosa de tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , através de voltametria cíclica.

Através de uma análise comparativa entre os dados apresentados por este sensor e o sensor proposto nesta Tese, pode-se verificar que o sensor desenvolvido neste trabalho apresenta algumas vantagens tais como: menor valor de potencial aplicado ( $-50 \text{ mV vs. ECS}$  contra  $150 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ ), o que pode minimizar a resposta de espécies interferentes sobre o sistema; menor tempo de resposta ( $2,5 \text{ s}$  contra  $15 \text{ s}$ ), uma vez que no caso do sensor da literatura há a necessidade do NADH difundir através do filme polimérico durante o processo de transferência, o que faz com o tempo de resposta seja grande e, finalmente, o sensor proposto apresentou maior estabilidade e sensibilidade ( $300$  determinações e  $24,2 \text{ mA L mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  contra  $160$  determinações e  $7,3 \text{ mA L mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ , respectivamente).

Por outro lado o sensor desenvolvido por Lobo *et. al.* [221], apresentou uma melhor faixa linear de resposta ( $1-10 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ) e um limite de detecção

bastante baixo, da ordem de nano molar. Estas características fazem deste sensor mais viável para aplicações práticas. Porém, como o objetivo do trabalho é estudar o mecanismo de reação de transferência de elétrons/prótons entre a FDA e o NADH, este sensor mostrou-se, através dos dados apresentados e discutidos anteriormente, promissor para tal. Na Tabela 21, são mostradas as condições finais da otimização do sensor EPC/SNFDA.

Tabela 21. Condições finais da otimização do sensor EPC/SNFDA desenvolvido para a eletrooxidação do NADH

Parâmetros	Condições otimizadas do sensor
Potencial aplicado	-50 mV
Solução de trabalho	Tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0
Estabilidade	300 determinações
Faixa de resposta linear	0,4 10 <sup>-4</sup> – 8 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup>
Sensibilidade	24,2 mA L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>
Limite de detecção	7,1 10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup>
Tempo de resposta	2,5 s
$k_{Mapp}$	2,80 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup>
Precisão da repetibilidade	2,1 % para n = 15

A literatura apresenta em algumas revisões [69, 120] sensores desenvolvidos para a detecção de NADH, além de outros trabalhos desenvolvidos com esta finalidade [64, 181] e pode-se observar que, o sensor desenvolvido apresenta características analíticas bastante vantajosas nos aspectos de estabilidade, sensibilidade, tempo de resposta e limite de detecção, onde, os valores apresentados por este sensor neste trabalho de Tese, estão entre os melhores até então registrados. Porém quanto a faixa de resposta linear, o sensor desenvolvido se enquadra numa região intermediária, uma vez que, vários dos sensores descritos na literatura, apresentam faixa de resposta linear mais ampla que esta obtida com o sensor EPC/SNFDA.

No entanto, uma vez estabelecida as propriedades eletroquímicas e estudado seu comportamento diante da reação de eletrocatalise do NADH, o próximo passo, para explorar as possibilidades deste sensor, seria o estudo da cinética da reação

do NADH com a FDA adsorvida em sílica gel modificada com óxido de nióbio, empregando eletrodo de disco rotatório.

#### IV.6.3 Estudos Cinéticos da Eletrooxidação Catalítica do NADH com Eletrodo de Disco Rotatório (EDR)

Devido a sua importância, grande esforço tem sido feito na tentativa de explicar o mecanismo da reação envolvendo o processo redox do NADH. Atualmente há algumas controvérsias sobre o mecanismo da reação. Alguns estudiosos sugerem que para a oxidação do NADH o mecanismo mais provável envolve a formação de um complexo de transferência de carga, sendo que a natureza do material do eletrodo, a concentração de NADH e o pH da solução são parâmetros importantes. No que diz respeito à natureza do material, sabe-se que o pré-tratamento da superfície do eletrodo leva ao aumento do número de grupos oxigenados, afetando o processo redox da reação, tornando-a mais rápida, principalmente em eletrodos a base de carbono onde este efeito é mais pronunciado. No tocante a influência do pH, tanto na oxidação direta como em eletrodos quimicamente modificados com a incorporação de mediadores de elétrons, o efeito do pH varia em alguns casos, dificultando seu verdadeiro entendimento.

Desta forma o aprofundamento destes estudos, explorando o uso do EDR associado às melhorias do emprego de novas matrizes e mediadores, parecem ser de grande utilidade. O EDR é utilizado para o estudo mecanístico e para a determinação de constantes eletroquímicas como a constante de formação do complexo de transferência de carga ( $k_{+1}$ ); afinidade da espécie com o substrato, constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e a constante de dissociação do complexo de transferência de carga ( $k_{+2}$ ) para a formação do produto. A base para este estudo está no gradiente de catálise apresentado pelo sensor EPC/SNFDA, em função da variação da velocidade de rotação.

Entre uma série de corantes orgânicos que têm sido amplamente usados em eletrodos modificados, muitas fenoxazinas e fenotiazinas tem apresentado propriedades eficientes para eletrooxidação catalítica do NADH [17,120]. Como

estes mediadores são compostos que envolvem no processo redox 2 elétrons e 1 próton, seus  $E^{\circ}$  variam com o pH. Vários artigos publicados mostram que a velocidade de reação destes corantes com o NADH varia com o pH [17, 178, 187] e isto é importante para verificar se esta variação da velocidade de reação é dependente do potencial termodinâmico da reação, como resultado da mudança do pH, ou, se a mudança na velocidade da reação pode ser explicada por outros fatores que poderiam gerar novos entendimentos no mecanismo entre o NADH e este tipo de acceptor elétron-próton.

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. Para o EDR, a corrente limitada pelo transporte de massa ( $I_{lim}$ ) depende da velocidade angular,  $\omega$ , (em  $\text{rad s}^{-1}$ ) e da concentração de NADH,  $[NADH]^*$ , no seio da solução, de acordo com a equação (1) de Levich [222].

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

Nesta equação  $n$  é o número de elétrons,  $F$  a constante de faraday,  $D$  o coeficiente de difusão ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $\omega$  a velocidade de rotação ( $\text{rad s}^{-1}$ ) e  $\nu$  a viscosidade cinemática ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ).

Para o sistema em estudo, é possível comprovar essas limitações (influências), submetendo o sensor EPC/SNFDA, à diferentes velocidades de rotação na presença e na ausência de NADH. Quando o NADH não está presente em solução, nenhuma variação da corrente é observada, variando-se a velocidade de rotação de 30 a 400 rpm (Figura 43). No entanto, na presença de NADH (Figura 44), observa-se claramente 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.

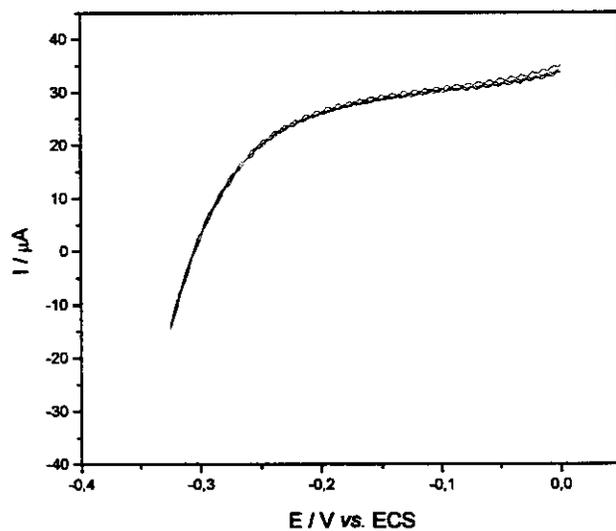


Figura 43. Voltamogramas de varredura linear obtidos para o sensor EPC/SNFDA, experimento realizado com eletrodo de disco rotatório, na ausência de NADH, em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 variando a velocidade de rotação de 30 a 400 rpm

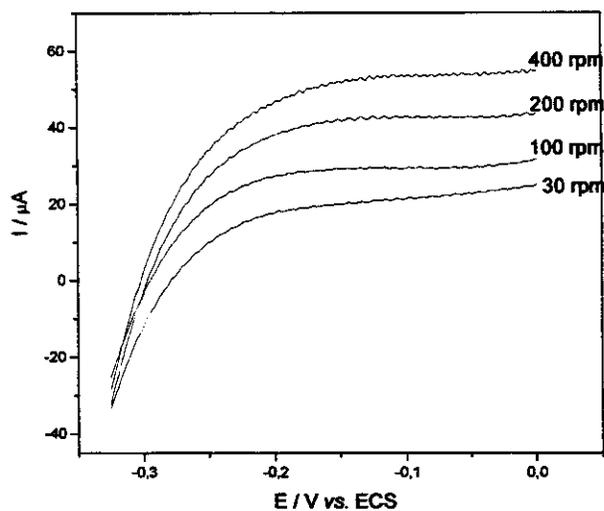


Figura 44. Voltamogramas de varredura linear obtidos para o sensor EPC/SNFDA, experimento realizado com eletrodo de disco rotatório, na presença de  $[\text{NADH}] = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 variando a velocidade de rotação de 30 a 400 rpm

A influência da componente cinética na eletrocatalise do NADH, empregando-se EDR, pôde ser comprovada através do gráfico de Levich (Figura 45). Para tanto, construiu-se um gráfico de intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade angular de rotação, e através da Figura 45, comprovou-se que nesta reação além da contribuição difusional, há também uma contribuição cinética, a qual é verificada pelo desvio da linearidade.

Desta forma o emprego de eletrodo de disco rotatório (EDR), se ajusta perfeitamente para a determinação de constantes cinéticas envolvidas na reação de eletrooxidação do NADH empregando o sistema EPC/SNFDA.

É importante mencionar as velocidades de rotação empregadas nestes estudos se justifica, uma vez que, neste intervalo foi possível observar a influência da cinética da reação (Figura 45).

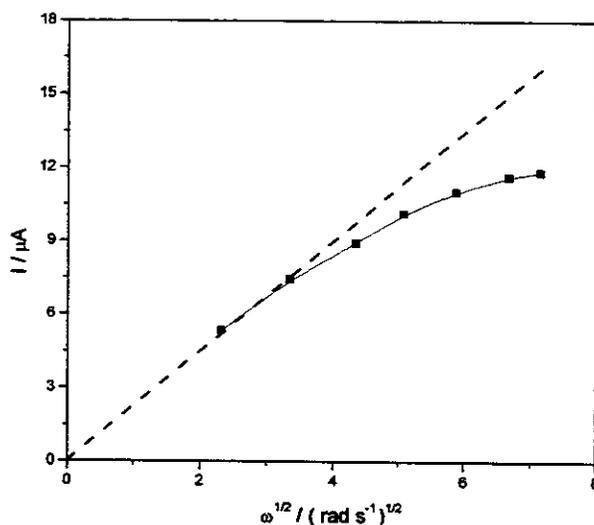


Figura 45. Variação da intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade de rotação

Conforme mencionado na literatura [17], para uma reação catalisada, a corrente limitada cineticamente ( $I_{lim}$ ), usando eletrodo de disco rotatório, pode ser expressa como escrito a seguir:

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

,onde  $\Gamma$  é a cobertura da superfície do eletrodo com os mediadores de elétrons, em ( $\text{mol cm}^{-2}$ ), o qual foi avaliado através da integração da área do pico anódico ou catódico do voltamograma obtido a baixa velocidade de varredura ( $\Gamma=Q/nFA$ ). O valor de  $\Gamma$  avaliado aqui foi de  $5,6 \pm 0,2 \cdot 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$  (Tabela 22). Considerando a análise elementar e a massa de SNFDA, contida em um eletrodo, a quantidade de FDA no eletrodo deve ser de  $3,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$ . Tendo em consideração esta quantidade e o valor de  $\Gamma$ , pode-se concluir que apenas 2,0 % da FDA está eletroquimicamente ativa na superfície do eletrodo.

