

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA



**Estudo do comportamento eletroquímico de
flavinas e pirroloquinolina quinona (PQQ)
imobilizadas sobre sílica gel modificada com
óxido de zircônio**

Tese de Doutorado

Aluna: *Miyuki Yamashita*

Orientador: *Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota*

Campinas-SP

Dezembro/2002

UNIDADE	IQ
Nº CHAMADA	T UNICAMP
	Y14e
V	EX
TOMBO BC	54493
PROC.	124103
C ☐	D ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29/06/03
Nº CPD	

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

3181D 295333

Y14e Yamashita, Miyuki
Estudo do comportamento eletroquímico de flavinas e PQQ imobilizadas sobre sílica gel modificada com óxido de zircônio / Miyuki Yamashita. -- Campinas, SP: [s.n], 2003.

Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.

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

1. Pirroquinolina quinona. 2. Flavinas. 3. Eletrodo de pasta de carbono. 4. NADH. I. Kubota, Lauro Tatsuo. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

Ao meu irmão Akira

*e ao pequeno **grande** Bruno...*

dedico esta tese.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Lauro pela oportunidade de desenvolvimento desta tese.

Às amigas Maria del Pilar T. Sotomayor e Simone S. Rosatto pelas discussões e “help” no decorrer deste trabalho: sempre prestativas e dispostas a ajudar.

Aos funcionários da CPG, Bell e André e aos funcionários da biblioteca do Instituto de Química pela recepção.

Ao Instituto de Química da Unicamp, pelo suporte para a realização desta tese.

À Fapesp pelo suporte financeiro.

A todo o pessoal do laboratório: Alaécio, Altair, Antônio (Jequié), Arnaldo, Beth, Bete, Carla, Chris, Chiquinho, Cleidiane, Eric, Ilza, Jack, Jaz, João, Júlio, Karin, Laércio, Larissa, Lauter, Marcelo & Marcelo (Sena e Gaúcho), Maria, Nidi, Percy, Paulo (Fidêncio, Augusto e Ribeiro), Renato, Renata, Rogério, Simone, Tânia, Valter, Virgulino e Zana.

Aos Prof. Bertran e Ronei pelo bom convívio e amizade.

Às grandes amigas de “república” pelos bons momentos de convívio e apoio nos maus momentos: Maria, Simone, Edna, Tânia, Patrícia e Telma.

Aos *n* amigos que conheci no decorrer desses anos: Alex, Celeste, Clésia, Cleidiane, Edna, Flávia, Iara, Júlio, Maria I., Marta, Pilar & José, Stephen, Prof^a. Tânia, Vilarinho...

RESUMO

Título: *Estudo do comportamento eletroquímico de flavinas e PQQ immobilizadas sobre sílica gel modificada com óxido de zircônio*

Autora: Miyuki Yamashita

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota.

Neste trabalho é apresentado o comportamento eletroquímico das flavinas e quinonas immobilizadas sobre a sílica gel modificada com óxido de zircônio (Si:Zr), utilizando eletrodos de pasta de carbono. Foram estudadas a riboflavina (RF), flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e pirroloquinolina quinona (PQQ). O potencial formal ($E^{\circ'}$) para as flavinas immobilizadas foi cerca de -460 mV vs. SCE, em solução tampão fosfato pH 7, que é próximo aos valores obtidos para estas espécies em solução. Além disso, os valores de $E^{\circ'}$ foram dependentes do pH, com exceção apenas para RF, entre pH 4 e 5. As diferenças observadas no comportamento eletroquímico e nos espectros de absorção na região do UV-visível entre as flavinas immobilizadas foram discutidas em termos dos diferentes tipos de interações entre as flavinas e a matriz Si:Zr. A PQQ immobilizada sobre Si:Zr apresentou dois picos de oxidação e apenas um de redução, os quais foram atribuídos a duas formas de interação entre a PQQ e a matriz. No intervalo de pH entre 3 e 7, verificou-se que o primeiro pico de oxidação (E_{pa1}) é dependente do pH da solução, variando de 100 a -175 mV, enquanto o segundo pico de oxidação (E_{pa2}) se manteve praticamente constante em aproximadamente 100 mV. O eletrodo Si:Zr:PQQ apresentou propriedade eletrocatalítica para oxidação de NADH em 150 mV, o qual foi menor que o necessário para a eletrooxidação direta do NADH (400 mV), sobre eletrodos não modificados. Foi avaliada ainda a influência de íons Ca^{2+} na resposta do eletrodo. A adição de íons Ca^{2+} ocasionou o aumento na constante de transferência de elétrons entre a PQQ e o eletrodo. Porém, nenhum aumento na capacidade eletrocatalítica para a oxidação de NADH, devido à adição de íons Ca^{2+} , foi observado. A curva analítica obtida para NADH na presença de Ca^{2+} foi ajustada no intervalo de resposta entre 3×10^{-6} e 40×10^{-6} mmol L⁻¹ de NADH (n=12), pela equação $\Delta j_{Ca^{2+}} = 0.0247(\pm 0.014) + 42.2(\pm 1.5)[NADH] - 284(\pm 36)[NADH]^2$, com coeficiente de correlação de $r=0,999$. Na ausência de Ca^{2+} o eletrodo apresentou uma maior sensibilidade cuja equação é dada por $\Delta j = -0.07491(\pm 0.0153) + 102.9(\pm 3.09)[NADH] - 2142(\pm 133)[NADH]^2$ com $r=0,999$ no intervalo de 3×10^{-6} a 20×10^{-6} mmol L⁻¹ de NADH (n=4). O tempo de resposta do eletrodo modificado foi menor que 0,5 s, com tempo de vida útil de 1 dia, aumentando para 10 dias quando armazenado em solução contendo íons Ca^{2+} .

ABSTRACT

Title: *Study of the electrochemical behavior of flavins and PQQ immobilized on a silica gel modified with zirconium oxide*

Author: Miyuki Yamashita

Adviser: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

The electrochemical behavior of flavins and quinone immobilized on a silica gel modified with zirconium oxide (Si:Zr), using carbon paste electrodes, was studied. Riboflavin (RF), flavin mononucleotide (FMN), flavin adenine dinucleotide (FAD) and pyrroloquinoline quinone (PQQ) were investigated. The formal potential ($E^{\circ'}$) for the immobilized flavins was found to be -460 mV vs. SCE, in a phosphate buffer solution at pH 7, this being close to their values obtained in solution. Furthermore, their $E^{\circ'}$ values were pH dependent, with the exception of RF, between 4 and 5. The differences observed in the electrochemical behavior and UV-visible absorption spectra of the immobilized flavins were discussed in terms of the different kinds of interaction between the flavins and the Si:Zr matrix. The Si:Zr:PQQ-modified electrode exhibited two oxidation peaks and only one reduction peak, which were attributed to two different forms of interaction between PQQ and Si:Zr. In the pH range between 3 and 7, it was verified that the first oxidation peak (E_{pa1}) is dependent on the solution pH ranged from 100 to -175 mV. In contrast, the second oxidation peak (E_{pa2}) remains practically constant at approximately 100 mV. The Si:Zr:PQQ electrode showed the electrocatalysis for the NADH oxidation at 150 mV, which is lower than that observed for direct electrooxidation of NADH (400 mV), with unmodified electrodes. The influence of Ca^{2+} ions on the electrode response was further evaluated. The addition of Ca^{2+} ions caused an increase in the electron transfer constant between PQQ and the electrode, and no increase in NADH electrocatalysis due to the addition of Ca^{2+} ions was observed. The analytic curve obtained for NADH in the presence of Ca^{2+} was adjusted in interval between 3×10^{-6} and 40×10^{-6} mmol L⁻¹ of NADH (n=12), for the equation $\Delta j_{cat} = 0.0247(\pm 0.014) + 42.2(\pm 1.5)[NADH] - 284(\pm 36)[NADH]^2$ with correlation coefficient of $r=0.999$. In the absence of Ca^{2+} the electrode presented a larger sensibility whose equation is given for $\Delta j = -0.07491(\pm 0.0153) + 102.9(\pm 3.09)[NADH] - 2142(\pm 133)[NADH]^2$ with $r=0.999$ in the interval of 3×10^{-6} to 20×10^{-6} mmol L⁻¹ of NADH (n=4). The response time for the electrode was lower than 0,5 s, with 1 day of useful lifetime, increasing to 10 days when stored in solution containing Ca^{2+} ions.

CURRICULUM VITAE

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Miyuki Yamashita
Nascimento: 20 de novembro de 1971
Naturalidade: Assai/PR

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- 2.1 - Graduação: Bacharel em Química, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Paraná-PR, 1990.
- 2.2 - Mestrado: Química Analítica, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Paulo-SP, 1995.
Título: "Estudo da sensibilidade de filmes poli(ácido-3-tiofenoacético) a diferentes analitos".
Orientador: Prof. Dr. Ernestos Chaves Pereira de Souza.
Órgão financiador: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES.
- 2.3 - Doutorado: Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 1998.
Título: "Estudo do comportamento eletroquímico de flavinas e pirroloquinolina quinona imobilizadas sobre sílica gel modificada com óxido de zircônio".
Orientador: Prof. Dr. Lauro T. Kubota.
Órgão financiador: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP.

3. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

3.1 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.1 Trabalhos resumidos em eventos

1. Yamashita, M.; Kubota, L. T. Estudo eletroquímico comparativo da riboflavina, FMN e FAD imobilizadas sobre a sílica gel modificada com óxido de zircônio. In: XII SIBEE - Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Gramado-RS, p. 683-685, 2001.
2. Yamashita, M.; Kubota, L. T. Propriedade Eletroquímica da flavina imobilizada sobre a superfície da sílica gel modificada com óxido de zircônio. In: SBQ - 23ª Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas- MG, 2000.
3. Belmonte, G. G.; Santiago, F. F.; Bisquert, J.; Yamashita, M.; Pereira, E. C. 5th Euroconference on Solid State Ionics, Andalusia, 1998.
4. Yamashita, M.; Pereira, E. C.; Tortorela, R. L.; Bulhões, L. O. S. Sensor para umidade utilizando filmes de poli(ácido-3-tiofenoacético). In: SBQ - Sociedade Brasileira de Química 21ª Reunião Anual, 1998, Poços de Caldas-MG, v. 3, p. QA029, 1998.

5. Yamashita, M.; Pereira, E. C. Estudo do comportamento eletroquímico do poli(ácido-3-tiofenoacético). In: SBQ - Sociedade Brasileira de Química, 1997, Poços de Caldas-MG, 1997.
6. Yamashita, M.; Miyazawa, M.; Pavan, M. A. Dinâmica do Manganês do solo. In: SBQ - Sociedade Brasileira de Química 17ª Reunião Anual, Caxambu - MG, 1994.
7. Yamashita, M.; Miyazawa, M.; Pavan, M. A.; Oliveira, E. L. Dinâmica do Mn do solo e absorção pela planta. In: XXI Reunião Brasileira de Fertilidade de Solo e Nutrição de Plantas. Petrolina - PE, 1994.
8. Yamashita, M.; Miyazawa, M. Extração de metais pesados de tecido vegetal em HCl 1M. In: VII Encontro Nacional de Química Analítica. ENQA. Rio de Janeiro - RJ, 1993.
9. Yamashita, M.; Miyazawa, M.; Parra, M. S. Toxidez e absorção de metais pesados pelo feijoeiro. In: IV Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão, Londrina - PR, 1993.
10. Yamashita, M.; Faria, T. J. Estudo químico das flores de *Wedelia paludosa*. In: I Encontro Anual de Iniciação Científica, Maringá - PR, 1991.

3.1.2 Artigos completos publicados em periódicos

1. Yamashita, M.; Pessoa, C. A.; Kubota, L. T. Electrochemical behavior of pyrroloquinoline quinone immobilized on silica gel modified with zirconium oxide. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002 (submetido).
2. Yamashita, M.; Kubota, L. T. electrochemical comparative study of riboflavin, FMN and FAD immobilized on the silica gel modified with zirconium oxide. *Journal Brazilian Chemistry Society*, v. 13, 2002.
3. Bisquert, J.; Belmonte, G. G.; Santiago, F. F.; Ferriols, N. S.; Yamashita, M.; Pereira, E. C. Application of a distributed impedance model in the analysis of conducting polymer films. *Electrochemistry Communications*, v. 2, p. 601-605, 2000.
4. Belmonte, G. G.; Santiago, F. F.; Bisquert, J.; Yamashita, M.; Pereira, E. C.; Garcia, S. C. Frequency dispersion in electrochromic devices and conducting polymer electrodes: a generalized transmission line approach. *Solid State Ionics*, v. 5, p. 44-51, 1999.
5. Yamashita, M.; Miyazawa, M. Absorção de metais pesados do lodo de esgoto pelo feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), 1998.
6. Miyazawa, M.; Oliveira, E. L. de; Parra, M. S.; Yamashita, M. Heavy metal uptake of the sewage sludge by bean plants (*Phaseolus vulgaris* L). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba-PR, v. 41, p. 115-127, 1998.
7. Miyazawa, M.; Pavan, M. A.; Machado, P. L. O. de A.; Oliveira, E. L. de; Yamashita, M. Manganese dynamic in acid soil and uptake by maize seedlings. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 27, p. 2349-2359, 1996.

PREFÁCIO

O Laboratório de Eletroquímica e Eletroanalítica para o Desenvolvimento de Sensores (LEEDS), onde foi desenvolvida esta tese, tem em uma de suas linhas de pesquisa o uso de sílica gel quimicamente modificada com óxidos metálicos, em eletrodo de pasta de carbono, como suporte de mediadores e enzimas. Nesta linha busca-se a investigação do mecanismo e da cinética da reação de transferência de prótons/elétrons entre enzimas-cofatores, cofatores-substratos e enzimas-substratos. Dentre essas linhas de pesquisa, existe um grande interesse pela utilização da sílica gel modificada com óxido para a imobilização de flavinas ou pirroloquinolina quinona (PQQ) objetivando melhorar a transferência de elétrons entre flavinas ou quinonas imobilizadas e o NADH, investigar o mecanismo de transferência de elétrons, além de estudar as interações envolvidas entre o mediador e a sílica gel modificada com óxido. Outra proposta do grupo é a aplicação desses sistemas na construção de biossensores amperométricos à base de enzimas.

Uma série de publicações do grupo descreve a imobilização de uma variedade de mediadores sobre novos tipos de materiais, tais como fosfato de zircônio (Kubota & Gorton, 1999), fosfato de titânio (Kubota *et al.*, 2000), sílica gel modificada com óxido de nióbio (Santos *et al.*, 2002); os quais foram incorporados em pasta de carbono.