Fazendo a inversão da equação (2) temos a conhecida equação (3) de Koutecky-Levich [219] da qual baseou-se para a construção do gráfico da Figura 46, variando-se a concentração de  $[\text{NADH}]^*$  conforme é observado na mesma Figura.

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

É importante frisar que o intervalo de concentração de NADH empregado neste estudo, está inserido na faixa de resposta linear do sensor EPC/SNFDA obtida em estado estacionário (Figura 40).

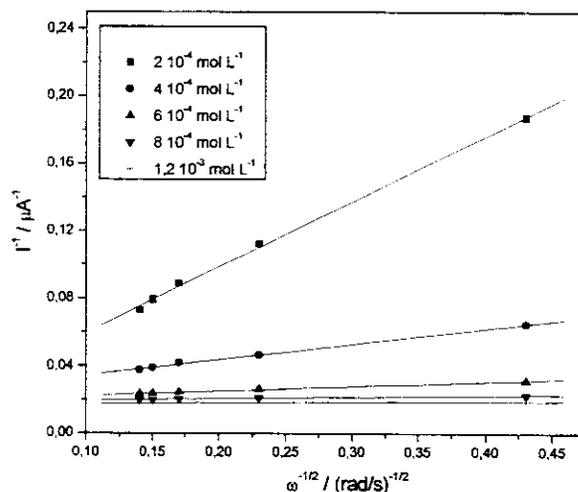


Figura 46. Gráfico de Koutechy-Levich para o eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFDA, empregando EDR em diferentes concentrações de  $\text{NADH}^+$  em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0

Pela inclinação da curva é possível obter o número de elétrons ( $n$ ) envolvidos na reação, e este foi o método utilizado para o cálculo do número de elétrons. Um segundo modo de avaliar o número de elétrons, é plotando a inclinação das curvas do gráfico de Koutechy-Levich vs  $[\text{NADH}]^+$ .

Através da interceptação do gráfico de Koutechy-Levich é possível avaliar  $\kappa_{\text{obs}}$ , conhecendo-se o valor de  $\Gamma$  (Tabela 22).

O valor da constante  $\kappa_{\text{obs}}$  (constante global da reação) apresentou-se dependente da  $[\text{NADH}]^+$ , Figura 47, e isto tem sido mostrado para todos os eletrodos modificados com mediadores usados na oxidação electrocatalítica do NADH [17, 120] sendo que, esta dependência sugere a formação de um complexo de transferência de carga (CT) entre o NADH e o mediador. Acredita-se que este complexo de transferência de carga, inicialmente formado entre os reagentes, dissocia em um passo limitante da velocidade para a reação total, análogo à cinética de reações enzimáticas de Michaelis-Mentem. Desta forma, a reação de electrooxidação do NADH pode ser representada pela equação (4) a seguir:

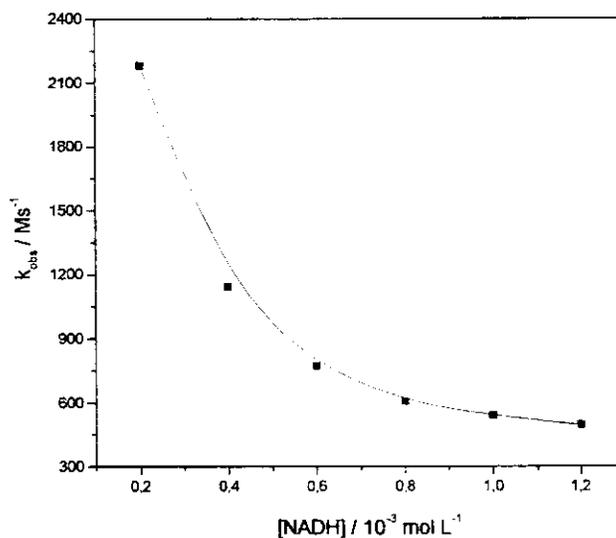
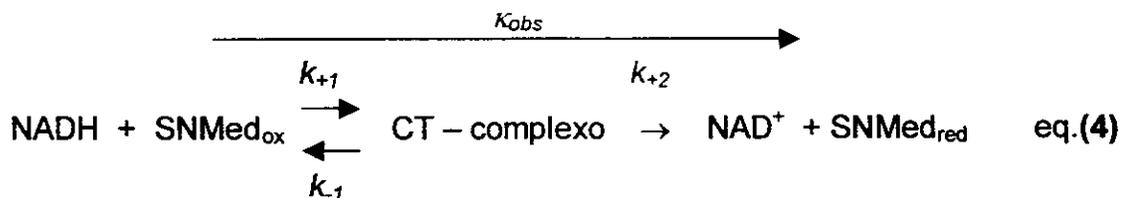


Figura 47. Variação da constante  $\kappa_{obs}$  pela  $[NADH]^*$  para o sensor EPC/SNFDA. Experimento realizado em voltametria linear em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0



Este tipo de mecanismo de reação, similar a uma reação enzimática, onde há a formação de um complexo enzima/substrato (ES), 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 como:

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

A constante global da reação,  $\kappa_{obs}$ , para qualquer concentração de NADH pode ser expressa como [10, 187]:

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

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.  $[NADH]^*$  fornece uma relação linear (Figura 48), sendo um forte aliado para acreditar que um complexo de transferência de carga deve se formar entre o mediador e o NADH. Do coeficiente angular da curva deste gráfico é possível calcular o valor de  $k_{+2}$  e do coeficiente linear o valor de  $K_M$  pode ser avaliado.

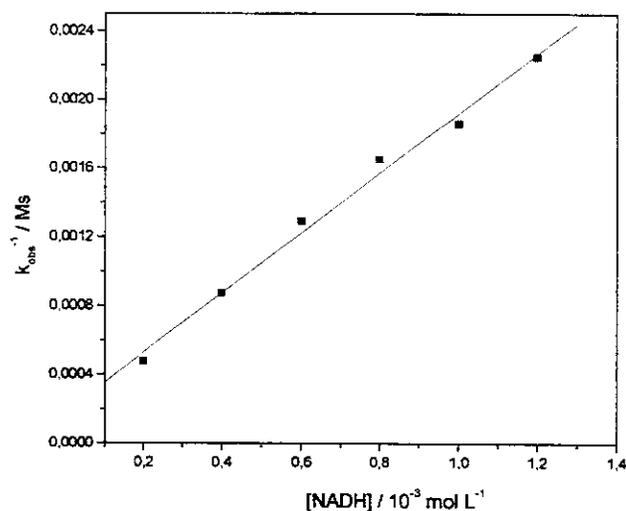


Figura 48. Variação da constante  $1/k_{obs}$  pela  $[NADH]^*$  para o EPC/SNFDA em pH 7,0

Para o sensor EPC/SNFDA foram avaliados os valores da constante  $k_{obs, [NADH]=0}$  em função da variação do pH entre 5 e 8,5. A razão para não se estudar o sistema em valores de pH menores que 5 é devido a restrição quanto a

estabilidade do NADH em valores menores de pH [45] e em valores maiores que 8,5, a estabilidade da sílica é que fica comprometida.

Para melhor visualização dos resultados, a Tabela 22 mostra os parâmetros cinéticos calculados da eletrooxidação do NADH pelo sistema EPC/SNFDA em diferentes pHs.

Tabela 22. Sumário dos parâmetros cinéticos do sistema EPC /SNFDA em diferentes pHs

pH	$\Gamma$ (mol/cm <sup>2</sup> )	$K_M$ (mM)	$\kappa_{obs}$ , M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	$k_{+2}$ , s <sup>-1</sup>	n
5,0	5,7 (± 0,2) 10 <sup>-9</sup>	0,098 ± 0,001	5306 ± 38	0,52 ± 0,01	2,1 ± 0,2
6,0	5,7 (± 0,2) 10 <sup>-9</sup>	0,102 ± 0,001	5392 ± 42	0,55 ± 0,01	1,9 ± 0,2
7,0	5,7 (± 0,2) 10 <sup>-9</sup>	0,104 ± 0,001	5480 ± 45	0,57 ± 0,01	1,9 ± 0,2
7,5	5,7 (± 0,2) 10 <sup>-9</sup>	0,108 ± 0,001	5512 ± 45	0,60 ± 0,01	1,9 ± 0,2
8,0	5,5 (± 0,2) 10 <sup>-9</sup>	0,112 ± 0,002	5549 ± 46	0,62 ± 0,02	1,8 ± 0,2
8,5	5,4 (± 0,2) 10 <sup>-9</sup>	0,113 ± 0,002	5569 ± 47	0,63 ± 0,02	1,8 ± 0,2

Através dos dados da Tabela 22 para o sensor EPC/SNFDA pode-se chegar a algumas conclusões: Observa-se claramente que o  $\kappa_{obs}$  aumenta com o aumento do pH da solução (Figura 49), em contraste com outros sistemas estudados, os quais empregam mediadores de elétron imobilizados, em eletrodos convencionais, no entanto, em concordância com dados de recente publicação [161, 184, 220], com mediadores similares, imobilizados em fosfato de zircônio e sílica gel modificada com óxido de nióbio.

O comportamento de sistemas onde ocorre diminuição da velocidade de reação com o aumento de pH, vem sendo explicado por uma provável perda de estabilidade do mediador.

No entanto, no sistema estudado (EPC/SNFDA), a matriz SN deve exercer um efeito de proteção frente à variação da concentração de H<sup>+</sup>, visto que nenhuma alteração na resposta do potencial formal da FDA adsorvida na faixa de pH de 3 a 8, é observada, podendo esta 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  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , o qual se desloca 30 mV por unidade de pH para valores mais negativos, ou por ambos.

Possivelmente este comportamento é devido ao aumento da diferença de potencial entre o par redox  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  e o mediador adsorvido em função do aumento do pH.

A cobertura da superfície do eletrodo,  $\Gamma$ , com o mediador adsorvido, apresenta valores muito próximos para todo o intervalo de pH estudado. Simultaneamente, observa-se também uma variação na constante global da velocidade da reação, uma vez que  $k_{\text{obs}}$  aumenta com a diminuição da concentração de  $\text{H}^+$ , evidenciando que para o sensor EPC/SNFDA, a quantidade de grupos mediadores é suficientemente alta, não afetando a velocidade da reação, como já demonstrado em outros sistemas estudados na literatura [23, 24].

Já o  $K_{\text{Mapp}}$  apresenta valores mais baixos que sistemas similares [17]. Estes valores baixos de  $K_{\text{M}}$  sugerem grande afinidade do sistema EPC/SNFDA pelo NADH, podendo, talvez, ser melhorado com a adição de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no sistema, conforme verificado em outros estudos [52]. No entanto, para o sistema estudado, o valor de  $K_{\text{Mapp}}$  também aumenta em função do pH (Tabela 22) e este comportamento sugere que o equilíbrio entre o NADH e o mediador é afetado com o aumento do pH, diminuindo a afinidade com o NADH em altos valores de pH. Uma provável explicação para este comportamento é que com a variação do pH da solução poderia haver alteração das cargas na superfície do eletrodo (barreira de cargas) influenciando a formação do complexo NADH/FDA. Embora os valores de  $K_{\text{Mapp}}$  aumente com o pH da solução, a velocidade da reação também aumenta, sugerindo que a dissociação do complexo de transferência de carga torna-se mais fácil quanto maior o pH da solução.

Com relação ao  $k_{+2}$  (constante cinética de dissociação do complexo de transferência de carga), os valores são menores que os apresentados pelo  $k_{\text{obs}}$ , e também estes valores apresentam variações 4,3 vezes maior que  $k_{\text{obs}}$  como função do pH. Estes aspectos sugerem que a etapa de dissociação do complexo de transferência de carga, é a etapa limitante da reação.

Fazendo uma análise global deste mecanismo de reação, levando-se em consideração, a variação das constantes cinéticas em função do pH, podemos concluir que o aumento do pH da solução diminui a afinidade entre a FDA imobilizada sobre SN e o NADH, embora este aumento do pH favoreça a dissociação do complexo de transferência, que é a etapa limitante da reação, e favoreça ainda a termodinâmica da reação, aumentando a diferença de potencial eletroquímico entre o mediador imobilizado e o NADH. Este último aspecto está diretamente relacionado com o comportamento do  $\kappa_{\text{obs}}$  em função do pH.

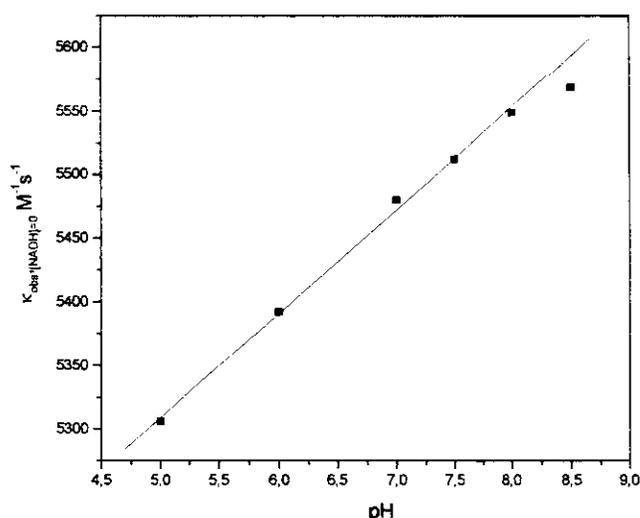


Figura 49. Dependência da constante  $\kappa_{\text{obs}}$  em função do pH da solução tampão fosfato. Experimento usando o EPC/SNFDA

Porém era esperado que os valores de  $\kappa_{\text{obs}}$  em função do pH fossem maiores que os apresentados, ou seja, levando-se em consideração somente os aspectos termodinâmicos da reação, a velocidade global desta reação deveria ser maior, aumentando-se o pH. A explicação para este comportamento de  $\kappa_{\text{obs}}$  em função do pH é, portanto, devido à diminuição da afinidade entre a FDA imobilizada e o NADH com o aumento do Ph, devido à alteração das cargas do meio.

Quanto ao número de elétrons calculado, estes estão concordantes com o esperado para sistemas envolvendo a eletrocatalise de NADH, mediada por compostos orgânicos eletroativos similares a *o*-fenilenodiamina.

Comparado com outros sistemas da literatura, a eletrocatalise do NADH empregando o sensor EPC/SNFDA, foi bastante satisfatória, apresentando alto valor de  $\kappa_{obs}$ .

A comparação dos resultados obtidos com outros sistemas da literatura, exige bom senso químico, uma vez que o mediador está adsorvido somente na superfície da matriz SN, a qual é misturada em uma pasta de carbono. Na verdade os sítios eletroativos estão localizados no material SNFDA, que são bastante porosos, então, considerando estes aspectos, os valores das constantes cinéticas, principalmente o  $K_{Mapp}$ , não podem ser comparados diretamente com outros sistemas.

Comparando com valores previamente publicados para outros sistema mediador-eletrodo, tais como azul de Meldola e azul do Nilo adsorvido sobre SN [220, 184], podemos concluir que o valor de  $\kappa_{obs}$  medido para este sistema (EPC/SNFDA) está entre os maiores registrados até então [223]. Isto abre possibilidades promissoras para aplicações práticas, onde constantes de velocidade altas são indispensáveis, de modo a se trabalhar sob condições limitadas de transporte de massa. Isto poderia conduzir ao desenvolvimento de biossensores amperométricos empregando enzimas NADH dependentes (dehidrogenases), com baixo limite de detecção, um tempo de resposta curto e nenhuma dependência do pH da amostra.

Como informação complementar deste trabalho, é importante mencionar que foram realizados testes imobilizando-se a para-fenilenodiamina e nenhum resultado satisfatório foi obtido provavelmente devido a baixa reatividade deste composto imobilizado.

Finalmente, analisando o trabalho desenvolvido nesta Tese, podemos sugerir como uma proposta futura, com a finalidade de melhorar o desempenho da *o*-fenilenodiamina (FDA) imobilizada, frente à soluções de NADH, a imobilização deste mediador na matriz  $SNP_{sol-gel}$ , sendo esta, a matriz que influenciou de

maneira mais eficaz o comportamento eletroquímico da RF. Além disso, a incorporação de uma enzima de-hidrogenase (NADH dependente) com o objetivo de desenvolver um biossensor, para analitos das mais variadas áreas de aplicação, tais como: ambiental, alimentícia, bebidas, etc, é a principal perspectiva futura deste trabalho.

TESE DE DOUTORADO

**V. CONCLUSÕES GERAIS**

## V. CONCLUSÕES GERAIS

### V.1 Propriedades Eletroquímicas dos Sensores Desenvolvidos

Inicialmente verificou-se que as diferentes matrizes modificadas com óxido de nióbio ou fosfato de nióbio empregadas neste projeto apresentaram-se como matrizes eficazes para o desenvolvimento de sensores à base de pasta de carbono. A modificação da superfície da sílica gel ou do material sol-gel se deu de forma a permitir que quando usados como suportes para adsorção dos mediadores de elétrons, proporcionassem estabilidade de pelo menos 30 dias aos sensores contendo os compostos orgânicos eletroativos RF, FAD e FDA.

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.

Especificamente para a RF, onde empregou-se as quatro matrizes, na imobilização deste composto orgânico, a avaliação do efeito de acidez, área superficial e porosidade, revelou diferenças nas respostas eletroquímicas da RF imobilizada. A acidez da matriz e a maior área superficial do material sol-gel influencia na quantidade de RF imobilizada e no deslocamento de potencial médio, sendo estes dois parâmetros bastante importantes para o emprego destes sistemas como sensores para NADH. A porosidade das matrizes (menor tamanho de poro dos materiais sol-gel) influencia o processo redox da RF tornando a difusão das espécies do eletrólito de suporte a etapa limitante do processo.

Além disso, as matrizes influenciaram a cinética de transferência de elétrons entre este composto e o eletrodo, a qual foi verificada através dos parâmetros cinéticos avaliados.

O deslocamento do potencial formal para valores menos negativos, a minimização do efeito do pH da solução sobre o potencial formal e a separação de picos são importantes características observadas nos eletrodos modificados contendo RF, FAD ou FDA imobilizados nas diferentes matrizes inorgânicas. Associado 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.

## V.2 Propriedades eletroquímicas da RF imobilizada em diferentes concentrações sobre a matriz $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$ e os estudos das propriedades eletrocatalíticas da RF frente ao NADH

A quantidade de RF imobilizada na matriz  $\text{SNP}_{\text{sol-gel}}$  afeta as propriedades eletroquímicas dos diferentes sensores, onde a separação de pico (anódico e catódico) aumenta em função da quantidade de RF imobilizada, provavelmente devido a dificuldade no processo de difusão dos íons do eletrólito de suporte através dos pequenos poros presentes nesta matriz.

No estudo da catálise de NADH, a melhor eficiência da RF imobilizada na matriz sol-gel fosfatada é devida ao grande deslocamento de potencial formal apresentado pela RF imobilizada nesta matriz.

Ainda através destes estudos, empregando a RF imobilizada em diferentes concentrações sobre o material sol-gel fosfatado, o fato da catálise ser mais efetiva nos sensores construídos com menores concentrações de RF indica que provavelmente ocorra melhor distribuição da espécie eletroativa sobre a matriz e conseqüentemente sobre o eletrodo de trabalho, facilitando a difusão do NADH e a transferência de elétrons. Porém, ao mesmo tempo em que a RF nestes sensores está melhor distribuída superficialmente e permite um melhor acesso do NADH ao sítio ativo desta, a quantidade de RF sobre esta matriz é relativamente pequena.

Desta forma, embora o potencial formal da RF imobilizada, tenha sido deslocado para valores mais positivos, este deve ser insuficiente para que a catálise seja efetiva, em menores concentrações de NADH, e ainda, um provável efeito de matriz, pode estar dificultando a interação entre a RF e o NADH, no sentido de dificultar a difusão do NADH. Estes fatores podem explicar o fato da intensidade de corrente catalítica ser baixa mesmo na presença de  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de NADH.

### V.3 Estudos eletrocatalíticos e cinéticos envolvendo a coenzima NADH e o sistema EPC/SNFDA

Os estudos eletrocatalíticos e cinéticos do NADH empregando o sensor desenvolvido com a *o*-fenilenodiamina (FDA) comprovaram a grande eficiência desta diamina em mediar a transferência de elétrons envolvendo a molécula de NADH. A pasta de carbono juntamente com a matriz 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, utilizado nos estudos cinéticos.

A partir dos sensores desenvolvidos foi possível operar a célula eletroquímica, durante a eletrooxidação do NADH, aplicando potencial de -50 mV vs ECS para o sensor EPC/SNFDA, o que amplia bastante a possibilidade de aplicação deste sensor em amostras complexas, pois nestes potenciais o sensor torna-se muito menos susceptível à possíveis interferentes.

A avaliação dos parâmetros analíticos deste sensor mostrou que o mesmo é um ótimo dispositivo para a determinação de NADH, com ampla faixa de resposta linear,  $0,4 \cdot 10^{-4}$  a  $8,0 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Destaque deve ser dado a alta estabilidade deste sensor, onde não foi observada qualquer diminuição do nível de corrente mesmo após várias horas de uso. Com este mesmo sensor é possível realizar mais de 300 determinações com desvio padrão relativo inferior a 3 %.

Desta forma o sensor desenvolvido comprova que a utilização de mediadores de elétrons com estruturas aromáticas, tais como: fenilenodiaminas, fenoxazinas ou fenotiazinas, adsorvidos numa matriz adequada, como a sílica gel modificada com óxido de nióbio, apresentam-se como sistemas eficazes na determinação de NADH com ótimas perspectivas de desenvolvimento de biossensores NADH dependentes.

Quanto aos estudos cinéticos, estes indicaram para a formação de um complexo de transferência de carga, CT-complexo, entre o mediador e o NADH, o

qual foi possível constatar pela correlação (dependência) dos valores de  $k_{obs}$  em função da concentração de NADH na solução.

A avaliação da cobertura da superfície do eletrodo com o mediador adsorvido,  $\Gamma$ , 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 fenilenodiaminas são usadas como mediadores de elétrons.