Dentro deste contexto, esta tese descreve a utilização da superfície da sílica modificada com óxido de zircônio na incorporação de diferentes tipos de flavinas e quinonas.

Esta tese foi dividida em três capítulos. No capítulo I é apresentada uma revisão bibliográfica da eletrooxidação do NADH utilizando diferentes eletrodos modificados e não modificados; problemas da eletrooxidação do NADH e avanços em relação à busca de mediadores, abordando os mecanismos de transferência de elétrons entre NADH e mediadores. No capítulo II é apresentada a modificação da sílica gel com óxido de zircônio, material denominado Si:Zr, e incorporação dos três tipos de flavinas. A caracterização eletroquímica é discutida em termos da interação dos diferentes tipos de flavinas com a matriz Si:Zr; apresenta ainda a potencialidade da flavina imobilizada sobre Si:Zr em eletrooxidar o NADH. Já no capítulo III, descreve-se o comportamento eletroquímico da PQQ imobilizada sobre Si:Zr, bem como sua potencialidade na eletrooxidação do NADH.

ÍNDICE

Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
Prefácio.....	xix
 CAPÍTULO I	
I - INTRODUÇÃO.....	3
I.1 - Eletrooxidação de NADH.....	5
I.1.1 - Eletrodos não modificados.....	5
I.1.2 – Eletrodos modificados.....	7
I.1.2.1 - Tratamento da superfície do eletrodo.....	8
I.1.2.2 - Imobilização de mediadores.....	9
I.2. - Mediadores para a eletrooxidação de NADH.....	12
I.3 - Algumas considerações sobre a cinética e mecanismo de reação entre mediador e NADH.....	14
I.4 - Tipos de mediadores utilizados na modificação dos eletrodos para NADH.	23
I.5 - Referências.....	29
 CAPÍTULO II	
II.1- INTRODUÇÃO.....	37
II.2 - PARTE EXPERIMENTAL.....	41
II.2.1 – Reagentes.....	41
II.2.2- Equipamentos.....	42
II.2.3 - Procedimento experimental.....	42

II.2.3.1 - Modificação da superfície da sílica gel.....	42
II.2.3.2 - Quantificação do óxido de zircônio enxertado na sílica gel.....	43
II.2.3.3 - Imobilização da flavina sobre a superfície da sílica modificada.....	45
II.2.3.4 - Determinação da quantidade de flavina adsorvida sobre a superfície da matriz.....	45
II.2.3.5 - Espectro de UV-visível da flavina imobilizada e da flavina em solução.....	45
II.2.3.6 - Preparação da pasta de carbono incorporando a sílica modificada...	46
II.2.3.7 - Medidas eletroquímicas.....	46
II.3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
II.3.1 – Caracterização da sílica gel modificada com zircônio	48
II.3.2 - Imobilização das flavinas sobre Si:Zr.....	48
II.3.3 - Espectros na região do UV-Visível das flavinas.....	49
II.3.4 - Comportamento eletroquímico das flavinas imobilizadas sobre Si:Zr...	51
II.2.5 - Efeito do oxigênio do meio na resposta do eletrodo Si:Zr: <i>flavina</i>	63
II.3.6 - Eletrooxidação de NADH pelo eletrodo Si:Zr: <i>flavina</i>	65
II.4 - CONCLUSÕES.....	67
II.5 - REFERÊNCIAS.....	68
CAPÍTULO III	
III.1 - INTRODUÇÃO.....	73
III.2 - EXPERIMENTAL.....	77
III.2.1 - Reagentes.....	77
III.2.2 - Equipamentos	78
III.2.3 - Célula eletroquímica e eletrodos.....	78
III.2.4 – Procedimento Experimental.....	79

III.2.4.1 – Imobilização da PQQ sobre Si:Zr.....	79
III.2.4.2 – Preparação da pasta de carbono modificada.....	79
III.2.4.3. - Medidas espectrofotométricas da PQQ imobilizada e em solução..	79
III.2.3.4 – Estudo da influência do íon Ca^{2+} sobre a resposta do eletrodo Si:Zr:PQQ.....	80
III.3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	81
III.3.1 - Espectros de Absorção da PQQ.....	81
III.3.2 - Estudos eletroquímicos	82
III.3.2.1 - Quantidade de Si:Zr:PQQ na pasta de carbono.....	84
III.3.2.2 - Influência da concentração do eletrólito de suporte	85
III.3.2.3 – Influência do pH.....	83
III.3.2.4 - Efeito dos diferentes ânions e cátions.....	88
III.3.2.5 – Efeito da solução tampão.....	89
III.3.2.6 - Influência dos íons Ca^{2+} na resposta do eletrodo Si:Zr:PQQ.....	91
III.3.3 - Eletrooxidação de NADH utilizando eletrodo de Si:Zr:PQQ.....	96
III.3.3.1 - Efeito da solução tampão na eletrocatalise de NADH.....	97
III.3.3.2 - Efeito do potencial aplicado	98
III.3.3.3 - Influência do pH na eletrooxidação de NADH.....	99
III.3.3.4 - Eletrooxidação de NADH utilizando eletrodo Si:Zr:PQQ na ausência e presença de íons Ca^{2+}	100
III.4- CONCLUSÕES.....	108
III.5 - REFERÊNCIAS.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I

Figura I.1 - Resumo das etapas da oxidação eletroquímica do NADH. Os potenciais dados são referentes ao ECS, em pH 7.....	7
Figura I.2 - Etapa da transferência do próton, proveniente da oxidação do NADH	8
Figura I.3 - Representação esquemática da oxidação do NADH utilizando eletrodo modificado com mediador. M_{oxi} : mediador oxidado; M_{red} : mediador reduzido.....	12
Figura I.4 - Mecanismo de desativação proposto para o mediador o-quinona adsorvido sobre eletrodo para a oxidação do NADH	22
Figura I.5 - Mecanismo geral proposto para a eletrooxidação de NADH utilizando mediador.....	23
Figura I.6 - Estruturas de derivados de fenotiazina, fenoxazina, fenazina e flavinas.....	24
Figura I.7 - Variação da constante de velocidade de segunda ordem em função do potencial formal dos derivados de fenoxazina em 0,25 mol L ⁻¹ de tampão fosfato, pH 7: (a) azul de meldola, 7-dimetilamino-1,2-benzofenoxazínio; (b) 1,2 - benzofenoxazina-7-ona; (c) Resorufin, 3-hidroxifenoxazina-7-ona; (d) azul do nilo, 3-amino-7-dietilamino-1,2-benzofenoxazínio; (e) galocianina, ácido 7-dimetilamino-4-hidroxi-3-oxo-3 H-fenoxazina-1-carboxílico; (f) metil azul de capri; 3,7-bis(dimetilamino)fenoxazínio; (g) etil azul de capri, 3,7-bis(dietilamino)fenoxazínio.....	25
Figura I.8 - Estrutura do 2-nitro-9-fluorenona (a) e da sua forma ativa obtido da redução eletroquímica (b).....	26

Capítulo II

Figura II.1.1 - Representação da estrutura química e nomenclatura das flavinas no estado oxidado.....	37
Figura II.2.1 –Sistema utilizado para fazer a reação de modificação da sílica gel com oxiclreto de zircônio.....	43
Figura II.2.2 - Representação esquemática do eletrodo de pasta de carbono.....	46
Figura II.2.3 - Representação esquemática da célula eletroquímica. Entrada de gás sobre a superfície da solução (1) e na solução (2), local do eletrodo auxiliar (3), do eletrodo de trabalho (4), do eletrodo de referência (5) e adição da amostra (6).....	47
Figura II.3.1- Espectro na região do UV-visível para a RF em solução e imobilizada sobre Si:Zr.....	50
Figura II.3.2 - Espectro na região do UV-visível para a FMN em solução e imobilizada sobre Si:Zr.....	50
Figura II.3.3 - Espectro na região do UV-visível para a FAD em solução e imobilizada sobre Si:Zr.....	51
Figura II.3.4 - Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos de pasta de carbono modificado com Si:Zr (a) e Si:Zr:RF (b) a 20 mV s^{-1} em solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.....	52
Figura II.3.5 - Representação do processo redox das flavinas.....	52
Figura II.3.6 - Densidades de correntes (j) de picos em função do número de ciclos obtidos para o eletrodo Si:Zr:RF a 20 mV s^{-1} . Solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.....	53
Figura II.3.7 – Variação da densidade de corrente de pico anódico (g) e corrente de pico catódico (j) em função da quantidade de Si:Zr:RF % (m/m) utilizada na pasta de carbono. Solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1}	54
Figura II.3.8 - Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo Si:Zr:flavina. Solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1}	56

Figura II.3.9 - Dependência da densidade de corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura obtida para eletrodos Si:Zr:RF, Si:Zr:FMN e Si:Zr:FAD. Solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0.....	50
Figura II.3.10 - Voltamogramas do Si:Zr:FMN obtidos em diferentes eletrólitos de suporte com concentração de 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0. Contra-íon NO ³⁻ e Na ⁺	59
Figura II.3.11 - Dependência do E° em função do pH da solução para as flavinas em solução (a) e flavinas adsorvidas (b).....	62
Figura II.3.12 - Voltamogramas obtidos na presença e ausência de oxigênio para o eletrodo Si:Zr:RF a 5 mV s ⁻¹ , pH 7,0.....	63
Figura II.3.13 - Voltamogramas obtidos na presença e ausência de oxigênio para o eletrodo Si:Zr:FMN a 5 mV s ⁻¹ , pH 7,0.....	64
Figura II.3.14 - Voltamogramas obtidos na presença e ausência de oxigênio para o eletrodo Si:Zr:FAD a 5 mV s ⁻¹ , pH 7,0.....	64
Figura II.3.15 - Voltamograma cíclico obtido para o eletrodo Si:Zr:RF na ausência (a) e presença (b) de 10 mmol L ⁻¹ de NADH a 5 mV s ⁻¹ . Solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0.....	65
Figura II.3.16 - Voltamograma cíclico obtido para o eletrodo Si:Zr:FMN na ausência (a) e presença (b) de 10 mmol L ⁻¹ de NADH a 5 mV s ⁻¹ . Solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0.....	66
Figura II.3.17 - Voltamograma cíclico obtido para o eletrodo Si:Zr:FAD na ausência (a) e presença (b) de 10 mmol L ⁻¹ de NADH a 5 mV s ⁻¹ . Solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0.....	66

Capítulo III

Figura III.1.1 - Estrutura da pirroloquinolina quinona (PQQ).....	74
Figura III.1.2 - Representação esquemática do eletrodo de ouro modificado com derivados de tiol na presença da PQQ.....	75
Figura III.3.1 - Espectro UV-visível da PQQ dissolvida em água (4x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹) e da imobilizada sobre Si:Zr, pH 7,0.....	81
Figura III.3.2 - Representação esquemática do processo de oxidação da pirroloquinolina quinona (PQQ).....	82

Figura III.3.3 – Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo Si:Zr e com Si:Zr:PQQ a $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Solução tampão fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7.....	83
Figura III.3.4 – Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos de pasta de carbono contendo diferentes proporções de Si:Zr:PQQ na pasta de carbono, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7.....	84
Figura III.3.5 - Voltamogramas cíclicos em diferentes concentrações de KH_2PO_4 , pH 7,0, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$	85
Figura III.3.6 – Voltamogramas cíclicos referentes a pH 3, 5 e 7 para a PQQ em solução (a) e para a PQQ imobilizada (b) a 20 mV s^{-1} . Solução fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$	86
Figura III.3.7 - Comportamento do E_{pa1} e E_{pa2} em diferentes pH das soluções tampão fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$	87
Figura III.3.8 - Potencial formal da PQQ imobilizada e da PQQ não imobilizada em função do pH da solução.....	88
Figura III.3.9 – Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando o eletrodo Si:Zr:PQQ em diferentes soluções tampão $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7 a 20 mV s^{-1}	90
Figura III.3.10 - Voltamogramas obtidos utilizando eletrodo de Si:Zr:PQQ na ausência (a) e presença de 10 mmol L^{-1} de Ca^{2+} (b). Solução fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5.....	91
Figura III.3.11 - Estabilidade do eletrodo Si:Zr:PQQ em função do número de ciclos dos voltamogramas obtidos a 20 mV s^{-1} , na ausência (a) e presença de 10 mmol L^{-1} CaCl_2 (b). Solução fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5.....	93
Figura III.3.12 - Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura na ausência (a) e presença de íons Ca^{2+} (b). Solução fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5.....	94
Figura III.3.13 - Densidade de corrente anódica obtidos com eletrodo Si:Zr:PQQ em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na ausência (a) e presença de íons Ca^{2+} (b). Solução tampão fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5.....	95
Figura III.3.14 - Dependência do potencial de pico anódico em função do $\log v$ na ausência (a) e presença de Ca^{2+} (b). Solução fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5.....	95

Figura III.3.15 - Voltamogramas cíclicos utilizando eletrodo Si:Zr:PQQ na ausência (a) e presença de 10 mmol L ⁻¹ de cálcio (b). Adição de 5 mmol L ⁻¹ de NADH a 5 mV s ⁻¹ , solução tampão fosfato 0,25 mol L ⁻¹ , pH 7.....	97
Figura III.3.16 – Variação da densidade de corrente catalítica para 1 mmol L ⁻¹ de NADH em função do pH da solução, E _{aplicado} = 150 mV vs. ECS.....	99
Figura III.3.17 – Representação esquemática da eletrooxidação de NADH utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com Si:Zr:PQQ.....	100
Figura III.3.18 - Voltamogramas cíclicos utilizando eletrodo Si:Zr:PQQ na ausência (a) e presença de 10 mmol L ⁻¹ de cálcio (b). Adição de 5 mmol L ⁻¹ de NADH a 5 mV s ⁻¹ , solução fosfato 0,25 mol L ⁻¹ , pH 4,5.....	101
Figura III.3.19 - Representação esquemática do complexo formado entre a forma oxidada e a forma reduzida da PQQ e íon Ca ²⁺	102
Figura III.3.20 – Representação esquemática do complexo formado entre a PQQ imobilizada sobre a superfície da sílica gel modificada com óxido de zircônio com o íon Ca ²⁺	103
Figura III.3.21 - Dependência da densidade de corrente em função da concentração de NADH usando eletrodo Si:Zr:PQQ aplicando um potencial de 150 mV vs. ECS. Solução tampão fosfato 0,25 mol L ⁻¹ , pH 4,5.....	104
Figura III.3.22 - Tempo de resposta obtido para eletrodo Si:Zr:PQQ, adição de 5,4 µmol L ⁻¹ NADH aplicando um potencial de 150 mV vs. ECS. Solução fosfato 0,25 mol L ⁻¹ e CaCl ₂ 10 mmol L ⁻¹ , pH 4,5.....	104
Figura III.3.23 - Resposta relativa da sensibilidade de NADH obtida por cronoamperometria, utilizando eletrodo Si:Zr:PQQ, realizada em diferentes dias na ausência (a) e presença de íons Ca ²⁺ (b). Solução fosfato 0,25 mol L ⁻¹ , pH igual a 4,5 com um potencial aplicado de 150 mV vs. ECS.....	107

ÍNDICE DE TABELA

Capítulo I

Tabela I.1 - Mediadores usados na eletroxidação de NADH.....	15
--	----

Capítulo II

Tabela II.2.1 – Preparação dos padrões para quantificar zircônio.....	44
---	----

Capítulo III

Tabela II.3.1 - Variação do ΔE_p em função da quantidade de Si:Zr:RF na pasta de carbono. Solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,1 e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1}	54
Tabela II.3.2 - Valores de $E^{\circ'}$ e ΔE_p para os eletrodos Si:Zr:RF e Si:Zr:FAD em diferentes eletrólitos de suporte, pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1}	58
Tabela II.3.3 - Valores do $E^{\circ'}$ e ΔE_p para eletrodo Si:Zr:RF, Si:Zr:FMN e Si:Zr:FAD em diferentes soluções tampão, em pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mVs^{-1}	60

Capítulo III

Tabela III.3.1 –Valores da separação de picos, ΔE_p , e do potencial formal, $E^{\circ'}$, obtidos utilizando eletrodo de Si:Zr:PQQ em diferentes eletrólitos a 20 mV s^{-1} . Solução $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.....	89
Tabela III.3.2 – Valores da separação de pico e do potencial formal obtidos em diferentes soluções tampão, pH 7,0.....	90
Tabela III.3.3 - Densidade de corrente catalítica ($\Delta j_{\text{catalica}}$), obtida a partir de medidas amperométricas para NADH (1 mmol L^{-1}) utilizando eletrodo Si:Zr:PQQ em diferentes soluções tampão (pH 7). $E_{\text{aplicado}}=100 \text{ mV vs. ECS}$ e $v=20 \text{ mV s}^{-1}$	98

Tabela III.3.4 - Densidade da corrente eletrocatalítica da oxidação da NADH em diferentes potenciais aplicado. Solução tampão fosfato 0,25 mol L ⁻¹ , pH 7,0.....	98
Tabela III.3.5 - Estimativa da constante aparente de Michaelis-Menten, e da densidade de corrente máxima obtida pelo método de Lineweaver-Burk.....	106

CAPÍTULO I

I - INTRODUÇÃO

O uso de componentes biológicos na construção de sensores eletroquímicos, comumente conhecidos como biossensores, é uma área em constante desenvolvimento dentro da eletroanálise. Os biossensores eletroquímicos combinam o potencial analítico das técnicas eletroquímicas com a especificidade do material biológico (enzimas, anticorpos, organelas, dentre outros) e vêm, cada vez mais, ganhando espaço por apresentar requisitos como: seletividade a determinado analito de interesse em amostras complexas, rapidez, possibilidade de miniaturização e baixo custo. Outro aspecto relevante é a possibilidade do monitoramento contínuo do analito *in situ* ou *in vivo*. Por outro lado, a grande limitação de seu uso é a pouca estabilidade, refletida em tempos de vida curtos (semanas ou no máximo alguns meses).

Há um grande interesse em se estudar a eletroquímica dos cofatores, uma vez que eles participam da transferência de elétrons da enzima durante a catálise com o substrato e, em muitos casos, fazem parte do sítio ativo da enzima (região onde ocorre a reação redox); sem a presença deste grupo a enzima não conseguiria catalisar a conversão do substrato para o produto. A compreensão das reações de transferência de elétrons envolvidas entre os cofatores/enzimas e o eletrodo é complexa, uma vez que devem ser levados em consideração o tamanho, os diferentes tipos de interações e a orientação da enzima imobilizada 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, torna-se necessário.

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

dependem da NAD(H) e 150 de NADP(H) (Gorton, 1986). O emprego de 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 dehidrogenase 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 dehidrogenases devido à necessidade de uso de potenciais elevados, utilizados 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 (Ravichandram & Baldwin, 1983), quinonas (Murthy & Sharma, 1998), catecol (Jaegfeldt *et al.*, 1981), ferroceno (Tatsue *et al.*, 1987), derivados de tionina (Hajizadeh *et al.*, 1991), fenazina (Torstesson & Gorton, 1981), fenoxazina (Gorton *et al.*, 1984; Persson & Gorton, 1990), fenotiazinas (Kubota *et al.*, 2000), complexos metálicos (Raj *et al.*, 2000) e sais condutores orgânicos (Bartlett & Wallace, 2000). Na maioria dos casos os mediadores são imobilizados por adsorção sobre a superfície do eletrodo ao nível de monocamada, por eletropolimerização ou ligação covalente, ou, no caso de eletrodos de pasta de carbono, podem ser também incluídos na pasta. Os maiores obstáculos encontrados para este tipo de eletrodos é o tempo de vida e a falta de seletividade na oxidação do NADH. Sendo assim, ainda existe um grande interesse em encontrar novos materiais ou alternativas para serem utilizados na eletrooxidação do NADH. Por outro lado, a compreensão da interação dos diferentes mediadores com o NADH é necessária para o desenvolvimento de novos tipos de configurações de biossensores à base de enzimas dehidrogenases na busca de melhor eficiência destes. Tendo esse conhecimento, novas moléculas poderão ser sintetizadas prevendo-se antecipadamente o aumento na propriedade eletrocatalítica para oxidação do NADH (Gorton *et al.*, 1991).

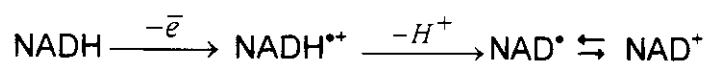
I.1 - Eletrooxidação de NADH

Devido a sua importância como cofator de várias enzimas que promovem reações de interesse analítico, assim como devido a sua função de transportador de elétrons em células vivas, o mecanismo envolvendo a eletrooxidação de NADH vem sendo muito estudado (Matsue *et al.*, 1987; Gorton., 1986; Kitani *et al.*, 1981; Chi & Dong, 1996). 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 de 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.

I.1.1 - Eletrodos não modificados

A oxidação de 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 a cerca de 0,4; 0,7 e 1 V vs. ECS, para eletrodos de carbono, platina e ouro, respectivamente (Samec & Elving, 1983; Blaedel & Jenkins, 1975). A pior definição do pico de oxidação ocorre quando se utiliza eletrodo de platina (Burnett & Underwood, 1965). As reações envolvidas nesses tipos de sistemas são irreversíveis, decorrentes da adsorção dos produtos gerados durante o processo de oxidação de NADH sobre a superfície do eletrodo.

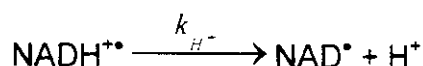
O mecanismo proposto para a eletrooxidação de NADH é do tipo eletroquímico-químico-eletroquímico (ECE) (Blaedel & Haas, 1970; Moiroux, 1980; Elving *et al.*, 1982; Blankespoor & Miller, 1984; Jaegfeldt, 1980; Ludvik & Volke, 1988), como mostra o esquema abaixo.



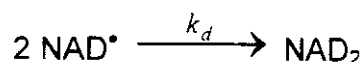
O alto valor de sobrepotencial observado durante a oxidação eletroquímica direta de NADH sobre a superfície do eletrodo é atribuído ao elevado potencial da formação do cátion radical (etapa limitante):



O potencial formal para $\text{NADH}^{*\bullet}/\text{NADH}$ em solução aquosa (pH 7,0) foi estimado em 0,69 V vs. ECS (Carlson *et al.*, 1984; Carlson & Miller, 1983), 0,72 (Cenas *et al.*, 1987) e 0,78 V (Matsue *et al.*, 1987), usando aceptores de elétrons derivados do ferroceno. 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 $k_{\text{H}^+} > 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Grodkowski *et al.*, 1983).



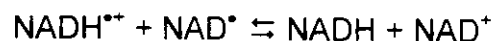
Uma possível dimerização do radical $\text{NAD}^{\bullet}$ durante a formação de NAD^+ (Elving *et al.*, 1976; Jaegfeldt, 1981) tem sido proposta,



com uma constante de dimerização muito alta, k_d , na ordem de 10^6 - $10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ (Samec & Elving, 1983; Bresnahan & Elving, 1981; Jensen & Elving, 1984; Cunningham & Underwood, 1967). A formação de NAD^+ ocorre, posteriormente, através da oxidação de dímeros:



Outra reação que pode estar envolvida é:



A figura I.1 mostra um resumo da oxidação eletroquímica da NADH, apresentada em uma revisão feita por Gorton *et al.* (1991).

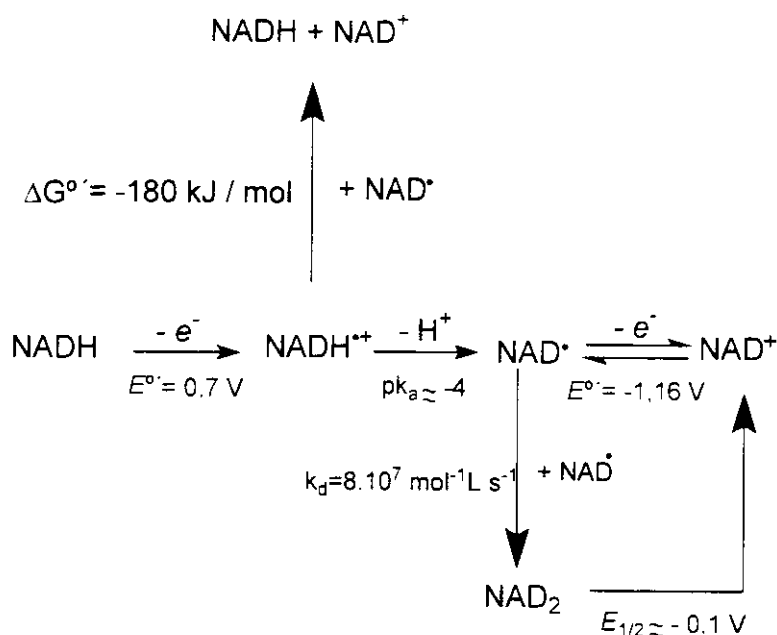


Figura I.1 - Resumo das etapas da oxidação eletroquímica do NADH. Os potenciais dados são referentes ao ECS, em pH 7.0.

I.1.2 - Eletrodos modificados

Existem duas formas para diminuir o potencial necessário para a eletrooxidação de 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.

I.1.2.1 - Tratamento da superfície do eletrodo

Blaedel & Jenkins (1975) mostraram a possibilidade de diminuir o sobrepotencial da eletrooxidação de NADH através do pré-tratamento do eletrodo, sendo este efeito mais pronunciado quando se utiliza o eletrodo de carbono. Este fato foi atribuído aos grupos oxigenados presentes sobre superfície do eletrodo em uma forma equivalente à quinona, cujo mecanismo foi proposto anos mais tarde por Samec & Elving (1983), como mostra a figura I.2. Neste mecanismo, o próton da posição C(4) do NADH é transferido a uma terceira espécie aceptora de prótons, molécula de H_2O , possivelmente formando uma ligação intermediária com o átomo de oxigênio da superfície do eletrodo.

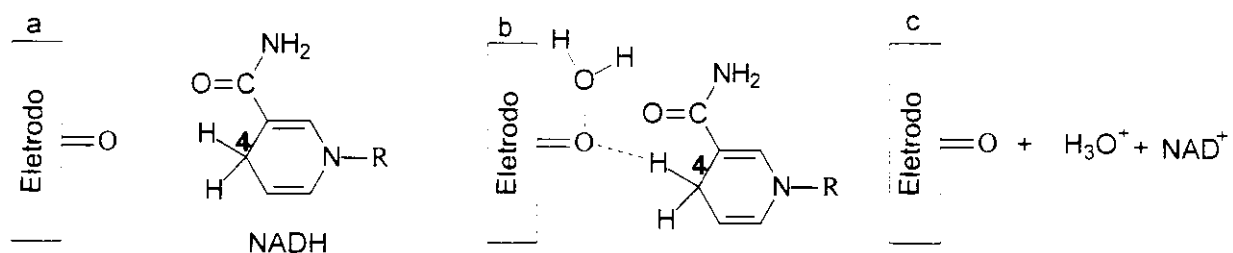


Figura I.2 - Etapa da transferência do próton, proveniente da oxidação do NADH (Samec & Elving, 1983).

Apesar de o 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 de NADH. Por outro lado, efetuando adequadamente os processos de pré-tratamento e condicionamento do eletrodo é possível a obtenção de resultados reprodutíveis (Jaegfeldt *et al.*, 1978; Moiroux & Elving, 1979; Jaegfeldt, 1980), entretanto, este tipo de procedimento não torna o eletrodo seletivo para a oxidação de NADH.

Com base nos estudos de Blaedel & Jenkins (1975), várias quinonas e seus derivados foram imobilizados em superfícies de eletrodos com o intuito de diminuir o potencial da oxidação de NADH e melhorar a seletividade do eletrodo.

1.1.2.2 - Imobilização de mediadores

O processo de imobilização tem um papel fundamental nas características de sensores e biossensores, uma vez que está relacionado 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 as características de 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 e menor interferência de compostos indesejáveis (Guilbault, 1976).

O mediador pode ser imobilizado utilizando os mesmos métodos empregados para a imobilização da enzima em biossensores, através de ligação covalente, adsorção, eletropolimerização, dentre outros.

A imobilização por adsorção é um método bastante simples e consiste na interação devida a forças eletrostáticas ou hidrofóbicas entre a superfície do eletrodo e o material imobilizado (Brett & Brett, 1996). O mediador pode ser adsorvido diretamente sobre o material do eletrodo ou sobre suportes orgânicos ou inorgânicos tais como: polímeros, alumina, carvão, argila, celulose, sílica e vidro (Chibata, 1978).

Imobilização por oclusão em gel ou filmes poliméricos é baseada no acoplamento da enzima, ou mediador, à rede de uma matriz polimérica ou inserindo-os em membranas semipermeáveis. A enzima, ou mediador, não se liga à matriz, desta forma, este método pode ser aplicado para quase todas as enzimas e ou mediadores. As desvantagens desta metodologia incluem os tamanhos irregulares

dos poros, a alta possibilidade de lixiviação dos compostos imobilizados da rede da matriz-suporte e as propriedades não-condutoras dos géis. Neste tipo de imobilização são utilizados como suportes poliacrilamida, alginato de cálcio, agar, agarose etc.