O  $k_{obs,[NADH] \rightarrow 0}$  aumenta no sistema com o aumento do pH da solução e 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 da FDA imobilizada na matriz SN praticamente não era afetado nesta faixa de pH.

Quanto aos valores de  $K_{Mapp}$  estes são menores quando comparados à sistemas similares. Estes valores sugerem grande afinidade do mediador na eletrooxidação do NADH., porém esta afinidade era diminuída em função do pH.

Com relação ao  $k_{+2}$  (constante cinética de dissociação do complexo de transferência de carga), os valores são menores que os apresentados pelo  $k_{obs}$ , e além disso, estes valores apresentam variações 4,3 vezes maior que  $k_{obs}$  como uma função do pH. Estes aspectos sugerem que a etapa de dissociação do complexo de transferência de carga, é a etapa limitante da reação.

Uma análise global deste mecanismo de reação, levando-se em consideração, a variação das constantes cinéticas em função do pH, permitiu concluir que o aumento do pH da solução diminui a afinidade entre a FDA imobilizada sobre SN e o NADH, e este fato pode explicar a não observação de valores maiores de  $k_{obs}$  em função do pH levando-se em consideração somente os aspectos termodinâmicos da reação.

Os estudos eletrocatalíticos e cinéticos do NADH comprovaram a grande eficiência do composto orgânico FDA em mediar a transferência de elétrons envolvendo a molécula de NADH. A pasta de carbono juntamente com a matriz SN formam um ótimo sistema para o desenvolvimento de sensores para NADH.

TESE DE DOUTORADO

**VI. REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abel, P.U.; Von, W.T.; *Biosens. Bioelectron.*, 17 (2002) 1059.
2. Kara, P.; Kerman, K.; Ozkan, D.; Meric, B.; Erdem, A.; Ozkan, Z.; Ozsoz, M.; *Electrochem. Commun.*, 4 (2002) 705.
3. Zayats, M.; Raitman, O.A.; Chegel, V.I.; Kharitonoy, A.B.; Willner, I.; *Anal. Chem.*, 74 (2002) 4763.
4. Wang, J.; *Acc. Chem. Res.*, 35 (2002) 811.
5. Marazuela, M.D.; Moreno-Bondi, M.C.; *Anal. Bioanal. Chem.*, 372 (2002) 664.
6. Lund, H.; *J. Electrochem. Soc.*, 149 (2002) S21.
7. Xu, F.; Wang, L.; Gao, M.N.; Jin, L.T.; Jin, J.Y.; *Talanta*, 57 (2002) 365.
8. Pravda, M.; O'Halloran, M.P.; Kreuzer, M.P.; Guilbault, G.G.; *Anal. Lett.*, 35 (2002) 959.
9. Rodriguez, P.; Lobo, M.J.; Miranda, A.J.; Tuñón, P.; *Anal. Biochem.*, 308 (2002) 195.
10. Chaubey, A.; Malhotra, B.D.; *Biosens. Bioelectron.*, 17 (2002) 441.
11. Moser, I.; Jobst, G.; Urban, G.A.; *Biosens. Bioelectron.*, 17 (2002) 297.
12. Nistor, C.; Rose, A.; Wollenberger, U.; Pfeiffer, D.; Emmeus, J.; *Analyst*, 127 (2002) 1076.
13. Riccardi, C.S.; Costa, P.I.; Yamanaka, H.; *Quim. Nova*, 25 (2002) 316.
14. Skladal, P.; Morozova, N.O.; Reshetilov, A.N.; *Biosens. Bioelectron.*, 17 (2002) 867.
15. Miscoria, S.A.; Barrera, G.D.; Rivas, G.A.; *Electroanalysis*, 14 (2002) 981.
16. Gibson, T.D.; *Analisis*, 27 (1999) 630.
17. Gorton, L.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, 82 (1986) 1245.
18. Ravichandram, K.; Baldwin, R. P.; *Anal. Chem.*, 55 (1983) 1586.
19. Jaegfeldt, H.; Torstensson, A.; Gorton, L.; Tohansson, G.; *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1979.
20. Matsue, T.; Suda, M.; Uchida, I.; Kato, T.; Osa, T.; *J. Electroanal. Chem.*, 234 (1987) 163.
21. Hajizadeh, K.; Tang, H. T.; Halsall, H. B.; Heinemann, W. R.; *Anal. Lett.*, 24 (1991) 1453.
22. Torstesson, A.; Gorton, L.; *J. Electroanal. Chem.*, 130 (1981) 199.
23. Gorton, L.; Torstensson, A.; Jaegfeldt, H.; Johansson, G.; *J. Electroanal. Chem.*, 161 (1984) 103.
24. Persson, B.; Gorton, L.; *J. Electroanal. Chem.*, 292 (1990) 115.
25. Persson, B.; *J. Electroanal. Chem.*, 287 (1990) 61.
26. Raj, C. R.; Gobi, K. V.; Ohsaka, T.; *Bioelectrochem.*, 51 (2000) 181.
27. Albery, W. J.; Bartlett, P. N.; Cass, E. G. A.; Sim, K. W.; *J. Electroanal. Chem.*, 218 (1987) 127.
28. Gorton, L.; Csöregi, E.; Domínguez, E.; Emnéus, J.; Jhönsson-Pettersson, G.; Marko-Varga, G.; Persson, B.; *Anal. Chim. Acta*, 250 (1991) 203.
29. Gatti, D. L.; Palfey, B. A.; Lah, M. S.; Entsch, B.; Massey, V.; Ballou, P. D.; Ludwig, M. L.; *Science*, 266 (1994) 110.

30. Schreuder, H. A.; Mattevi, A.; Obmolova, G.; Kalk, K. H.; Hol, W. G. J.; Van der Bolt, F. J. T.; Van der Berkel, W. J. H.; *Biochem.*, 33 (1994) 10161.
31. Brett, A. M. O.; Brett, C. M. A.; *Electroquímica princípios, métodos e aplicações*, 3<sup>a</sup> ed. Oxford, Oxford University Press, (1996) 198.
32. Bruice, T. C.; *Acc. Chem. Res.*, 13 (1980) 256.
33. Bruice, T. C.; *In Flavins and Flavoproteins*; Bray, R. C.; Engel, P. C.; Mayhew, S. E., eds.; Walter De Gruyter and Co.: New York, (1984) 45.
34. Massey, V.; *FASEB*, J9 (1995) 473.
35. Schmidt, H.-L.; Schuhmann, W.; *Biosens. Bioelectron.*, 11 (1996) 127.
36. Bartlett, P. N.; Tebbutt, P.; Whitaker, R. G.; *Prog. React. Kinet.*, 16 (1991) 56.
37. Hemmerich, P.; Veeger, C.; Wood, H. C. S.; *Angew. Chem. Int. Edit.*, 4 (1965) 671.
38. Yamashita, M.; Rosatto, S. S.; Kubota, L. T.; *J. Braz. Chem. Soc.*, 13 (2002) 635.
39. Birss, V. I.; Guha-Thakurta, S.; McGarvey, C. E.; Quach, S.; Vanýsek, P.; *J. Electroanal. Chem.*, 423 (1997) 13.
40. Narasimhan, K.; Wingard, L. B.; *J. Mol. Catal.*, 34 (1986) 263.
41. Friedman, R.M.; *J. Electroanal. Chem.*, 472 147 (1999)
42. Malinauskas, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 49 (1999) 21.
43. Cosnier, S.; Fontecave, M.; Limosin, D.; Nivière, V.; *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3095.
44. Gergel, A.; Comtat, M.; *J. Electroanal. Chem.*, 302 (1991) 219.
45. Chenault, H. K.; Whitesides, G. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 14 (1987) 147.
46. Bruice, T. C.; *Acc. Chem. Res.*, 13 (1980) 256.
47. Kay, C. J.; Barber, M. J.; *J. Biol. Chem.*, 261 (1986) 14125.
48. Massey, V.; Hemmerich, P.; *Biochem.*, 17 (1978) 664.
49. Dixon, M.; *Biochim. Biophys. Acta*, 2261 (1971) 269.
50. Maedayorita, K.; Russell, G. C.; Guest, J. R.; Massey, V.; Williams, C. H.; *Biochem.*, 30 (1991) 11788.
51. Kubota, L. T.; Gorton, L.; *Electroanalysis*, 11 (1999) 719.
52. Kubota, L. T.; Gorton, L.; *J. Solid State Electrochem.*, 3 (1999) 370.
53. Kubota, L. T.; Munteanu, F.; Roddick-Lanzilotta, A.; McQuillan, A. J.; Gorton, L.; *Quim. Anal.*, 19 (2000) 15.
54. Gorton, L.; Johansson, G.; *J. Electroanal. Chem.*, 113 (1980) 151.
55. Durfor, C. N.; Yenser, B. A.; Bowers, M. L.; *J. Electroanal. Chem.*, 244 (1988) 287.
56. Edwards, T. R. G.; Cunnane, V. J.; Parsons, R.; Gani, D.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (15) (1989) 1041.
57. Ueyama, S.; Isoda, S.; Maeda, M.; *J. Electroanal. Chem.*, 264 (1989) 149.
58. Kubota, L. T.; Gorton, L.; Roddick-Lanzilotta, A.; McQuillan, A. J.; *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 47 (1998) 39.
59. Zaitseva, G.; Gushikem, Y.; Ribeiro, S.; Rosatto, S. S.; *Electrochim. Acta*, 47 (2002) 1469.
60. Schiavo, D. A.; Perez, E. F.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova*, 23 (2000) 832.
61. Gushikem, Y.; Rosatto, S. S.; *J. Braz. Chem. Soc.*, 6 (2001) 695.
62. Moses, P.R.; Wier, P.; Murray, R.W.; *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1882.