O método de imobilização por ligação covalente consiste na formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais da enzima, ou mediador, como suporte. A grande vantagem é que os compostos imobilizados não lixiviam para a solução; a desvantagem é a desativação parcial ou total da capacidade catalítica da espécie ativa, que pode ocorrer durante o processo de imobilização devido à formação de ligações químicas.

A ligação covalente cruzada é formada a partir de ligações covalentes entre as espécies ativas e reagentes bifuncionais de baixo peso molecular, como: glutaraldeído e diisotiocianato. Este procedimento é bastante simples e útil para estabilizar espécies ativas adsorvidas em combinação com outros métodos de imobilização. As desvantagens deste tipo de imobilização são: difícil controle da reação de formação das ligações cruzadas, limitação difusional do substrato, possibilidade de danificar a espécie ativa, falta de rigidez e força mecânica.

Outro método para a modificação do eletrodo é o recobrimento da superfície do eletrodo com filmes de polímeros condutores, os quais podem ser eletropolimerizados juntamente com o mediador. Uma de suas características é de aumentar a velocidade de transferência de elétrons.

Não existe um método ideal para imobilização da espécie ativa (enzimas, mediadores etc.), porém a diversidade dos métodos existentes permite a escolha de um que promova uma melhor imobilização e menor perda da atividade da espécie a ser imobilizada.

Dentre os eletrodos mais comumente utilizados estão os de ouro, platina e carbono dentre outros. Uma outra classe de eletrodos que vem sendo bastante empregada é a dos eletrodos de pasta de carbono. Esses eletrodos são formados a partir da mistura de grafite em pó e um líquido à base de hidrocarbonetos (nujol, parafina, silicone), o qual é imiscível em contato com soluções aquosas. O líquido orgânico serve para dar consistência de pasta, mantendo uma forma firme do

eletrodo (Kulys *et al.*, 1994). As vantagens deste tipo de configuração de eletrodo são: baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo, facilidade de renovação da superfície, além da possibilidade de incorporação de suportes e mediadores, aumentando a variedade de aplicações, contornando problemas como a baixa reprodutibilidade e estabilidade (Gorton, 1995).

A sílica gel modificada com óxidos metálicos tem sido usada como suporte para a imobilização de espécies mediadoras de elétrons e tem sido incorporada na preparação de eletrodos de pasta de carbono modificados. Estes materiais têm sido aplicados em eletrocatalise (Zaitseva *et al.*, 2002; Peixoto, 1995; Pessoa *et al.*, 1997). A imobilização possibilita que a espécie ativa não seja lixiviada do eletrodo para a solução de medida, melhorando algumas características como a estabilidade e o tempo de vida dos eletrodos preparados desta maneira.

O emprego de eletrodos modificados com sílica gel somente foi possível devido ao desenvolvimento de eletrodos à base de pasta de carbono. A utilização desses materiais é bastante recente, a partir de 1989/90 e, desde então, tem crescido exponencialmente, tal como mencionado por Walcarius (1998). A variedade de possibilidades para modificar a superfície da sílica confirma o grande potencial desses materiais em eletroquímica. A elevada área superficial das sílicas, quando combinada à sua química de superfície, torna esse material útil como suporte para vários catalisadores. Do ponto de vista eletroquímico, as sílicas quimicamente modificadas são bastante atrativas para serem empregadas em eletrodos de pasta de carbono porque permitem introduzir na interface eletrodo/solução uma variedade de funcionalidades orgânicas, que podem estar, por exemplo, covalentemente ligadas à matriz condutora.

A sílica gel é uma substância não-cristalina, porosa, de composição $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Sua superfície é basicamente formada por grupos silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$) e siloxanos

($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$) (Iler, 1979). Suas características, como elevada capacidade de adsorção, alta estabilidade térmica/química, porosidade, rigidez e elevada área superficial, possibilitam a modificação de sua superfície com diferentes grupos funcionais (Walcarius, 1998).

I.2. - Mediadores para a eletrooxidação de NADH

O primeiro trabalho descrito na literatura utilizando eletrodo modificado capaz de diminuir o sobrepotencial da eletrooxidação do NADH foi descrito por Tse & Kuwana (1978), os quais imobilizaram 3,4-dihidroxibenzilamina (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 de NADH tem resultado em um número considerável de revisões (Gorton, 1986; Gorton *et al.*, 1991; Bartlett *et al.*, 1991; Katakis & Domínguez, 1997; Lobo *et al.*, 1997; Gorton & Domingues, 2002).

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, em alguns casos, aumentando a seletividade do eletrodo ao NADH. Uma representação esquemática dos eletrodos modificados para a oxidação de NADH é mostrada na figura 1.3.

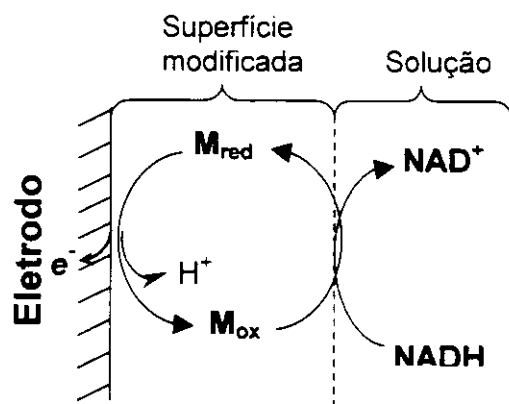


Figura I.3 - Representação esquemática da oxidação do NADH utilizando eletrodo modificado com mediador. M_{ox} : mediador oxidado; M_{red} : mediador reduzido.

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

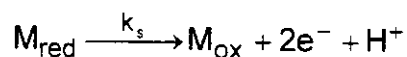
- Transferência de elétrons rápida entre o mediador imobilizado e o eletrodo (k_s).
- Alto valor da constante de velocidade global de reação (k_{obs});
- Reação reversível.
- Estabilidade na forma oxidada e reduzida.
- O potencial formal deve ser baixo, de tal forma que o sobrepotencial requerido para oxidação do NADH seja reduzido. O potencial considerado ótimo para a detecção amperométrica do NADH varia de -0,2 a 0,0 V vs. ECS (Gorton & Domínguez, 2002), pois nesta região de potenciais as interferências eletroquímicas são minimizadas.

Os mediadores usados podem ser classificados em dois tipos (Matsue *et al.*, 1987): compostos que aceitam apenas elétrons e compostos que aceitam elétrons e prótons. Este último engloba os compostos *orto* e *para*-quinonas, quinonaiminas, fenilenodiaminas, flavinas, dentre outros. A constante de velocidade global de reação, k_{obs} , devido à eletrooxidação de NADH para os eletrodos modificados com mediadores que aceitam dois elétrons-prótons (na ordem de $10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), em geral, é superior àqueles que aceitam apenas elétrons (Gorton, 1986; Katakis & Domínguez, 1997; Lobo *et al.*, 1997).

1.3 - Algumas considerações sobre a cinética e mecanismo de reação entre mediador e NADH

A constante de velocidade aparente de transferência de elétrons entre o mediador imobilizado e o eletrodo, k_s (s^{-1}), pode ser calculada a partir da variação do potencial de pico anódico e catódico dos voltamogramas cíclicos em função da velocidade de varredura de acordo com Laviron (Laviron, 1979, 1982). A separação dos picos de oxidação e redução será zero se a velocidade for suficientemente rápida comparada com a velocidade de varredura (Laviron, 1979; Sharp *et al.*, 1979). A variação do potencial de pico devida à variação da velocidade de varredura também pode ser causada por outros fatores (Laviron, 1982) como a resistência não compensada e movimento dos contra-íons. Os valores da k_s para negro de carbono oxidado foi de $1 s^{-1}$ (Cenas *et al.*, 1985); de $4-17 s^{-1}$ para fenoxazinas e fenotiazinas (Gorton *et al.*, 1984; Huck, 1999), $3,3-45 s^{-1}$ para a PQQ (Katz *et al.*, 1994) e $70 s^{-1}$ para nitrofluorenona (Mano & Kuhn, 1999). Para outros mediadores imobilizados, os valores de k_s são fornecidos na tabela I.1; vale salientar que estes valores de k_s variam com a metodologia empregada para a imobilização do mediador e com o material do eletrodo.

Em sistemas em que o mecanismo de reação eletrocatalítica ocorre por ECE (eletroquímico-químico-eletroquímico), inicialmente, o mediador na sua forma reduzida é oxidado por aplicação de um potencial cujo valor seja maior do que o potencial formal (E^0) do mediador:



em que k_s é constante de transferência de elétrons entre o mediador imobilizado e o eletrodo. A reação acima mostra que estão envolvidos dois elétrons e um próton, no entanto o número de elétrons pode variar entre 1 e 2, e o número de prótons de 0 a 2, dependendo da natureza do mediador e do pH da solução (Gorton & Dominguez, 2002).

Tabela I.1 - Mediadores usados na eletrooxidação de NADH.

Mediador	Configuração do eletrodo	E_{apl}/mV	E°/mV ; pH	Sensibilidade	Estabilidade	k_s s ⁻¹	k_{obs} dm ³ mol ⁻¹ s ⁻¹	Referência
Ácido clorogênico	Eletrodepositado sobre CV	n.d.	220 ^a pH 7	n.d.	Diminuição gradual da resposta do eletrodo modificado com n° de ciclos	8,6	n.d.	Zare & Golabi (1999)
Azul de meldola	Sol-gel /PC	-200 ^b	pH 7	n.d.	Diminuição gradual	n.d.	n.d.	Sampath & Lev (1998)
Azul de meldola Verde de metileno Riboflavina	Fosfato de zircônio/PC	n.d.	-121 ^b -40 ^b -140 ^b pH 7	n.d.	n.d.	n.d.	19 837 11 975 200	Munteanu et al. (2001)
Azul de metileno	Fosfato de zircônio/PC	250 ^b	150 ^b pH 7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Pessoa et al. (1997)
Azul de metileno	Sol-gel mistura de óxido zircônio e antimônio/PC	50 ^b	-100 ^b pH 6,8	10 µA L mmol ⁻¹ cm ⁻²	n.d.	n.d.	n.d.	Zaitseva et al. (2002)
Azul de metileno	Celulose/fosfato de zircônio	-80 ^b	-150 ^b	0,024 µA L mmol ⁻¹ cm ⁻²	n.d.	n.d.	n.d.	Borgo et al. (2002)
Azul do Nilo Azul de toluidina	Fosfato de zircônio/PC	n.d.	-424 ^b -300 ^b pH 7	n.d.	n.d.	31 11	n.d.	Malinauskas et al. (2000)

Azul do nilo	Fosfato de zircônio/PC	50 ^b	50 ^b pH 7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Pessoa <i>et al.</i> (1997)
Azul do nilo	Silica modificada com óxido de nióbio/PC	-200 ^b	-230 ^b pH 7	18 mA L mol ⁻¹ cm ⁻²	n.d.	n.d.	1400	Santos <i>et al.</i> (2002)
Azul do nilo	Fosfato de titânio/PC	0 ^b	-30 ^b	19	n.d.	n.d.	n.d.	Kubota <i>et al.</i> , (2000)
Azul metileno		100 ^b	20 ^b	16	n.d.	n.d.	n.d.	
Azul de toluidina		0 ^b	-60 ^b	11	n.d.	n.d.	n.d.	
Violeta de metileno		100 ^b	30 ^b	0,2 mA L mol ⁻¹	n.d.	n.d.	n.d.	
Riboflavina		n.d.	-350 ^b pH 7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Benzoquinona	Grafite pirolítico	150 ^a	120 ^a pH 7,3	n.d.	n.d.	n.d.	2,9x10 ⁶	Murthy & Sharma (1998)
Complexo de metal de transição de Fe, Ru, e Re(1,10-fenantrolina- 5,6-diona)	Eletrodeposição sobre CV	-50 ^b 0 ^b	pH 7	n.d.	n.d.	n.d.	~10 ³	Lorenzo <i>et al.</i> (1998)
Complexo de Os com fenantrolinadiona	Eletrodo grafite	200 ^a	75 ^a pH 6	n.d.	n.d.	n.d.	1,9x10 ³	Popescu <i>et al.</i> (1999)
Complexo de porfirina com Ru(III) e Co(III)	Carbono vítreo	850 ^a	700 ^a pH 4,7	n.d.	n.d.	boa	n.d.	Angnes <i>et al.</i> (1996)
Complexo de porfirina Ni(II)	Eletrodo de Au	640 ^a	820 ^a pH 7	n.d.	n.d.	n.d.	2.10 ⁵	Raj <i>et al.</i> (2000)

Diamante dopado com boro	Deposição sobre Si	580 ^b	pH 7	n.d.	A resposta do eletrodo se manteve estável por três meses	n.d.	n.d.	Fujishima et al. (1999)
2,6-Diclorofenolindofenol	Eletrodo de grafite	60 ^a	55 ^a pH 6,5	1,69 $\mu\text{A L mmol}^{-1}$	75% do seu valor inicial após um mês	18	n.d.	Florou et al. (1998)
3,4-Dihidroxibenzaldeído	Eletrodeposição sobre CV	170 ^b	~170 ^b pH 7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Lorenzo et al. (1998)
3,4-Dihidroxibenzaldeído	Eletropolimerização sobre PC	230 ^a	120 ^a pH 6,8	~471 $\mu\text{A L mmol}^{-1}\text{cm}^{-2}$	n.d.	n.d.	n.d.	Delbem et al. (2002)
Dopamina	Cistamina sobre Au	n.d.	70 ^b pH 7	86 $\mu\text{A L mmol}^{-1}\text{cm}^{-2}$	n.d.	1,06	n.d.	Sun et al. (1997)
FAD e FMN	Fibra de carbono modificado com TiO_2	0 ^b	-245 ^b -250 ^b pH 7,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Kubota et al. (1998)
Histidina	Depositado sobre Ag	250 ^b	n.d.	3 $\mu\text{A L mol}^{-1}$	n.d.	n.d.	n.d.	Long et al. (1997)
Metilvioleta	Fosfato de zircônio/PC	n.d.	200 ^b	50,9 $\mu\text{A L mmol}^{-1}\text{cm}^{-2}$	n.d.	n.d.	n.d.	Malinauskas et al. (2000)
Nitrofluorenona (2,4,7-trinitro-9-fluorenona)	Fosfato de zircônio/ PC	~350 ^a	250 ^a pH 7	n.d.	n.d.	n.d.	3,2x10 ⁶	Munteanu et al. (2002)

Nitrofluorenona (2-nitro-9-fluorenona)	CV	-50 ^a	~ -50 ^a	n.d.	n.d.	70	~10 ⁴	Mano & Kuhn (1999b)
Os(2,2'- bipiridina) ₂ (poli(vinilimi dazol) ₁₀ Cl ⁺)	Microfibra de carbono	n.d.	230 ^a pH 7,4	n.d.	n.d.	n.d.	50	Ju & Leech (1997)
Pirocatecol sulfonofetaleina	CV	n.d.	166 ^b pH 7	n.d.	n.d.	75% em relação ao um ciclo após oito horas	10 ⁴	Cai <i>et al.</i> , (2000)
Poli(anilina)- poli(estirenosulfonato)	Eletropolimerizado sobre CV	75 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Bartlett & Wallace (2000)
Poli(azul de toluídina)	CV	n.d.	-277 ^b pH 7	n.d.	n.d.	n.d.	4,8x10 ³	Cai & Xue (2000)
Poli(azul de toluídina)	CV	n.d.	-277 ^b pH 4,8	n.d.	n.d.	n.d.	6,35x10 ³	Cai & Xue (2000)
PQQ	Cistamina/eletrodo de Au	n.d.	-125 ^b pH 7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Katz <i>et al.</i> , (1994)
PQQ	Cistamina/eletrodo de Au	-60 ^a	pH 7,3	~ 0,16 $\mu\text{A L mmol}^{-1}\text{cm}^{-2}$	n.d.	45,5	n.d.	Willner & Riklin (1994)
Riboflavina	Fosfato de zircônio/PC	50 ^b	-259 ^b pH 7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Malinauska <i>et al.</i> (1999)
Riboflavina	Fosfato de zircônio/PC	-50 ^b	-220 ^b pH 7	n.d.	n.d.	n.d.	816	Kubota & Gorton (1999b)

Tionina Azure A Azure C	Dimetilssulfóxido/eletrodo de Au	n.d.	-30 ^b -85 ^b -45 ^b pH 7	n.d.	n.d.	n.d.	50 50 45	1,2x10 ⁵ 5,5x10 ⁴ 9,5x10 ⁴	Ohtani <i>et al.</i> , (1997)
Tionina	Cisternina/eletrodo de Au	150	140 ^b pH 7	n.d.	n.d.	Boa estabilidade quando estocado em tampão a 4 °C durante um mês	0,02	n.d.	Chen <i>et al.</i> , 1997

CV= eletrodo de carbono vítreo

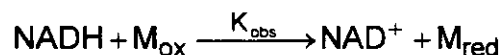
PC=pasta de carbono

n.d. = não determinado

^a = vs. Ag/AgCl

^b = vs. ECS

A etapa da catálise do NADH ocorre a partir da difusão de NADH da solução para a superfície do eletrodo na qual o mediador na sua forma oxidada é reduzido e o NADH é oxidado conforme a reação abaixo:



em que k_{obs} é a constante de velocidade global de reação. Esta pode ser determinada por voltametria cíclica (Andrieux & Savéant, 1978), porém, segundo Murray (1984), é mais apropriado determinar esse valor a partir de dados obtidos empregando eletrodo de disco rotatório (EDR) em combinação com a voltametria cíclica.

Para eletrodos modificados usados na eletrocatalise da oxidação de NADH, tem sido postulado por Gorton que a reação ocorre com a formação de um complexo intermediário [NADH-M] entre NADH e o mediador, análogo ao mecanismo de Michaelis-Menten, como mostra a reação abaixo:



Este comportamento explica algumas das observações do comportamento de diferentes derivados fenoxazinas e fenotiazinas (Gorton *et al.*, 1984; Persson, 1990; Ni *et al.*, 1990), tais como a diminuição da K_{obs} em função do aumento da concentração do NADH do meio.

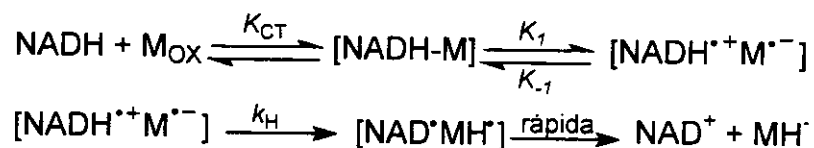
Combinando as constantes k_{+1} , k_{-1} e k_{+2} temos K_M :

$$K_M = (k_{-1} + k_{+2}) / k_{+1}$$

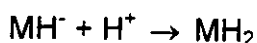
A constante de velocidade global de reação (K_{obs}) pode ser expressa por:

$$K_{\text{obs}} = k_{+2} / (K_M + C_{\text{NADH}})$$

O esquema da reação da formação de um complexo intermediário não explica completamente outros comportamentos observados tais como a dependência da atividade eletrocatalítica em função da estrutura do mediador e do pH da solução. Para explicar a influência do pH sobre a cinética de reação entre NADH e o mediador adsorvido (Gorton *et al.*, 1985), um mecanismo de reação de multietapas, similar aos das quinonas (Gorton *et al.*, 1985, Gorton, 1986 e Gorton, 1995), tem sido proposto:

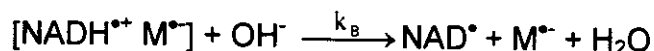


Na primeira etapa da reação, o NADH forma um complexo com o mediador e, posteriormente, um elétron é transferido $[\text{NADH}^{*\cdot}\text{M}^{*-}]$. A etapa principal da reação envolve a transferência de H^+ do $\text{NADH}^{*\cdot}$ para o mediador seguido pela rápida transferência do segundo elétron. A partir daí duas possíveis reações podem ocorrer, dependendo do mediador empregado, aceitor de um ou dois prótons:



Esta última etapa da reação deve ser bastante rápida em meio contendo prótons.

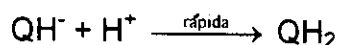
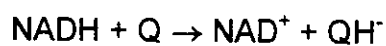
Outra possibilidade, em altos valores de pH, é o próton do NADH ser transferido para a base do meio, a qual pode ser uma hidroxila.



Neste caso, os radicais formados podem resultar no envenenamento do eletrodo.

De acordo com o descrito na literatura, para aceptores de elétrons e prótons, o mecanismo envolvido entre o mediador imobilizado com o NADH deve ocorrer em multietapas (ECE, eletroquímico/químico/eletroquímico).

Miller *et al.* têm usado técnica eletroquímica bem como espectroscopia (Kitani *et al.*, 1981, Kitani & Miller, 1981; Carlson & Miller, 1985) como ferramentas para estudar as reações envolvidas entre mediadores e NADH, nos quais os mediadores o-quinona ou diaminobenzeno mostraram rápida reação homogênea na eletrooxidação do NADH. O mecanismo proposto pelos autores ocorre pela transferência do hidrogênio da posição 4 do anel da nicotinamida para o oxidante (etapa determinante da reação), cujo mecanismo pode ser representado como na reação abaixo.



Inicialmente, Miller *et al.* consideram o mecanismo como sendo uma transferência direta do próton. Em seguida, ocorre a rápida protonação da QH^- , gerando a hidroquinona. Entretanto, um produto secundário estável parece ser formado, provocando o envenenamento do eletrodo.

Apesar de os eletrodos modificados com quinonas apresentarem boa propriedade catalítica, ocorre a perda da atividade da quinona com o tempo de uso. Segundo Jaegfeldt *et al.* (1983) a perda da atividade não está relacionada com a lixiviação do mediador imobilizado na superfície do eletrodo, mas com o bloqueio dos sítios catalíticos pela ligação do mediador com o NADH (figura I.4).

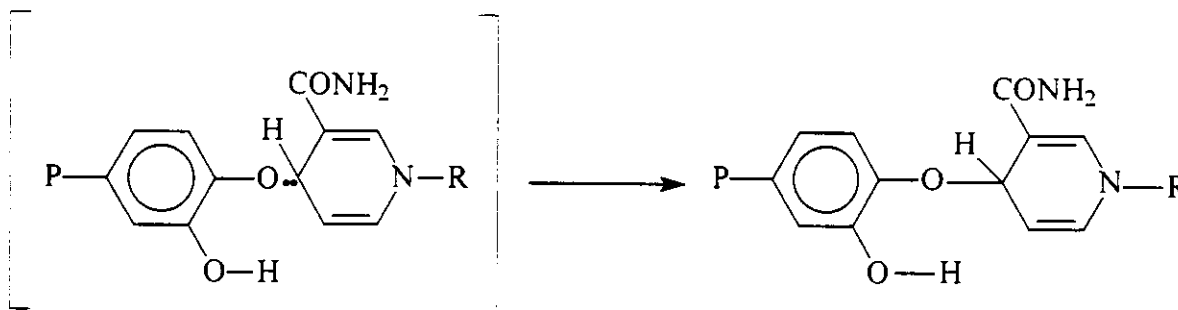


Figura I.4 - Mecanismo de desativação proposto para o mediador o-quinona adsorvido sobre eletrodo para a oxidação do NADH (Jaegfeldt & Johansson, 1983).

Tanaka *et al.* mostraram que as reações de oxidação de NADH comceptor de um (Fukuzumi *et al.*, 1984) e de dois elétrons (Fukuzumi *et al.*, 1984; Fukuzumi *et al.*, 1985) apresentam comportamentos semelhantes. O processo da reação ocorre pela transferência de carga intermediária e de acordo com um mecanismo de multietapas. Verificaram ainda que a estabilidade da transferência de carga varia com a polaridade do solvente e que o mecanismo é influenciado pela presença e concentração dos prótons.

I.4 - Tipos de mediadores utilizados na modificação dos eletrodos para NADH

Mediadores adequados para a oxidação de 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 I.5 (Gorton, 1986; Bartlett *et al.*, 2002).

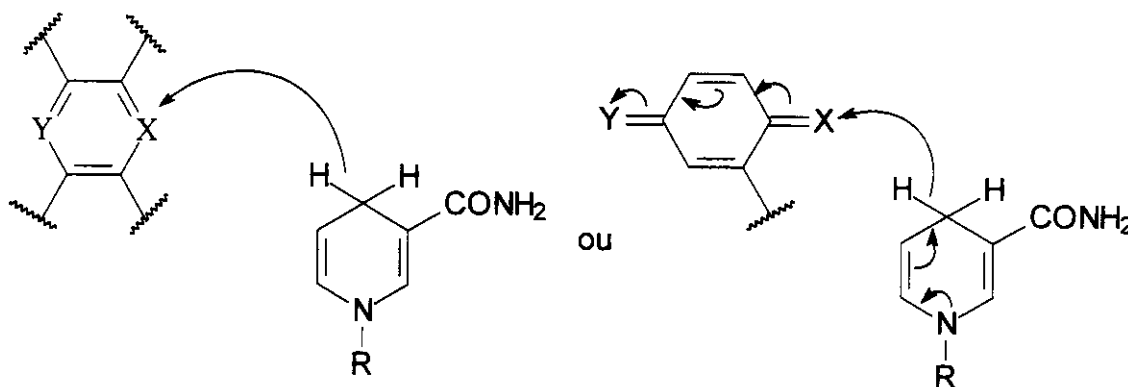


Figura I.5 - Mecanismo geral proposto para a eletrooxidação de NADH utilizando mediador.

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

orgânicos derivados da fenotiazina, fenoxatiazina, tionina e flavinas tem sido usada (figura I.6).

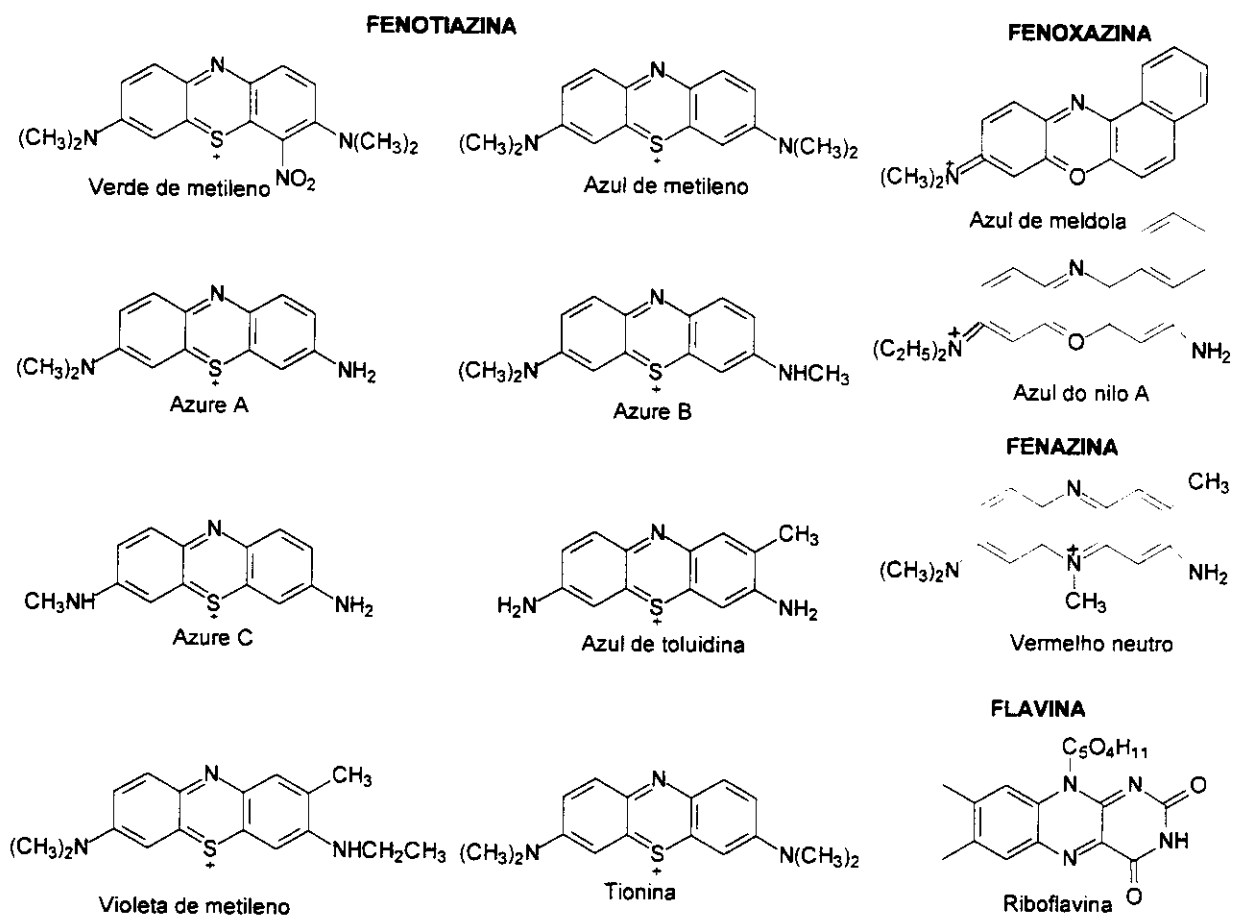


Figura I.6 - Estruturas de derivados de fenotiazina, fenoxazina, fenazina e flavinas.