63. Katz, E.; Lotzbeyer, T.; Schlereth, D. D.; Schuhmann, W.; Schmidt, H-L.; *J. Electroanal. Chem.*, 373 (1994) 189.
64. Persson, B.; *J. Electroanal. Chem.*, 287 (1990) 61.
65. Wilkins, E.; Atanasov, P.; *Med. Eng. Phys.*, 18 (1996) 273.
66. Siggaard-Anderser, O.; Gothgen, I. H.; Fogh-Anderser, N.; *Acta Anaesth. Scand.*, 39 (1995) 7.
67. Turner, A. P. F.; *Acta Anaesth. Scand.*, 39 (1995) 15.
68. Udomsopagit, S.; Suphantharika, M.; Kunnecke, W.; Bilitewski, U.; Bhumiratana, A.; *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 14 (1998) 543.
69. Fernandes, J. C. B.; Oliveira Neto, G.; Rohwedder, J. J. R.; Kubota, L. T.; *J. Braz. Chem. Soc.*, 11 (2000) 349.
70. Torres, K. Y. C.; Garcia, C. A. B.; Fernandes, J. C. B.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T.; *Talanta*, 53 (2001) 807.
71. Lobo, M.J.; Miranda, A.J.; Tuñón, P.; *Electroanalysis*, 9 (1997) 191.
72. Moscone, D.; Pasini, M.; Mascini, M.; *Talanta*, 39 (1992) 1039.
73. Gilligan, B. J.; Shults, M. C.; Rhodes, R. K.; Updike, S. J.; *Diabetes Care*, 17 (1994) 881.
74. Feeney, R.; Kounaves, S. P.; *Electroanalysis*, 12 (2000) 677.
75. Shram, N. F.; Netchiporouk, L. I.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N.; Bonnet, C.; Cespuglio, R.; *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2618.
76. McRipley, M. A.; Linsenmeier, R. A.; *J. Electroanal. Chem.*, 414 (1996) 235.
77. Macha, S. S.; Fitch, A.; *Mikrochim. Acta*, 128 (1998) 1.
78. Mattos, I. L.; Gorton, L.; *Quim. Nova*, 24 (2001) 200.
79. La-Scalea, M. A.; Serrano, S. H. P.; Gutz, I. G. R.; *Quim. Nova*, 22 (1999) 417.
80. Weetall, H. H.; *Biosens. Bioelectron.*, 14 (1997) 237.
81. Labuda, J.; *Selec. Electr. Rev.*, 14 (1992) 33.
82. Alegret, S.; *Analyst*, 121 (1996) 1751.
83. Martorell, D.; Céspedes, F.; Martínez-Fàbregas, E.; Alegret, S.; *Anal. Chim. Acta*, 290 (1994) 343.
84. Céspedes, F.; Martínez-Fàbregas, E.; Alegret, S.; *Anal. Chim. Acta*, 284 (1993) 21.
85. Gorton, L.; *Electroanalysis*, 7 (1995) 23.
86. Vansant, E. F.; Van der Voort, P.; Vrancken, K. C.; *Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface*, Elsevier, Amsterdam, 1995.
87. Sjöberg, S.; *J. Non-Cryst. Solids*, 196 (1996) 51.
88. Rocha, R. F.; Rosatto, S. S.; Bruns, R. E.; Kubota, L. T.; *J. Electroanal. Chem.*, 433 (1997) 73.
89. Perez, E. F.; Kubota, L. T.; Tanaka, A. A.; Oliveira Neto, G.; *Electrochim. Acta*, 43 (1998) 1665.
90. Brinker, C. J.; Scherer, G. W.; *Sol-Gel Science – The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press Inc., San Diego, (1990).
91. Li, J.; Tan, S. N.; Oh, J. T.; *Electroanal. Chem.*, 448 (1998) 69.
92. Li, J.; Chia, S.; Goh, N. K.; Tan, S. N.; *Anal. Chim. Acta*, 362 (1998) 203.
93. Miller, J. B.; Ko, E. I.; *J. Catal.*, 159 (1996) 58.
94. Wang, S. W.; Guo, J. K.; Huang, X. X.; Li, B. S.; *Mater. Lett.*, 25 (1995) 151.
95. Song, C. J.; Villemure, G.; *Microporous Mesoporous Mater.*, 44 (2001) 679.
96. Dryfe, R. A. W.; Holme, S. M.; *J. Electroanal. Chem*, 4830 (2000) 144.

97. Creasy, K. E.; Shaw, B. R.; *Electrochim. Acta*, 33 (1988) 551.
98. Demertzis, M.; Evmiridis, N. P.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 82 (1986) 3647.
99. Matysik, S.; Matysik, F-M.; Mattusch, J.; Einicke, W-D.; *Electroanalysis*, 10 (1998) 98.
100. Baker, M. D.; Senaratne, C.; *Anal. Chem.*, 64 (1992) 697.
101. Baker, M. D.; Senaratne, C.; Zhang, J.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 88 (1992) 3187.
102. Senaratne, C.; Baker, M. D.; *J. Phys. Chem.*, 98 (1994) 13687.
103. Wang, J.; Walcarius, A.; *J. Electroanal. Chem.*, 404 (1996) 237.
104. Liu, B. H.; Hu, R. Q.; Deng, J. Q.; *Anal. Chem.*, 69 (1997) 2343.
105. Liu, B. H.; Hu, R. Q.; Liu, H. Y.; Deng, J. Q.; *Acta Chim. Sinica*, 56 (1998) 682.
106. Guerra, S. V.; Xavier, C. R.; Nakagaki, S.; Kubota, L. T.; *Electroanalysis*, 10 (1998) 462.
107. Kotte, H.; Grundig, B.; Vorlop, K-D.; Strehlitz, B.; Stottmeister, U.; *Anal. Chem.*, 67 (1995) 65.
108. Wang, J.; Walcarius, A.; *J. Electroanal. Chem.*, 407 (1996) 183.
109. Gothelf, K.V.; *J. Electroanal. Chem.*, 494 (2000) 147.
110. Finot, M.O.; McDermott, M.T.; *J. Electroanal. Chem.*, 488 (2000) 125.
111. Nelson, A.; *Langmuir*, 12 (1996) 2058.
112. Pereira, A. C.; Santos, A. S.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova*, 25 (2002) 1012.
113. Song, F-Y.; Shiu, K-K.; *J. Electroanal. Chem.*, 498 (2001) 161.
114. Ijeri, V. S.; Srivastaka, A. K.; *Anal. Sci.*, 17 (2001) 605.
115. Bi, S. P.; Chen, G.; Liu, J.; Zou, G. W.; Gan, N.; *Acta Chim. Sinica*, 58 (2000) 494.
116. Borgo, C. A.; Ferrari, R. T.; Colpini, L. M. S.; Costa, C. M. M.; Baesso, M. L.; Bento, A. C.; *Anal. Chim. Acta*, 385 (1999) 103.
117. Liu, Y. C.; Hwang, B. J.; Tzeng, I. J.; *J. Electroanal. Chem.*, 533 (2002) 85.
118. Murimboh, J.; Lam, M. T.; Hassan, N. M.; Chakrabarti, C. L.; *Anal Chim. Acta*, 423 (2000) 115.
119. Sotomayor, M. D. P.; Tanaka, A. A.; Kubota, L. T.; *J. Electroanal. Chem.*, 536 (2002) 71.
120. Katakis, I.; Dominguez, E.; *Mikrochim. Acta*, 126 (1997) 11.
121. Gorton, L.; Dominguez, E.; *Electroanalysis, Reviews in Molecular Biotechnology*, 82 (2002) 371.
122. Eggins, B. R.; *Biosensors : An introduction*, John Wiley & Sons, New York (1999).
123. Thangamuthu, R.; Pillai, K.C.; *Bull. Electrochem.*, 15 (1999) 481.
124. Malinauskas, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; *J. Colloid Interf. Sci.*, 224 (2000) 325.
125. Pournaghi-Azar, M.H.; Ojan, R.; *J. Sol. State Electrochem.*, 4 (2000) 75.
126. Perez, E. F.; Oliveira Neto, G.; Tanaka, A. A.; Kubota, L. T.; *Electroanalysis*, 10 (1998) 111.
127. Peixoto, C. R. M.; Gushikem, Y.; Kubota, L. T.; *Anal. Proc.*, 32 (1995) 503.
128. Florou, A. B.; Prodomidis, M. I.; Tzouwara-Karayanni, S. M.; *Talanta*, 52 (2000) 465.
129. Sun, W. L.; Kong, J. L.; Deng, J. Q.; *Anal. Lett.*, 29 (1996) 2425.

130. Sun, W. L.; Kong, J. L.; Deng, J. Q.; *Electroanalysis*, 9 (1997) 115.
131. Scouten, W. H.; Luong, J. H. T.; Brown, R. S.; *Tibtech*, 13 (1995) 178.
132. Duffy, P.; Saad, I.; Wallach, J. M.; *Anal. Chim. Acta*, 2 (1988) 267.
133. Samec, Z.; Elving, P. J.; *J. Electroanal. Chem.*, 144 (1983) 217.
134. Sled, V. D.; Rudnitzky, N. I.; Hatefi, Y.; Ohnishi, T.; *Biochem.*, 33 (1994) 10069.
135. Lu, Y.; Zhao, Y. X.; Handoo, K. L.; Parker, V. D.; *Org. Biomol. Chem.*, 1 (2003) 173.
136. Kitani, A.; Miller, L. L.; *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 3595.
137. Kitani, A.; So, Y.-H.; Miller, L. L.; *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 7636.
138. Chi, Q.-J.; Dong, S.-J.; *J. Mol. Catal. A: Chemical*, 105 (1996) 193.
139. Blaedel, W. J.; Jenkins, R. A.; *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1337.
140. Burnett, J. N.; Underwood, A. L.; *Biochem.*, 4 (1965) 2060.
141. Blaedel, W. J.; Haas, R. G.; *Anal. Chem.*, 42 (1970) 918.
142. Moiroux, J.; Elving, P.; *J. Anal. Chem.*, 51 (1979) 346.
143. Elving, P. J.; Bresnahan, W. T.; Moiroux, J.; Samec, Z.; *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 9 (1982) 365.
144. Blankespoor, R. J.; Miller, L. L.; *J. Electroanal. Chem.*, 171 (1984) 231.
145. Jaegfeldt, H.; *J. Electroanal. Chem.*, 110 (1980) 295.
146. Ludvík, J.; Volke, J.; *Anal. Chim. Acta*, 209 (1988) 69.
147. Grodkowski, J.; Neta, P.; Carlson, M. W.; Miller, L.; *J. Phys. Chem.*, 87 (1983) 3135.
148. Bresnahan, W. T.; Elving, P. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 2379.
149. Jensen, M. A.; Elving, P. J.; *Biochim. Biophys. Acta*, 764 (1984) 310.
150. Cunningham, A. J.; Underwood, A. L.; *Biochem.*, 6 (1967) 266.
151. Jaegfeldt, H.; Torstensson, A.; Johansson, G.; *Anal. Chim. Acta*, 97 (1978) 221.
152. Guilbault, G. G.; *Handbook of enzymatic methods of analysis*, Marcel Dekker, New York, (1976), 4.
153. Tse, D. C.-S.; Kuwana, T.; *Anal. Chem.*, 50 (1978) 1315.
154. Bartlett, P. N.; Simon, E.; Toh, C. S.; *Bioelectrochem.*, 56 (2002) 117.
155. Ohtani, M.; Kuwabata, S.; Yoneyama, H.; *J. Electroanal. Chem.*, 422 (1997) 45.
156. Downard, A. J.; *Electroanalysis*, 12 (2000) 1085.
157. Cai, C.-X.; Xue, K.-H.; *Talanta*, 47 (1998) 1107.
158. Cai, C.-X.; Xue, K.-H.; *J. Electroanal. Chem.*, 427 (1997) 147.
159. Pessoa, C. A.; Gushikem, Y.; Kubota, L. T.; Gorton, L.; *J. Electroanal. Chem.*, 431 (1997) 23.
160. Gorton, L.; Johansson, G.; *J. Electroanal. Chem.*, 113 (1980) 151.
161. Munteanu, F. D.; Kubota, L. T.; Gorton, L.; *J. Electroanal. Chem.*, 509 (2001) 2.
162. Hiraku, Y.; Kawanishi, S.; *FEBS Lett.*, 393 (1996) 317.
163. Willner, I.; Arad, G.; Katz, E.; *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 44 (1998) 209.
164. Laurinavicius, V.; Kurtinaitiene, B.; Liauksminas, V.; Puodziunaite, B.; Janciene, R.; Kosychova, L.; Meskys, R.; *Monatsh. Chem.*, 130 (1999) 1269.
165. Pogorelova, S. P.; Zayats, M.; Kharitonov, A. B.; Katz, E.; Willner, I.; *Sens. Actuat. B-Chemical*, 89 (2003) 40.