Os valores do E° dos eletrodos modificados com corantes orgânicos por ligação covalente (Ohtani *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997) e por eletropolimerização (Cai & Xue, 1998; Cai & Xue, 1997) são dependentes do pH da solução. Estes materiais são bastante estáveis e, quando imobilizados sobre materiais inorgânicos, tais como sílica gel modificada com óxido ou fosfato de zircônio, verificou-se mudanças no valor do E° para regiões mais positivas, além de um valor de E° independente do pH da solução (Pessoa *et al.*, 1997; Zaitseva *et al.*, 2002). Esta mudança do E° foi atribuída à acidez da matriz. Algumas das características dos

mediadores que vêm sendo estudadas em eletrodos modificados podem ser observadas na tabela I.1.

Gorton (1986) tem demonstrado que existe uma correlação entre o $E^{\circ'}$ do mediador com a velocidade de reação da eletrooxidação de NADH para os corantes orgânicos, como pode ser observado na figura I.7. Nesse sentido, muitos pesquisadores buscam encontrar mediadores e métodos de imobilização que resultem em $E^{\circ'}$ na região considerada ideal de trabalho.

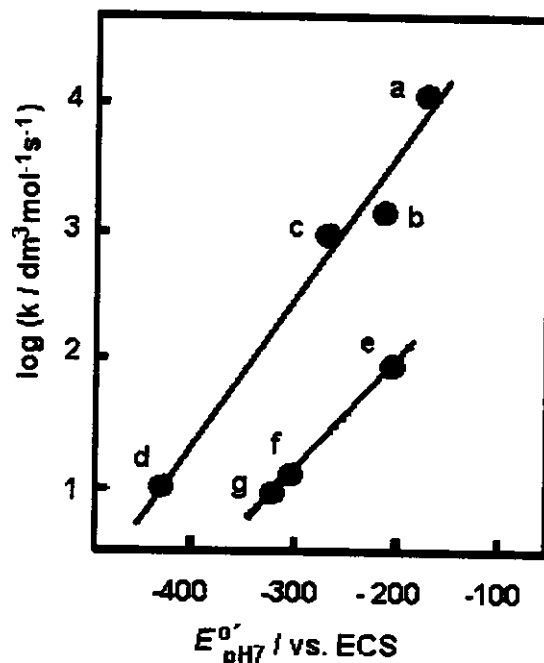


Figura I.7 - Variação da constante de velocidade de segunda ordem em função do potencial formal dos derivados de fenoxazina em 0,25 mol L⁻¹ de tampão fosfato, pH 7: (a) azul de meldola, 7-dimetilamino-1,2-benzofenoxazínio; (b) 1,2-benzofenoxazina-7-ona; (c) Resorufin, 3-hidroxifenoxazina-7-ona; (d) azul do nilo, 3-amino-7-dietilamino-1,2-benzofenoxazínio; (e) galocianina, ácido 7-dimetilamino-4-hidróxi-3-oxo-3 H-fenoxazina-1-carboxílico; (f) metil azul de capri; 3,7-bis(dimetilamino)fenoxazínio; (g) etil azul de capri 3,7-bis(dietilamino)fenoxazínio (Gorton, 1986).

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 ao da flavina em solução

(Gorton & Johansson, 1980; Narasimhan & Wingard, 1986; Sun *et al.*, 1996). No entanto, alguns trabalhos (Kubota & Gorton, 1999b; Kubota *et al.*, 2000) têm mostrado que o valor do $E^{\circ'}$ da flavina, quando esta é imobilizada sobre fosfato de Zr ou Ti, incorporada em eletrodo de pasta de carbono, deslocado para regiões mais positivas quando comparado com seu valor em solução. Outro fato bastante interessante é que o $E^{\circ'}$ independe do pH da solução. Se o pH não influencia o $E^{\circ'}$ do mediador, qualquer alteração se restringe à influência do pH sobre a velocidade de reação entre NADH e mediador (Munteanu *et al.*, 2001, Gorton & Domínguez, 2002; Kubota & Gorton, 1999b).

Mano & Kuhn (1999a e 1999b) vêm estudando uma nova família de compostos, derivados de nitrofluorenona. O grupo nitro deste composto não apresenta atividade eletrocatalítica para oxidar o NADH (figura I.8). No entanto, quando o grupo nitro é eletroquimicamente reduzido para hidroxilamina, esta pode ser oxidada para o grupo nitroso de forma reversível. Este mediador e seus derivados têm sido usados com eficiência na eletrooxidação de NADH quando adsorvidos sobre eletrodos de carbono vítreo com propriedades promissoras em termos de $E^{\circ'}$ e k_{obs} (Mano & Kuhn, 1999a; Mano & Kuhn, 1999b; Mano & Kuhn, 2001).

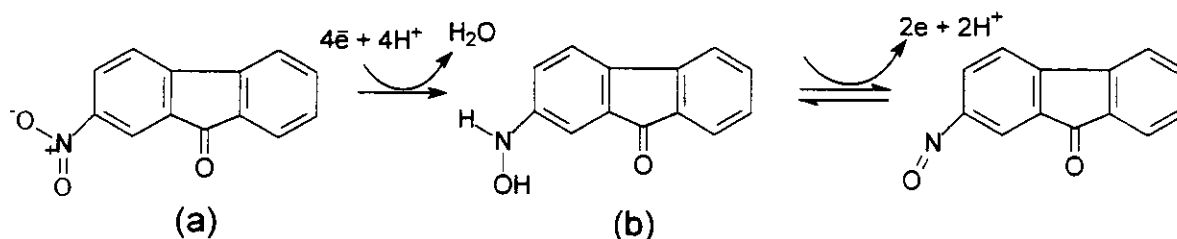


Figura I.8 - Estrutura do 2-nitro-9-fluorenona (a) e da sua forma ativa obtido da redução eletroquímica (b) (Mano & Kuhn, 1999).

No processo redox da nitrofluorenona estão envolvidos dois elétrons e dois H^+ , apresentando propriedade eletrocatalítica de oxidar o NADH, com constantes de velocidade catalítica, k_{obs} , na ordem de 10^3 e $10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$. O Ca^{2+} aumenta a velocidade de reação em cerca de cinco vezes em relação à ausência de íons Ca^{2+} (Mano & Kuhn, 2001). Num dos trabalhos mais recentes de Mano *et al.* (2002), 2,4,7-

trinitro-9-fluorenona foi imobilizada por adsorção sobre fosfato de zircônio (ZP). O material foi utilizado para a construção de eletrodos modificados de pasta de carbono. Quando o valor do E^0 foi comparado com o valor do composto adsorvido sobre o eletrodo de carbono vítreo em pH 7, o valor do E^0 mudou cerca de 300 mV vs. Ag/AgCl para regiões mais positivas, e o valor de k_{obs} foi na ordem de $10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$.

Outra classe de mediador pouco explorada por métodos eletroquímicos para a eletrooxidação de NADH é a pirroloquinolina quinona, PQQ, a qual é um cofator importante de várias enzimas desidrogenase (Duine *et al.*, 1978; Duine & Frank, 1980; Duine, 1991). Da mesma forma que as quinonas, a PQQ apresenta boa atividade eletroquímica e alta estabilidade e tem sido imobilizada sobre a superfície do eletrodo juntamente com enzimas (Katz *et al.*, 1997) e anticorpos (Katz & Willner, 1996). O grupo de Katz (Willner *et al.*, 1998) tem imobilizado a PQQ covalentemente ligada à superfície do eletrodo de ouro modificada com monocamada de cistamina. A PQQ imobilizada apresenta capacidade de eletrooxidar o NADH e esta propriedade eletrocatalítica aumenta consideravelmente na presença de íons Ca^{2+} , isto porque ocorre a formação de um complexo ternário entre o NADH, a PQQ e o Ca^{2+} facilitando a transferência de carga.

Outros trabalhos como o de Pariente *et al.* (1997) também observaram um significativo aumento da corrente eletrocatalítica da oxidação do NADH na presença de íons Ca^{2+} e 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 & Xue (2000) usaram eletrodo de carbono vítreo modificado com poli(azul de toluidina) usando diferentes cátions (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ba^{2+} , K^+ , Na^+ e NH_4^+). O maior aumento na propriedade eletrocatalítica foi observado apenas para íons Mg^{2+} e Ca^{2+} , aumento de cerca de duas vezes em relação à catálise na ausência destes íons. Cai e Xue concluíram que esse efeito dos íons deve ser um processo semelhante ao descrito por Katz, ou seja, a formação de um complexo ternário. A forma como esses cátions divalentes atuam no aumento da propriedade eletrocatalítica do NADH ainda não está definida.

Outros materiais que vêm sendo utilizados na modificação de eletrodos para a eletrooxidação de NADH são o diamante dopado com boro (Fujishima *et al.*, 1999) e o complexo de porfirina de Co^{III} / Ru^{III} (Angnes *et al.*, 1996). Estes materiais apresentam alta estabilidade e não apresentam envenenamento do eletrodo com o uso, porém, os valores de $E^{\circ'}$ são bastante elevados.

Como pode ser observado na literatura existe uma variedade de mediadores disponíveis a ser explorados e o desenvolvimento de novos métodos de imobilização tem possibilitado a construção de novos tipos de configurações de eletrodos modificados para a eletrooxidação de NADH.

Nos capítulos subseqüentes são propostos novos tipos de configurações de eletrodos de pasta de carbono para a eletrooxidação de NADH nos quais a sílica gel modificada com óxido de zircônio foi utilizada como suporte para imobilização de duas classes de mediadores (flavinas e quinonas) e incorporada na pasta.

I.5 - REFERÊNCIAS

- Andrieux, C.P.; Savéant, J. M. *J. Electroanal. Chem.*, 93 (1978) 163.
- Angnes, L.; Azevedo, C. M. N.; Araki, K.; Toma, H. E. *Anal. Chim. Acta*, 329 (1996) 91.
- Bartlett, P. N.; Simon, E.; Toh, C. S. *Bioelectrochemistry*, 56 (2002) 117.
- Bartlett, P. N.; Tebbutt, P.; Whitaker, R. G. *Prog. React. Kinet.*, 16 (1991) 55.
- Bartlett, P. N.; Wallace, E. N. K. *J. Electroanal. Chem.*, 486 (2000) 23.
- Blaedel, W. J.; Haas, R. G. *Anal. Chem.*, 42 (1970) 918.
- Blaedel, W. J.; Jenkins, R. A. *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1337.
- Blankespoor, R. J.; Miller, L. L. *J. Electroanal. Chem.*, 171 (1984) 231.
- Borgo, C. A.; Lazarin, A. M.; Gushikem, Y. *Sens. Actuators B.*, 6785 (2002) 1.
- Bresnahan, W. T.; Elving, P. J. *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 2379.
- Brett, A. M. O.; Brett, C. M. A. *Electroquímica*, Oxford University Press, Coimbra, 1996, p. 418.
- Burnett, J. N.; Underwood, A. L. *Biochemistry*, 4 (1965) 2060.
- Cai, C.-X.; Xue, K.-H. *J. Electroanal. Chem.*, 427 (1997) 147.
- Cai, C.-X.; Xue, K.-H. *Microchem. J.*, 64 (2000) 131.
- Cai, C.-X.; Xue, K.-H. *Talanta*, 47 (1998) 1107.
- Cai, C.-X.; Yin, L.-H.; Xue, K.-H. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 152 (2000) 179.
- Carlson B. W.; Miller, L. L.; Neta, P.; Grodkowski, J. *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (1984) 7233.
- Carlson, B. W.; Miller, L. L. *J. Am. Chem. Soc.*, 107 (1985) 479.
- Carlson, B. W.; Miller, L. L. *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 7453.
- Cénas, N. K.; Kanapienienė, J. J.; Kulys, J. J. *Org. React. Engl. Transl.*, 24 (1987) 70.
- Cenas, N.; Kanapienienė, J.; kulys, J. J. *J. Electroanal. Chem.*, 189 (1985) 163.
- Chen, H.-Y.; Zhou, D.-M.; Xu, J.-J.; Fang, H.-Q. *J. Electroanal. Chem.*, 422 (1997) 21.
- Chi, Q.-J.; Dong, S.-J. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 105 (1996) 193.

- Chibata, I. *Immobilized enzymes research and development*, John Wiley and Sons, Nova York, 1978, p. 12.
- Cunningham, A. J.; Underwood, A. L. *Biochemistry*, 6 (1967) 266.
- Delbem, M. F.; Baader, W. J.; Serrano, S. H. P. *Quím. Nova*, 25 (2002) 741.
- Duine, J. A. *Eur. J. Biochem.*, 200 (1991) 271.
- Duine, J. A.; Frank, J.; Verwiël, P. E. J. *Eur. J. Biochem.*, 108 (1980) 187.
- Duine, J. A.; Frank, J.; van Zeeland, J. K. *Biochim. Biophys. Acta*, 524 (1978) 277.
- Elving, P. J.; Bresnahan, W. T.; Moiroux, J.; Samec, Z. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 9 (1982) 365.
- Florou, A. B.; Prodromidis, M. I.; Karayannis, M. I.; Tzouwara-Karayanni, S. M. *Electroanalysis*, 10 (1998) 1261.
- Fujishima, A.; Rao, T. N.; Popa, E.; Sarada, B. V.; Yagi, I.; Tryk, D. A. *J. Electroanal. Chem.*, 473 (1999) 179.
- Fukuzumi, S.; Kondo, Y.; Tanaka, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, (1984) 673.
- Fukuzumi, S.; Nishizawa, N.; Tanaka, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, (1985) 371.
- Gorton, L. *Electroanalysis*, 7 (1995) 23.
- Gorton, L. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 82 (1986) 1245.
- Gorton, L.; Johansson, G.; Torstensson, A. *J. Electroanal. Chem.*, 196 (1985) 81.
- Gorton, L.; Csöregi, E.; Domínguez, E.; Emnéus, J.; Jönsson-Pettersson, G.; Marko-Varga, G.; Persson, B. *Anal. Chim. Acta*, 250 (1991) 203.
- Gorton, L.; Domínguez, E. *Electroanalysis, Reviews in Molecular Biotechnology*, 82 (2002) 371.
- Gorton, L.; Johansson, G. *J. Electroanal. Chem.*, 113 (1980) 151.
- Gorton, L.; Torstensson, A.; Jegfeldt, H.; Johansson, G. *J. Electroanal. Chem.*, 161 (1984) 103.
- Grodzowski, J.; Neta, P.; Carlson, M. W.; Miller, L. *J. Phys. Chem.*, 87 (1983) 3135.
- Guilbault, G. G., *Handbook of enzymatic methods of analysis*. Marcel Dekker, Nova York, 1976, 4.
- Hajizadeh, K.; Tang, H. T.; Halsall, H. B.; Heinemann, W. R. *Anal. Lett.*, 24 (1991) 1453.
- Huck, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 1 (1999) 855.

- Iler, R. K. *The Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons, Nova York (1979), cap. 6, pp. 626-633.
- Jaegfeldt, H.; Torstensson, A.; Gorton, L.; Tohansson, G. *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1979.
- Jaegfeldt, H. *J. Electroanal. Chem.*, 110 (1980) 295.
- Jaegfeldt, H.; Kuwana, T.; Johansson, G. *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 1805.
- Jaegfeldt, H.; Torstensson, A.; Johansson, G. *Anal. Chim. Acta*, 97 (1978) 221.
- Jensen, M. A.; Elving, P. J. *Biochim. Biophys. Acta*, 764 (1984) 310.
- Ju, H.; Leech, D. *Anal. Chim. Acta*, 345 (1997) 51.
- Katakis, I.; Domínguez, E. *Mikrochim. Acta*, 126 (1997) 11.
- Katz, E.; Schlereth, D.; Schmidt, H.-L. *J. Electroanal. Chem.*, 367 (1994) 59.
- Katz, E.; Heleg-Shabtai, V.; Willner, B.; Willner, I.; Bückmann, A. F. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 42 (1997) 95.
- Katz, E.; Willner, I. *J. Electroanal. Chem.*, 418 (1996) 67.
- Kitani, A.; Miller, L. L. *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 3595.
- Kitani, A.; So, Y.-H.; Miller, L. L. *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 7636.
- Kubota, L. T.; Gorton, L. *Electroanalysis*, 11 (1999a) 10.
- Kubota, L. T.; Gorton, L. *J. Solid State Electrochem.*, 3 (1999b) 370.
- Kubota, L. T.; Gorton, L.; Roddick-Lazilotta, A.; McQuillan, A. J. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 47 (1998) 39.
- Kubota, L. T.; Munteanu, F.; Roddick-Lanzilotta, A.; McQuillan, A. J.; Gorton, L. *Quím. Anal.*, 19 (2000) 15.
- Kulys, J.; Gorton, L.; Domínguez, E.; Ernéus, J.; Jarskog, H. *J. Electroanal. Chem.*, 372 (1994) 49.
- Laviron, E. in *Electroanalytical Chemistry*, ed. A. J. Bard, Dekker, Nova York, (1982) vol. 12, p. 53.
- Laviron, E. *J. Electroanal. Chem.*, 101 (1979) 19.
- Lobo, M. J.; Miranda, A. J.; Tuñón, P. *Electroanalysis*, 9 (1997) 191.
- Long, Y.-T.; Zou, J.; Chen, H.-Y. *Anal. Lett.*, 30 (1997) 2691.
- Lorenzo, E.; Pariente, F.; Hernández, L.; Tobalina, F.; Darder, M.; Wu, Q.; Maskus, M.; Abruña, H. D. *Biosens. Bioelectron.*, 13 (1998) 319.

- Ludvík, J.; Volke, J.; *Anal. Chim. Acta*, 209 (1988) 69.
- Malinauskas, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 49 (1999) 21.
- Malinauskas, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *J. Electroanal. Chem.*, 484 (2000) 55.
- Mano, N.; Jun, A. *Electrochem. Commun.*, 1 (1999a) 497.
- Mano, N.; Kuhn, A. *J. Electroanal. Chem.*, 498 (2001) 58.
- Mano, N.; Kuhn, A. *J. Electroanal. Chem.*, 477 (1999b) 79.
- Matsue, T.; Suda, M.; Uchida, I.; Kato, T.; Akiba, U.; Osa, T. *J. Electroanal. Chem.*, 234 (1987) 163.
- Moiroux, J.; Elving, P. J. *Anal. Chem.*, 51 (1979) 346.
- Munteanu, F. D.; Kubota, L. T.; Gorton, L. *J. Electroanal. Chem.*, 509 (2001) 2.
- Munteanu, F. D.; Mano, N.; Kuhn, A.; Gorton, L. *Bioelectrochemistry*, 56 (2002) 67.
- Murray, R. W. *Chemically modified electrodes*. In: Bard, A. J. (Ed.), *Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, Nova York, 13 (1984) p. 191.
- Murthy, A. S. N.; Sharma, J. *Talanta*, 45 (1998) 951.
- Narasimhan, K.; Wingard, L. B.; *J. Mol. Catal.*, 34 (1986) 263.
- Ni, F.; Feng, F.; Gorton, L.; Cotton, T. M. *Langmuir*, 6 (1990) 66.
- Ohtani, M.; Kuwabata, S.; Yoneyama, H. *J. Electroanal. Chem.*, 422 (1997) 45.
- Pariante, F.; Lorenzo, E.; Tobalina, F.; Abruña, H. D. *Anal. Chem.*, 67 (1997) 3936.
- Peixoto, C. R. M.; Kubota, L. T.; Gushikem, Y. *Anal. Proceed. Including Anal. Commun.*, 32 (1995) 503.
- Persson, B. *J. Electroanal. Chem.*, 287 (1990) 61.
- Persson, B.; Gorton, L. *J. Electroanal. Chem.*, 292 (1990) 115.
- Pessoa, C. A.; Gushikem, Y.; Kubota, L. T.; Gorton, L. *J. Electroanal. Chem.*, 431 (1997) 23.
- Popescu, I. C.; Domínguez, E.; Narváez, A.; Pavlov, V.; Katakis, I. *J. Electroanal. Chem.*, 464 (1999) 208.
- Raj, C. R.; Gobi, K. V.; Ohsaka, T. *Bioelectrochemistry*, 51 (2000) 181.
- Ravichandram, K.; Baldwin, R. P. *Anal. Chem.*, 55 (1983) 1586.
- Samec, Z.; Elving, P. J. *J. Electroanal. Chem.*, 144 (1983) 217.
- Sampath, S.; Lev, O. *J. Electroanal. Chem.*, 446 (1998) 57.
- Santos, A. S.; Gorton, L.; Kubota, L. T. *Electrochim. Acta*, 47 (2002) 3351.

- Sharp, M.; Petterson, M.; Edström, K. *J. Electroanal. Chem.*, 95 (1979) 123.
- Sun, J.-J.; Xu, J.-J.; Fang, H.-Q.; Chen, H.-Y. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 44 (1997) 45.
- Sun, W.; Kong, J.; Deng, J. *Anal. Lett.*, 29 (1996) 2425.
- Tatsue, T.; Suda, M.; Uchida, I.; Kato, T.; Osa, T. *J. Electroanal. Chem.*, 234 (1987) 163.
- Torstesson, A.; Gorton, L. *J. Electroanal. Chem.*, 130 (1981) 199.
- Tse, D. C.-S.; Kuwana, T. *Anal. Chem.*, 50 (1978) 1315.
- Walcarius, A. *Electroanalysis*, 10 (1998) 1217.
- Willner, I.; Katz, E.; Patolsky, F.; Bückmann, A. F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, (1998) 1817.
- Willner, I.; Riklin, A. *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1535.
- Zaitseva, G.; Gushikem, Y.; Ribeiro, E. S.; Rosatto, S. S. *Electrochim. Acta*, 47 (2002) 1469.
- Zare, H. R.; Golabi, S. M. *J. Electroanal. Chem.*, 464 (1999) 14.

CAPÍTULO II

II.1 - INTRODUÇÃO

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 dehidrogenação, de transferência de elétrons, dentre outras (Bruice, 1980; Bruice, 1984). A versatilidade química das flavinas e o mecanismo de ação das flavoproteínas são questões de extrema importância e por isso são objetos de muitos estudos (Massey, 1995; Schmidt & Schuhamann, 1996; Bartlett *et al.*, 1991).

A riboflavina (RF), vitamina B₂, é um precursor essencial das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) (Hemmerich *et al.*, 1965). Os diferentes tipos de flavinas têm em comum o anel aloxazina, o qual é o local onde ocorrem os processos redox (figura II.1.1).

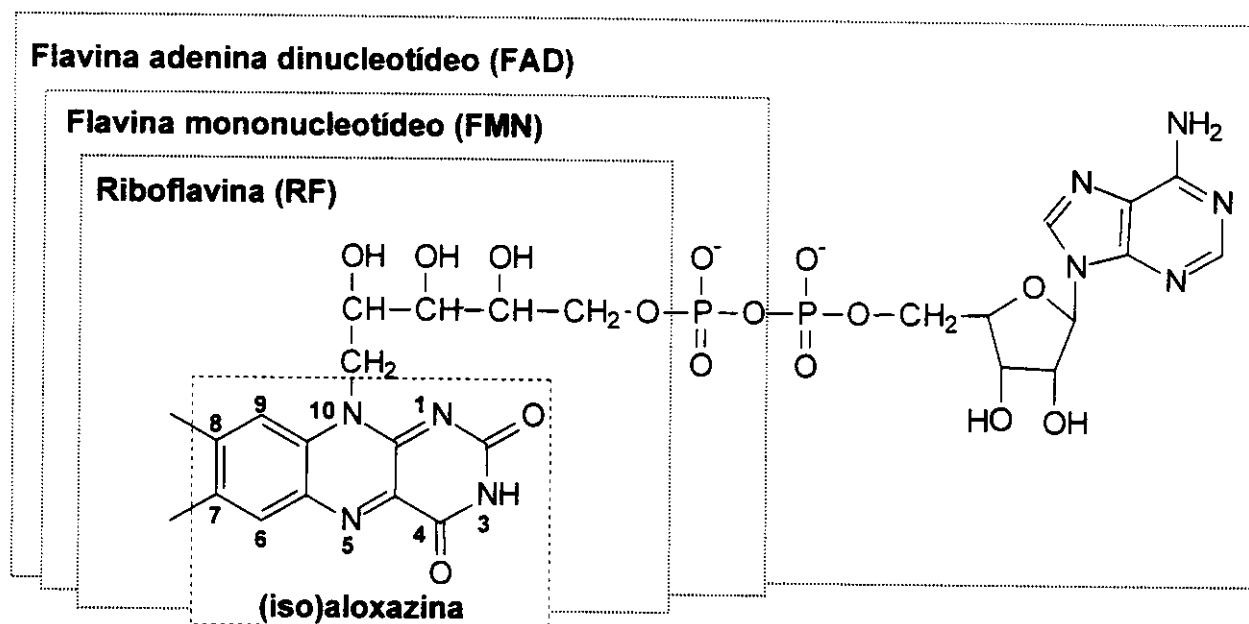


Figura II.1.1 - Representação da estrutura química e nomenclatura das flavinas no estado oxidado. Adaptada da referência de Hemmerich *et al.* (1965).

A natureza do grupo ligado na posição N-10 (figura II.1.1) do anel aloxazina é o que diferencia uma flavina da outra, podendo influenciar na sua orientação quando adsorvida sobre a superfície de algum eletrodo (Birss *et al.*, 1997; Narasimhan & Wingard, 1986), deixando o sítio ativo (anel aloxazina) mais ou menos disponível para a reação catalítica. Em geral, quanto mais próximo da superfície estiver o sítio ativo mais rápida será a transferência de elétrons da flavina para o eletrodo.

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 (Friedman, 1999; Malinauskas, 1999). Outro interesse é estudar a reação de transferência de elétrons entre a flavina e a nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH) (Birss *et al.*, 1997; Cosnier *et al.*, 1997; Bergel & Comtat, 1991), uma vez que eles estão envolvidos na formação de ATP no metabolismo em seres vivos, em que 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 o fato de as flavinas em solução aquosa, sem a presença da enzima, não apresentarem alta capacidade para oxidar NADH (-560 mV vs. ECS) em razão de o E° das flavinas ser muito negativo (-430 mV) para permitir que a reação redox ocorra. Os pesquisadores têm contornado este problema usando derivados de flavinas (Massey & Hemmerich, 1978; Dixon, 1971; Maedayorita *et al.*, 1991) ou imobilizando flavinas sobre diferentes matrizes causando mudança no E° para valores mais positivos (Kubota & Gorton, 1999a; Kubota & Gorton 1999b; Kubota *et al.*, 2000). No entanto, na maioria dos casos com a imobilização da flavina, não houve o deslocamento do E° 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 (Gorton & Johansson, 1980), imobilizada sobre

monocamadas de mercaptana (Durfor *et al.*, 1988) ou tiuréia (Edwards *et al.* 1989), ligadas ao metal nobre ou usando a técnica de imobilização de Langmuir-Blodgett (Ueyama *et al.*, 1989). 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 (Kubota & Gorton, 1999b; Kubota *et al.* 2000). Esta mudança foi atribuída à 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 (Kubota & Gorton, 1999a) ou TP (Kubota *et al.*, 2000), mas foram fortemente adsorvidas sobre óxido de titânio disperso sobre fibra de carbono (Kubota *et al.*, 1998). Nesses estudos as flavinas, que foram adsorvidas nos materiais inorgânicos e incorporadas em pasta de carbono, apresentaram propriedade eletrocatalítica de eletrooxidar o NADH. Estruturas semelhantes às das flavinas, tais como corantes orgânicos, têm sido imobilizadas sobre sílica modificada com óxido de zircônio e incorporadas 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 (Zaitsena *et al.*, 2002; Schiavo *et al.*, 2000; Gushikem & Rosatto, 2001), e aquelas estruturas apresentaram propriedade eletrocatalítica de oxidar o NADH.

Baseados nas observações descritos na literatura referente à imobilização das flavinas sobre diferentes materiais inorgânicos, neste trabalho propomos a imobilização das flavinas sobre a superfície da sílica gel modificada com óxido de zircônio.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo estudar a interação envolvida entre flavinas (RF, FMN e FAD) e a matriz sílica gel modificada com óxido de zircônio (Si:Zr), incorporadas em pasta de carbono e avaliar a potencialidade destes materiais na eletrooxidação de NADH.