166. Duine, J. A.; Frank, J.; van Zeeland, J. K.; *Biochim. Biophys. Acta*, 524 (1978) 277.
167. Duine, J. A.; Frank, J.; Verwiel, P. E. J.; *Eur. J. Biochem.*, 108 (1980) 187.
168. Duine, J. A.; *Eur. J. Biochem.*, 200 (1991) 271.
169. Katz, E.; Heleg-Shabtai, V.; Willner, B.; Willner, I.; Bückmann, A. F.; *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 42 (1997) 95.
170. Katz, E.; Willner, I.; *J. Electroanal. Chem.*, 418 (1996) 67.
171. Willner, I.; Katz, E.; Patolsky, F.; Bückmann, A. F.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2 (1998) 1817.
172. Pariente, F.; Lorenzo, E.; Tobalina, F.; Abruña, H. D.; *Anal. Chem.*, 67 (1997) 3936.
173. Cai, C-X.; Xue, K-H.; *Microchemical J.*, 64 (2000) 131.
174. Denofre, S.; Gushikem, Y.; Davanzo, C. U.; *Eur. J. Solid. State Inorg. Chem.*, 28 (1991) 1295.
175. Rosatto, S.S.; Sotomayor, P.T.; Kubota, L.T.; Gushikem, Y.; *Electrochim. Acta*, 47 (2002) 4451.
176. Pereira, A. C.; Santos, A. S.; Kubota, L. T.; *J. Colloid Interf. Sci.*, no prelo.
177. Santos, A. S.; Pereira, A. C.; Kubota, L. T.; *J. Braz. Chem. Soc.*, 13 (2002) 495.
178. Ni, F.; Feng, H.; Gorton, L.; Cotton, T. M.; *Langmuir*, 6 (1990) 66.
179. Nagy, G.; Kapui, I.; Gorton, L.; *Anal. Chim. Acta*, 305 (1995) 65.
180. Dominguez, E.; Lan, H. L.; Okamoto, Y.; Hale, P. D.; Skotheim, T. A.; Gorton, L.; Hahnagerdal, B.; *Biosens. Bioelectron.*, 8 (1993) 229.
181. De Lucca, A. R.; Santos, A. S.; Pereira, A. C.; Kubota, L. T.; *J. Colloid Interf. Sci.*, 254 (2002) 113.
182. Cosnier, S.; Décout, J-L.; Fontecave, M.; Frier, C.; Innocent, C.; *Electroanalysis*, 10 (1998) 521
183. Ogino, Y.; Takagi, K.; Kano, K.; Iketa, T.; *J. Electroanal. Chem.*, 396 (1995) 517
184. Santos, A. S.; Gorton, L.; Kubota, L. T.; *Electrochim. Acta*, 47 (2002) 3351.
185. Coche-Guerente, L.; Cosnier, S.; Innocent, C.; Mailley, P.; *Anal. Chim. Acta*, 311(1995) 23.
186. Coche-Guerente, L.; Deronzier, A.; Mailley, P.; Moutet, J. C.; *Anal. Chim. Acta*, 289 (1994) 143
187. Gorton, L.; Persson, B.; Hale, P. D.; Boguslavsky, L. I.; Karan, H. I.; Lee, H. S.; Skotheim, T. A.; Lan, H. I.; Okamoto, Y.; *Biosensors and Chemical Sensors-Optimizing Performance Through Materials*, ACS Symp. Ser., Vol. 487, Eds. Edelman, P. G., Wang, J. O., (1992) 55.
188. Kalcher, K.; Kauffmann, J. M.; Wang, J.; Svancara, I.; Vytras, K.; Neuhold, C.; Yang, Z.; *Electroanalysis*, 7 (1995) 5.
189. Mullor, S. G.; Sánchez-Cabezudo, M.; Ordieres, A. J. M.; Ruiz, B. L.; *Talanta*, 43 (1996) 779.
190. Gorton, L.; Karan, H. I.; Hale, P. D.; Inagaki, T.; Okamoto, Y.; Skotheim, T. A.; *Anal. Chim. Acta*, 228 (1990) 23.
191. Palecek, E.; *Electroanalysis*, 8 (1996) 7
192. Kubota, L. T.; Gushikem, Y.; Perez, J.; Tanaka, A. A.; *Langmuir*, 11, (1995) 1009.

193. Rolison, D. R.; *Chem. Rev.*, 90 (1990) 867.
194. Alfaya, A. A. S.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova*, 25 (2002) 835.
195. Durrani, A. A.; Garrett, A.; Johnson, R. A.; Sood, S. K.; Tyman, J. H. P.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 25 (2002) 1543.
196. Mahmoud, M. E.; Al Saadi, M. S. M.; *Anal. Chim. Acta*, 450 (2001) 239.
197. Walcarius, A.; *Electroanalysis*, 10 (1998) 18.
198. Dyer, A.; Shaheen, T.; Zamin, M.; *J. Mater. Chem.*, 7 (1997) 1895.
199. Larssen, E. M.; Vissers, D. L.; *J. Phys. Chem.*, 229 (1960) 160.
200. Zamin, M.; Shaheen, T.; Dyer, A.; *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 182 (1994) 345.
201. Kubota, L. T.; Gorton, L.; *Electroanalysis*, 11 (1999) 10.
202. Neto, B. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Planejamento e otimização de experimentos*, 2ª edição – Editora da Unicamp – (1996).
203. Murray, R. W.; *Chemically modified electrodes*. In: Bard, A. J. (Ed.), *Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 13 (1984) 191.
204. Kubota, L. T.; Milagres, B. G.; Gouvea, F.; Oliveira Neto, G.; *Anal. Lett.*, 29 (1996) 893.
205. Laviron, E.; *J. Electroanal. Chem.*, 52 (1974) 355.
206. Laviron, E.; in *Electroanalytical Chemistry*, ed. Bard, A. J.; Dekker, New York, 12 (1982) 53.
207. Honeychurch, M.J.; Rechnitz, G.A.; *Electroanalysis*, 10 (1998) 285.
208. Kzenzhek, O. S.; Petrova, S.A.; *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 11 (1983) 105.
209. Dryhurst, G.; *Electrochemistry of biological molecules*, Academic Press, London, (1977) 365.
210. Dryhurst, G.; Kadish, K. M.; Scheller, F.; Renneberg, R.; *Biological Electrochemistry*, Vol. 1, Academic Press, New York (1982).
211. Laviron, E.; *J. Electroanal. Chem.*, 101 (1979) 19.
212. Shinohara, H.; Gratzel, M.; Vlachopoulos, N.; Aizawa, M.; *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 26 (1991), 307
213. Nishida, H.; Inaka, K.; Miki, K.; *FEBS Lett.*, 361(1995) 97
214. Bremle, G.; Persson, B.; Gorton, L.; *Electroanalysis*, 3 (1991) 77
215. Braun, S.; Rappoport, S.; Zusman, R.; Avnir, D.; Ottolenghi, M.; in *Biotechnology: Bridging Research and Applications* (Eds: Kamely, D., Chakrabarty, A., Kornguth, S.E.) Kluwer Academic, Boston (1990) 205.
216. Shtelzer, S.; Braun, S.; *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 19 (1994) 293.
217. Pessoa, C. A.; Gushikem, Y.; Kubota, L. T.; *Electroanalysis*, 9 1997 800.
218. Rover Júnior, L.; Fernandes, J. C. B.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T.; Katekawa, E.; Serrano, S. H. P.; *Anal. Biochem.*, 260 (1998) 50.
219. Malinauskas, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; *J. Electroanal. Chem.*, 484 (2000) 55.
220. Santos, A. S.; Gorton, L.; Kubota, L. T.; *Electroanalysis*, 14 (2002) 805.
221. Lobo, M. J.; Miranda, A. J.; López-Fonseca, J. M.; Tuñón, P.; *Anal. Chim. Acta*, 325 (1996) 33.
222. Bard, A. J.; Faulker, L. R.; “ *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*” Wiley, New York, (1980).
223. Gorton, L.; Domínguez, E.; *Encyclopedia of Electrochemistry*, (Eds. Bard, A.J., Stratmann, M.), Vol. 9, *Bioelectrochem.*, Wiley-VCH, (2002).

TESE DE DOUTORADO

**VII. ANEXO**

## VII. ANEXO

### VII. 1. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### VII.1.1 SISTEMA EPC/SNFAD

##### VII.1.1.1. Caracterização da FAD imobilizada sobre a matriz

A quantidade de FAD adsorvida na superfície da matriz SN obtida por análise elementar apresentou o resultado de cerca de 20  $\mu\text{mol}$  de FAD por grama de sílica. Este resultado comparado ao obtido para o sistema SNRF (27  $\mu\text{mol}$  de RF por grama de sílica) mostra que a FAD adsorveu menos que a RF sobre a superfície da SN e estes resultados demonstram que provavelmente a quantidade de flavina imobilizada sobre a matriz está relacionada com o tamanho da estrutura, ou seja, quanto maior a estrutura menor a quantidade adsorvida.

##### VII.1.1.2. Estudos Eletroquímicos

Estudos eletroquímicos sugerem que as flavinas (riboflavina, FMN e FAD) apresentam comportamento eletroquímico semelhante e sofrem processo redox reversível envolvendo 2 prótons e 2 elétrons. A parte reativa das flavinas está localizada no anel aloxazina apresentada na Figura 1.

No presente trabalho, imobilizou-se FAD sobre a superfície da sílica gel previamente modificada com óxido de nióbio (SN). A Figura 2, mostra o voltamograma cíclico obtido com o eletrodo de pasta de carbono contendo a matriz na ausência de FAD (A). Observa-se neste caso a ausência de picos redox na região de potenciais entre -400 e -150 mV. No entanto, na presença de FAD adsorvida sobre a matriz é possível observar um par de picos redox bem definidos, sendo o pico anódico em -270 mV e o pico catódico em -313 mV (B). Desta forma o potencial formal da FAD adsorvida sobre SN é de -290 mV.

Na Figura 3 é possível observar que após sucessivos ciclos de varredura de potencial nas mesmas condições citadas anteriormente, não houve queda da intensidade de corrente de pico e nem deslocamento do potencial médio, o que

indica uma elevada estabilidade à FAD immobilizada sobre a matriz, sugerindo que a mesma está fortemente adsorvida sobre a mesma.

Após a verificação da estabilidade da FAD immobilizada sobre a matriz **SN**, na etapa seguinte partiu-se para a caracterização eletroquímica do sistema EPC/SNFAD.

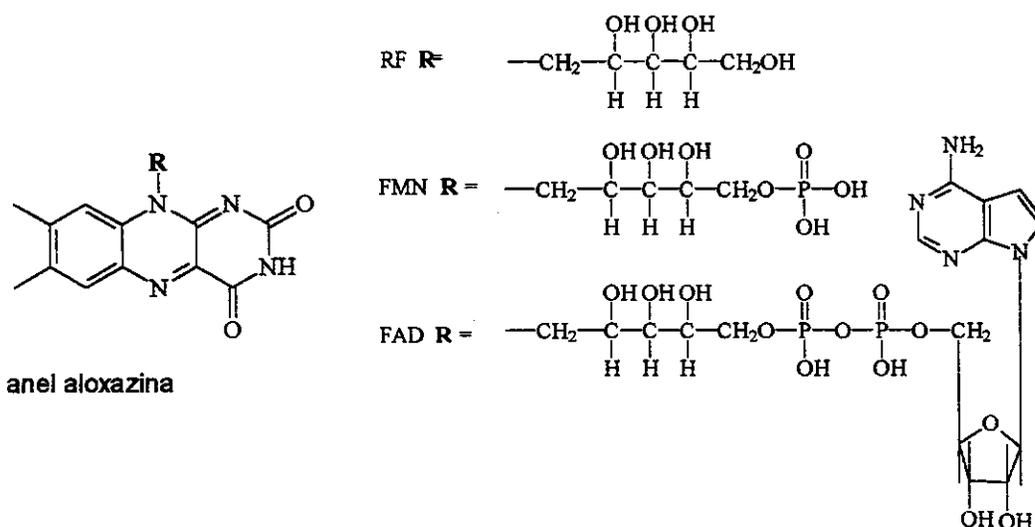


Figura 1. Representação esquemática das estruturas químicas das flavinas. Riboflavina (RF), flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD)

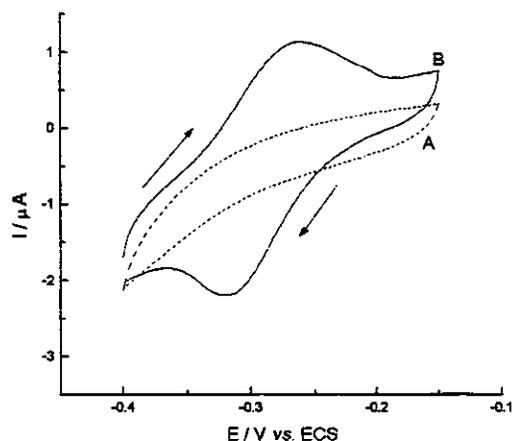


Figura 2. Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com SN (A) e SNFAD (B) a  $20 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

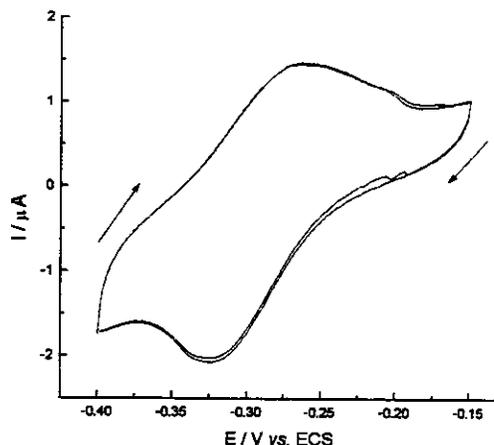


Figura 3. Voltamogramas cíclicos sucessivos ( $10^{\circ}$  e  $100^{\circ}$  ciclos) obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFAD 60% (m/m) a  $20 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

Desta forma, nesta etapa da caracterização eletroquímica do sistema, partiu-se para o estudo da influência da natureza de cátions e ânions nos valores da separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e potencial formal ( $E^{\circ}$ ) da FAD imobilizada sobre a sílica gel modificada com óxido de nióbio (SN). Nota-se neste estudo um deslocamento do  $E^{\circ}$  em aproximadamente 170 mV para valores mais positivos que o  $E^{\circ}$  da FAD em solução, assim como ocorreu com o sistema EPC/SNRF.

Na Tabela 1 é possível observar que os diferentes cátions estudados não afetam significativamente a resposta da espécie eletroativa. A separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e potencial formal ( $E^{\circ}$ ) para todos os eletrólitos investigados foram quase os mesmos. Provavelmente, os eletrólitos de suporte não interagem de uma forma forte com a matriz e não afeta a FAD adsorvida sobre SN. Para este sistema (EPC/FAD) existe um pequeno efeito observado para íons  $\text{Ca}^{2+}$ , os quais conduzem a um deslocamento do potencial médio para valores menos negativos, sugerindo uma interação entre  $\text{Ca}^{2+}$  e a FAD, estabilizando a forma reduzida da espécie eletroativa. Provavelmente isto é provocado pela retirada de densidade eletrônica da RF pelo íon cálcio carregado positivamente.

Outra interação que poderia estar havendo seria a interação entre os diferentes cátions estudados com os grupos fosfatos presentes na estrutura da FAD, no entanto, estes grupos provavelmente encontram-se afastados do sítio

ativo (anel aloxazina), e portanto, esta interação não afetaria de maneira significativa o processo redox do sistema EPC/SNFAD.

Estes resultados estão em concordância com aqueles apresentados em trabalhos reportados na literatura o qual caracteriza eletroquimicamente flavinas, fenazinas, fenoxazinas e fenotiazinas imobilizadas em suporte inorgânico (fosfato de zircônio). Além disso, estes dados estão muito próximos àqueles obtidos para o sistema EPC/SNRF.

Tabela 1. Valores da separação de pico e do potencial médio (formal) obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFAD em diferentes soluções de cátions, pH 7,0 a 20 mV s<sup>-1</sup>.

Solução 0,1 M pH 7,0	$\Delta E$ (mV)	$E^0$ (mV)
LiNO <sub>3</sub>	40	-287
NaNO <sub>3</sub>	32	-275
KNO <sub>3</sub>	34	-282
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	39	-284
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	37	-265

Para os ânions (Tabela 2) nenhuma influência significativa sobre a espécie ativa foi observada. Um pequeno efeito sobre o sistema (deslocamento do potencial médio para valores mais negativos) foi verificado quando se trabalhou com solução de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, deslocando o  $E^0$  para valores mais negativos, indicando uma interação entre SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e a FAD, estabilizando sua forma oxidada. Provavelmente isto deve ser provocado pela doação de densidade eletrônica do íon sulfato carregado negativamente para a RF.

Tabela 2. Valores da separação de pico e do potencial médio (formal) obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFAD em diferentes soluções de ânions, pH 7,0 a 20 mV s<sup>-1</sup>.

Solução 0,1 M pH 7,0	$\Delta E$ (mV)	$E^0$ (mV)
NaCl	38	-283
NaNO <sub>3</sub>	42	-275
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	46	-313
NaClO <sub>4</sub>	41	-283

No entanto, quanto ao parâmetro separação de potencial de pico, nenhum dos ânions estudados apresentou comportamento distinto e, portanto, pode-se dizer que a difusão destes ânions aqui estudados ocorre de maneira similar.

Após o estudo do efeito de eletrólitos, na etapa seguinte realizou-se o estudo do efeito tampão. A Tabela 3 mostra os valores de separação de pico ( $\Delta E_p$ ), potencial formal e a razão  $I_{pa}/I_{pc}$ , a qual mostra a reversibilidade química do sistema, obtidos para o sistema EPC/SNFAD em diferentes soluções tampões. Através desta é possível observar que o sistema sofre interferência significativa da solução tampão fosfato e solução tampão TRIS, enquanto que as soluções tampões PIPES e HEPES apresentaram as melhores condições operacionais. As possíveis explicações para os diferentes comportamentos apresentados pelo sistema EPC/SNFAD nas diferentes soluções tampões são apresentadas a seguir.

Através da Tabela 3 observa-se que a relação  $I_{pa}/I_{pc}$  para o sistema EPC/SNFAD, quando se utiliza a solução tampão fosfato está muito próxima de 1, sendo este um comportamento característico de sistemas quimicamente reversíveis. O fato do potencial formal da FAD imobilizada neste meio estar próximo do potencial formal em solução pode ser atribuído ao fato de estar havendo uma competição pelo sítio ativo ácido da matriz, entre os grupos fosfato da FAD e os grupos fosfato da solução tampão, e, esta competição pode estar arrancando a FAD da matriz SN, fazendo com que o comportamento eletroquímico da espécie eletroativa imobilizada seja muito próximo do seu comportamento em solução. Ainda através desta tabela, observa-se que em solução tampão PIPES o sistema apresentou o menor valor de  $\Delta E_p$  (42 mV), maior deslocamento do potencial formal para potenciais mais positivos (-284 mV) e uma boa reversibilidade química através do parâmetro da razão entre a intensidade de corrente de pico anódica e intensidade de corrente de pico catódica (0,93), sendo portanto, o melhor meio para futuros estudos da catálise de NADH pela FAD imobilizada sobre a matriz SN. O comportamento do sistema EPC/SNFAD observado em meio de tampão TRIS pode ser atribuído, assim como para o sistema EPC/SNRF, a uma interação entre os constituintes do tampão TRIS e a FAD, estabilizando a forma oxidada da espécie eletroativa. O maior valor de  $\Delta E_p$

observado podem ser atribuído à adsorção destas moléculas sobre a superfície do eletrodo, tomando a transferência mais difícil.

A Tabela 4, mostra os dados relativos ao estudo do efeito pH e através desta observou-se que o potencial médio do sistema manteve-se constante no intervalo de pH de 3 a 8, mostrando o efeito protetor da matriz, o qual minimiza a influência do pH sobre a flavina adsorvida. Propõe-se que este efeito de proteção deva ocorrer através de uma interação bastante forte e estável entre os sítios ácidos das diferentes matrizes empregadas e o anel aloxazina da riboflavina (base de Lewis), formando um par iônico, o qual não pode ser dissociado pelo pH do

Tabela 3. Valores da separação de pico, do potencial médio (formal) e da relação  $I_{pa}/I_{pc}$  obtidos para eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFAD em diferentes soluções tampões, pH 7,0 através de voltametria cíclica a  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .

Solução tampão 0,1 mol L <sup>-1</sup>	$\Delta E$ (mV)	$E^0$ (mV)	$I_{pa}/I_{pc}$
Fosfato	62	-451	0,97
HEPES	44	-292	0,90
PIPES	42	-284	0,93
TRIS	78	-396	1,17

Tabela 4. Valores da separação de pico e do potencial médio (formal) obtidos para eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFAD em solução de NaNO<sub>3</sub> em diferentes valores de pH através de voltametria cíclica a  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .

pH	$\Delta E$ (mV)	$E^0$ (mV)
3	32	-276
4	39	-277
5	40	-285
6	44	-279
7	42	-285
8	46	-282

meio. Este comportamento pode ser atrativo para aspectos práticos e estudos mecanísticos da reação entre NADH e FAD adsorvida sobre estas matrizes. A eliminação da influência do H<sup>+</sup> durante o processo redox da FAD adsorvida nestas

diferentes matrizes é muito importante para verificar o efeito do potencial termodinâmico sobre a reação entre FAD e outras espécies.

A Figura 4 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (de 5 a 100  $\text{mV s}^{-1}$ ) no intervalo de potencial de -400 a -150 mV, onde é possível observar que não ocorre nenhuma mudança no formato geral dos mesmos. É importante mencionar aqui, que ao contrário do que ocorre com o sistema EPC/SNRF, onde foi possível trabalhar com velocidades de varredura de até 500  $\text{mV s}^{-1}$ ; no presente caso, não foi possível trabalhar com velocidades maiores que 100  $\text{mV s}^{-1}$ , uma vez que, acima desta velocidade de varredura não havia definição dos picos de oxidação e redução. Isto deve estar relacionado com o fato da molécula de FAD ser maior que a molécula de RF, ou seja, durante o processo de imobilização da FAD sobre a matriz SN pode ocorrer fechamento dos poros da sílica por estas moléculas volumosas, dificultando a difusão dos íons do eletrólito de suporte e conseqüentemente aumentando a separação dos picos quando se trabalha com altas velocidades de varredura.

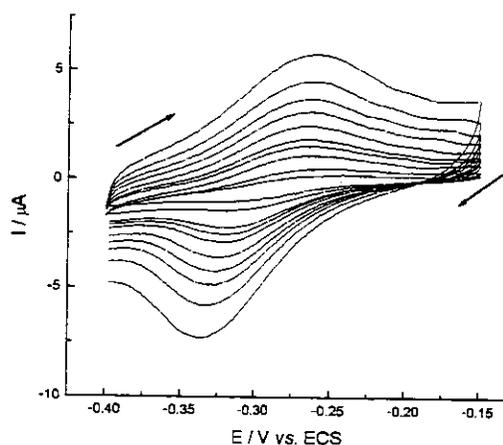


Figura 4. Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFAD 60% (m/m) em diferentes velocidades de varredura ( $5\text{-}100 \text{ mV s}^{-1}$ ) em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

Após a obtenção dos voltamogramas cíclicos mostrados na figura anterior, construiu-se um gráfico de corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, e através da Figura 5, pode-se observar que esta

relação está muito próxima da linearidade. Esperava-se, porém, uma relação linear entre a intensidade de corrente de pico anódico e a velocidade de varredura, uma vez que, a espécie eletroativa (FAD) está adsorvida sobre a superfície da matriz SN, no entanto, através dos dados mostrados na Figura 3, a qual indica que não há lixiviação da espécie eletroativa da matriz para a solução de trabalho, chega-se à conclusão de que o processo deve ser controlado pela difusão dos íons do eletrólito de suporte, do interior da solução para a interface do eletrodo/solução mantendo a eletroneutralidade na superfície do eletrodo. Este comportamento foi observado em trabalho publicado na literatura, onde se utilizou materiais inorgânicos como sílica gel ou fosfato metálicos misturados em pasta de carbono.

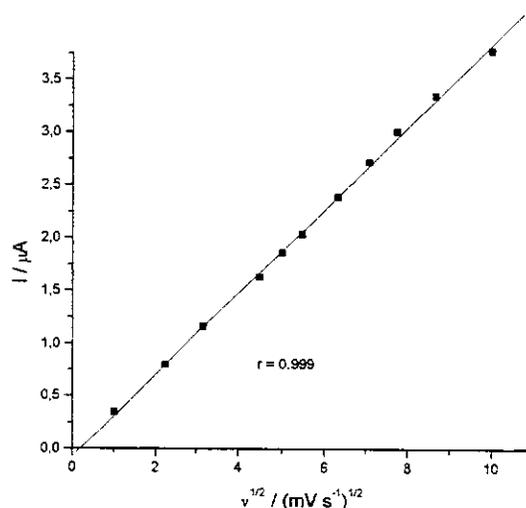


Figura 5. Variação da intensidade de corrente de pico anódico em função da velocidade de varredura obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFAD 60% (m/m) em solução de  $NaNO_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

Na etapa seguinte realizou-se os estudos eletroquímicos do sistema, onde observou-se o efeito da separação dos potenciais de pico ( $\Delta E_p$ ) em função da velocidade de varredura. Na Figura 6, nota-se que ocorre um aumento de  $\Delta E_p$  com o aumento da velocidade de varredura.

Este comportamento indica que deve estar ocorrendo problemas cinéticos durante a transferência de elétrons, os quais estão provavelmente relacionados a

resistência do próprio material do eletrodo, uma vez que, o óleo mineral e a própria sílica gel modificada não são materiais condutores.

Além disso, o fato do sistema ser controlado por difusão, também pode estar relacionado com este comportamento do sistema, ou seja, à medida que se aumenta a velocidade de varredura, diminui-se o tempo para a difusão dos íons do eletrólito de suporte, para que a eletroneutralidade na superfície do eletrodo seja atingida, gerando então, este aumento na separação dos picos. Porém este fato é menos plausível de estar acontecendo, uma vez que os coeficientes de difusão para os íons utilizados nestes estudos são de valores elevados da ordem de  $10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  e portanto se difundem rapidamente. O baixo valor de  $\Delta E_p$  mesmo a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (67 mV), em contraste com aqueles observados para azul de metileno e azul do Nilo (250 e 115 mV a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , respectivamente) adsorvido em fosfato de zircônio<sup>67</sup>, sugere uma melhor transferência de elétrons no presente caso.

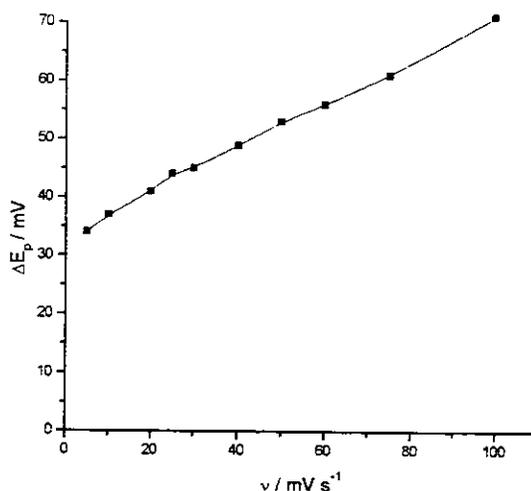


Figura 6. Variação da separação de pico ( $\Delta E$ ) em função da velocidade de varredura obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFAD 60% (m/m) em solução de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

A Figura 7 ilustra a dependência dos potenciais de pico em função da velocidade de varredura, onde é possível observar que não há variação significativa dos potenciais de pico anódico para o intervalo de velocidades de

varredura estudado, no entanto, esta figura mostra que há variação significativa dos potenciais de pico catódico em função da velocidade de varredura. Este comportamento indica que a eletroneutralidade do sistema deve ser mantida pela difusão dos cátions, ou seja, o processo redox é influenciado pelos cátions, os quais difundem para a superfície do eletrodo, para manter a eletroneutralidade do sistema EPC/SNFAD, durante o processo catódico e para a solução durante o processo anódico.

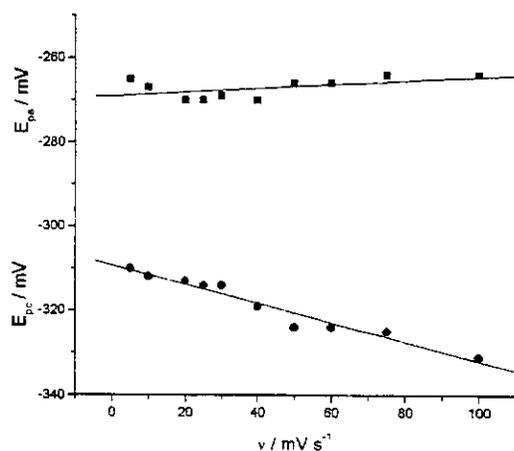


Figura 7. Dependência do potencial de pico em função da velocidade de varredura obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFAD 60% (m/m) em solução de  $\text{NaNO}_3$  0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0.

### VII.1.1.3 Estudo da Eletrooxidação de NADH através da FAD imobilizada sobre a matriz SN

Finalizando os estudos relativos ao sistema EPC/SNFAD, nesta etapa do trabalho, avaliou-se a capacidade eletrocatalítica da FAD imobilizada em eletrooxidar o NADH. Os estudos foram realizados a velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup>, com o propósito de se permitir que o tempo de reação entre o NADH e a riboflavina adsorvida fosse suficiente. A Figura 8 ilustra que ocorreu eletrooxidação do NADH, porém a corrente obtida não foi da grandeza esperada.

A explicação para este fenômeno pode ser dada basicamente por dois motivos:

- o potencial médio da FAD imobilizada, embora tenha sido deslocado para valores mais positivos, ainda pode ser insuficiente para que a catálise seja efetiva, em menores concentrações de NADH, e
- um provável efeito de matriz (superfície da sílica), pode estar dificultando a interação entre a FAD e o NADH, no sentido de dificultar a difusão do NADH.

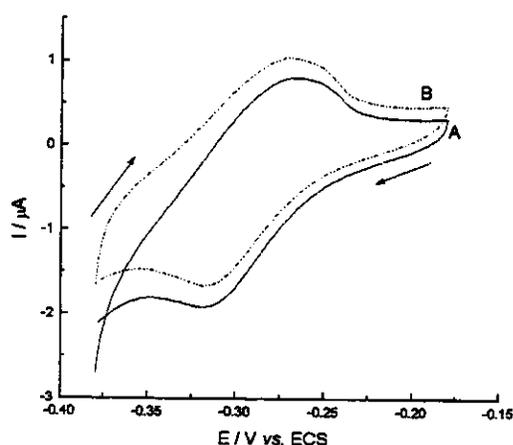


Figura 8. Voltamogramas cíclicos obtidos a  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$  com eletrodo de pasta de carbono modificado com SNFAD na ausência (A) e presença de  $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (B) de NADH em solução tampão PIPES  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

## VII.2. CONCLUSÕES

### VII.2.1 Quanto ao sistema EPC / SNFAD

#### 2.1.1. Quanto à caracterização da FAD imobilizada sobre a matriz

A quantidade de FAD adsorvida na superfície da matriz (SN), obtida por análise elementar indica que a quantidade de flavina imobilizada sobre a matriz deve estar relacionada com o tamanho de sua estrutura, uma vez que a quantidade de RF adsorvida sobre esta mesma matriz era maior.

### VII.2.1.2. Quanto à caracterização eletroquímica

Os voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de pasta de carbono contendo a matriz (SN) na ausência e presença de FAD, revelaram que na presença desta ocorria o surgimento de 2 picos redox bem definidos. Através de varreduras cíclicas sucessivas, foi possível observar uma elevada estabilidade dos VC's, sugerindo que a FAD está fortemente adsorvida sobre a matriz. Através do gráfico de intensidade de corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, pôde-se concluir que o processo deve ser controlado pela difusão dos íons do eletrólito de suporte do interior da solução para a interface do eletrodo/solução mantendo a eletroneutralidade da superfície do eletrodo.

A variação da separação de picos ( $\Delta E_p$ ) em função da velocidade de varredura, mostrou que há resistência ao processo de transferência de elétrons, a qual deve estar relacionada à resistência do próprio material do eletrodo, uma vez que o óleo mineral e mesma a sílica gel modificada não são materiais altamente condutores.

No estudo da influência do eletrólito suporte (cátions e ânions) sobre o sistema SNFAD, foi possível observar que apenas o  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  apresentaram uma pequena influência, estabilizando as formas reduzidas e oxidadas da FAD, respectivamente. O estudo do efeito da solução tampão para o sistema EPC/SNFAD mostrou que as soluções tampões fosfato e TRIS influenciaram a resposta do sistema. Através dos parâmetros  $\Delta E_p$ , potencial formal e  $I_{pa}/I_{pc}$ , concluiu-se que a solução tampão PIPES deve ser o melhor meio para os estudos da catálise de NADH pela FAD imobilizada sobre a matriz SN. Através do estudo do efeito pH observou-se que o potencial médio do sistema manteve-se constante no intervalo de pH de 3 a 8, mostrando o efeito protetor da sílica gel modificada com óxido de nióbio (V) sobre a FAD, devido a formação de um provável par-iônico entre a matriz e a FAD.

A eletrooxidação do NADH pelo sistema EPC/SNFAD não foi eficiente devido à um provável efeito de matriz (superfície da sílica SN), o que poderia dificultar a interação entre a FAD e o NADH, comprometendo a difusão do NADH.