II.2 - PARTE EXPERIMENTAL

II.2.1 - Reagentes

A sílica gel 60, com granulometria entre 0,040-0,063 mm e área específica de 460-520 m²g⁻¹ (Merck-Alemanha), foi previamente ativada durante 6 horas a 100 °C. Os reagentes oxiclreto de zircônio (Vetec-Brasil), grafite em pó (Aldrich-USA), óleo mineral (Schering-Ploung Ltda.- Brasil), riboflavina, RF (Sigma-Japão), flavina mononucleotídeo, FMN (Sigma-USA), flavina adenina dinucleotídeo, FAD (Sigma-Japão), β-nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida, NADH (Merck-Alemanha) foram de grau analítico e foram utilizados sem tratamento prévio, bem como os demais reagentes descritos abaixo.

Tampões

- 4,2-hidroxietil-piperazina-1-etanossulfônico, HEPES (Sigma-USA); ácido 1,4-piperazina-dietano sulfônico, PIPES (Sigma-USA); tris-hidroximetil-aminometano, TRIS (Sigma-USA) e KH₂PO₄ (Synth-Brasil).

Eletrólitos de suporte

- NaCl (Nuclear-Brasil), NaNO₃ (Nuclear-Brasil), Na₂SO₄ (Nuclear-Brasil), NaClO₄ (Merck-Alemanha), KNO₃ (Nuclear-Brasil), LiNO₃ (Vetec-Brasil), NH₄NO₃ (Nuclear-Brasil), Ca(NO₃)₂.4H₂O (Synth-Brasil).

Ácido e base para ajuste de pH da solução

- HCl (Merck-Alemanha), HNO₃ (Merck-Alemanha), NaOH (Vetec-Brasil), LiOH (Vetec-Brasil), NH₄OH (Nuclear-Brasil) e H₃PO₄ (Synth-Brasil).

O pH das soluções foi ajustado utilizando o ácido ou a base contendo o íon comum do eletrólito de suporte empregado. A solução de NaOH (*Nuclear-Brasil*) foi usada para o ajuste de pH das soluções tampão.

Todas as soluções foram preparadas em água purificada pelo sistema Milli-Q.

II.2.2 - Equipamentos

A fluorescência de raios X, espectrômetro Spectrace 5000, foi usada para quantificar o zircônio depositado sobre a sílica gel.

O aparelho da Micrometrics Instrument Corporation, modelo FlowSorb 2300 (BET), foi empregado para determinar a área superficial específica.

O analisador elementar 2400 CHN, Perkin Elmer, foi empregado na determinação da quantidade das flavinas adsorvida sobre a superfície da sílica gel modificada.

O espectrofotômetro da Beckman, DU 640, foi empregado para as medidas espectrofométricas das flavinas dissolvidas em solução e imobilizadas sobre Si:Zr, usando cubeta de 10 mm e 1 mm de caminho ótico, respectivamente.

O potenciostato modelo PGSTAT30 (*EcoChemie*) da AUTOLAB®, interfaceado a um microcomputador, foi usado nos estudos eletroquímicos.

O potenciômetro da Corning 350 com um eletrodo de vidro combinado foi usado para o ajuste do pH das soluções.

II.2.3 - Procedimento experimental

II.2.3.1 - Modificação da superfície da sílica gel

A modificação da superfície da sílica com oxiclreto de zircônio (IV) foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Peixoto (Peixoto, 1992). Foram adicionados 50 g de sílica gel 60 (*Merck*) a uma solução contendo 16,28 g de oxiclreto de zircônio (IV) dissolvidos em 300 mL de água deionizada. A mistura foi

mantida sob refluxo durante 6 horas com agitação mecânica (figura II.2.1). A temperatura do meio reacional foi mantida em cerca de 85 °C. Posteriormente, a mistura foi filtrada, lavada com água deionizada e seca a 100 °C. O material obtido foi denominado Si:Zr.

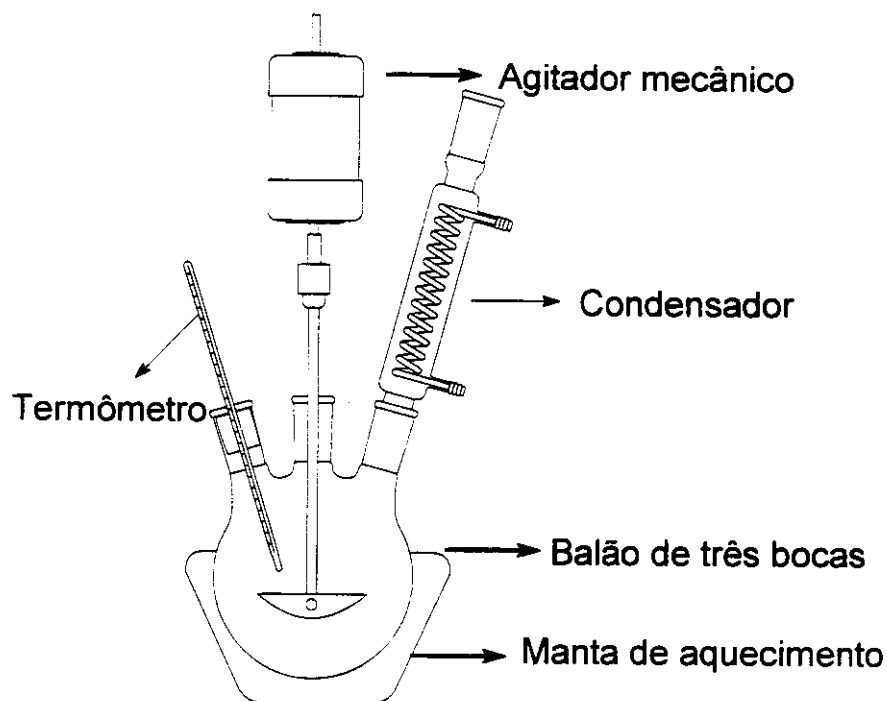


Figura II.2. 1 – Sistema utilizado para fazer a reação de modificação da sílica gel com oxicloreto de zircônio.

II.2.3.2- Quantificação do óxido de zircônio enxertado na sílica gel

Foram preparados padrões utilizando sílica gel misturada com quantidades conhecidas de oxicloreto de zircônio hidratado ($\text{ZrOCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sendo este material sólido macerado até se obter um material uniforme. A precaução em relação à uniformidade da granulometria foi tomada devido à sensibilidade da técnica de fluorescência de raios X variar em função do tamanho das partículas. A tabela II.2.1 mostra a porcentagem e a quantidade de zircônio e de sílica utilizada na preparação dos padrões de zircônio.

Tabela II.2.1 - Preparação dos padrões para quantificar zircônio.

Massa do $\text{ZrOCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (g)	Massa SiO_2 (g)
0,010	0,991
0,020	0,981
0,030	0,970
0,040	0,960
0,050	0,950
0,090	0,911
0,111	0,889

As condições de irradiação para quantificar o zircônio foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros:

voltagem 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.

A partir dos padrões mostrados na tabela II.2.1, foi construída uma curva analítica, a qual foi usada para a quantificação do zircônio adsorvido na sílica.

II.2.3.3 - Imobilização da flavina sobre a superfície da sílica modificada

Na imobilização de FAD e FMN sobre a sílica modificada com óxido de zircônio (Si:Zr), foram adicionados 400 mg da matriz Si:Zr em 10 mL da solução flavina

1 mmol L⁻¹, e o tempo de imobilização foi de 1,5 hora, enquanto na imobilização da RF utilizaram-se 20 mL da solução de 0,5 mmol L⁻¹ de RF com tempo de 3 horas. Após o tempo de imobilização a mistura foi filtrada sob vácuo e armazenada sob refrigeração. Todo o procedimento experimental envolvido desde a imobilização da flavina até o armazenamento foi realizado na ausência de luz, devido à fotossensibilidade das flavinas. Os materiais obtidos foram denominados Si:Zr:FAD; Si:Zr:FMN e Si:Zr:RF.

II.2.3.4 - Determinação da quantidade de flavina adsorvida sobre a superfície da matriz

A quantidade da RF, FAD e FMN imobilizada sobre a superfície da Si:Zr foi obtida por análise elementar, CHN, que consiste no método de combustão para converter os elementos de uma determinada amostra em gases simples tais como CO₂, H₂O e N₂. Somente os dados do nitrogênio foram considerados para calcular a quantidade de flavinas imobilizadas.

II.2.3.5 - Espectro de UV-visível da flavina imobilizada e da flavina em solução

Os espectros de absorção da Si:Zr:RF, Si:Zr:FMN ou Si:Zr:FAD foram obtidos misturando pequena quantidade de Si:Zr:flavina (material sólido) em óleo mineral (nujol) cujo branco utilizado foi o próprio nujol. Já os espectros de absorção das flavinas em solução foram obtidos para uma concentração de $7,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de

flavina, sendo o branco a água. As cubetas de quartzo usadas nos experimentos apresentavam um caminho ótico de 1 mm e de 1 cm para flavina imobilizada e flavina em solução, respectivamente. A região do espectro estudada foi de 300 a 800 nm.

II.2.3.6 - Preparação da pasta de carbono incorporando a sílica modificada

A melhor proporção de material Si:Zr:flavina e grafite em pó na pasta de carbono foi previamente estudada. A pasta de carbono foi preparada a partir da mistura de 56% de Si:Zr:flavina (Si:Zr:FAD ou Si:Zr:FMN ou Si:Zr:RF) com 44% de grafite em pó e óleo mineral (80 μ L por 100 mg de massa total), a qual foi misturada até formar uma pasta homogênea. Esta foi colocada na cavidade do eletrodo de trabalho (figura II.2.2), pressionada e polida sobre a superfície de vidro até obter uma superfície lisa.

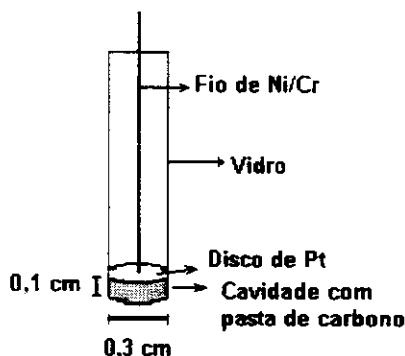


Figura II.2.2 - Representação esquemática do eletrodo de pasta de carbono.

II.2.3.7 - Medidas eletroquímicas

As medidas de voltametria cíclica foram realizadas em uma célula de vidro contendo compartimentos para três eletrodos com entrada e saída para gás (N_2), como pode ser observado na figura II.2.3.

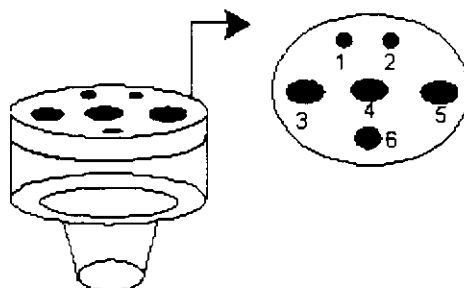
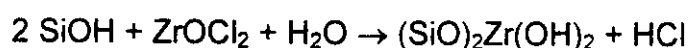


Figura II.2.3 - Representação esquemática da célula eletroquímica. Entrada de gás sobre a superfície da solução (1) e na solução (2), local do eletrodo auxiliar (3), do eletrodo de trabalho (4), do eletrodo de referência (5) e adição da amostra (6).

II.3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

A reação de modificação da superfície da sílica gel com oxicloreto de zircônio (IV) pode ser representada pela seguinte reação, de acordo com o descrito na literatura (Andreotti *et al.*, 1992):



Os átomos de cloro do oxicloreto de zircônio (IV) reagem com um ou dois grupos silanóis ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$) (Iler, 1979) na superfície da sílica gel.

II.3.1 – Caracterização da sílica gel modificada com zircônio

A quantidade de zircônio por grama de material adsorvida sobre superfície da sílica gel foi de $1,2 \pm 0,1 \text{ mmol g}^{-1}$, sendo determinada por fluorescência de raios X. A análise da área superficial específica, BET, mostrou que o material apresenta elevada área superficial específica, de $426 \pm 20 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, o que é uma das vantagens de sua utilização como suporte, permitindo que uma maior quantidade de espécie seja adsorvida sobre a matriz Si:Zr.

II.3.2 - Imobilização das flavinas sobre Si:Zr

As flavinas RF, FMN e FAD foram inicialmente imobilizadas nas mesmas condições experimentais; sendo que a adsorção da FAD e FMN sobre a superfície da Si:Zr resultou em um material com coloração amarelo intenso, enquanto a adsorção da

riboflavina resultou em um material amarelo claro. Um menor tempo de imobilização foi requerido para a FAD e as FMN, uma vez que foi verificada uma maior rapidez da adsorção destas sobre o material Si:Zr do que para RF, a qual pode ser atribuído ao grupo fosfato presente na cadeia de FAD e FMN. A maior quantidade de FMN e FAD adsorvida sobre a matriz pode ser atribuída à grande afinidade do zircônio pelos grupos fosfatos presentes na estrutura das flavinas (Vesely & Pekárek, 1972). Entretanto, outros tipos de interações devem estar envolvidos: apesar de a RF não possuir grupo fosfato na sua estrutura, ela também foi adsorvida sobre a Si:Zr. Comportamento semelhante para FAD e FMN, em relação à RF, adsorvidas sobre TiO_2 foi relatado por Shinohara *et al.* (1991).

A quantidade de flavinas adsorvidas sobre Si:Zr, determinada por análise elementar, foi de 19 ± 4 , 33 ± 9 e $28 \pm 5 \mu\text{mol g}^{-1}$ para RF, FMN e FAD, respectivamente.

II.3.3 - Espectros na região do UV-visível das flavinas

Os espectros na região do UV-visível das flavinas em solução e imobilizadas sobre Si:Zr foram obtidos com intuito de conseguir maiores informações sobre a interação entre as flavinas e a matriz. As flavinas, na sua forma oxidada, apresentam bandas de absorção características em 370 e 444 nm, na região do espectro entre 300 a 800 nm (Spetnagel, 1978). Comparando os espectros das flavinas adsorvidas sobre Si:Zr com os das flavinas em solução (figura II.3.1, figura II.3.2 e figura II.3.3), pode ser observada mudança no espectro apenas para a RF adsorvida, o que não acontece com a FMN (figura II.3.2) e FAD adsorvidas (figura II.3.3). Estas informações reforçam que o tipo de imobilização de FAD e FMN sobre a superfície Si:Zr é diferente da RF, e sugere que a interação entre Si:Zr e RF deve ocorrer pelo anel aloxazina.

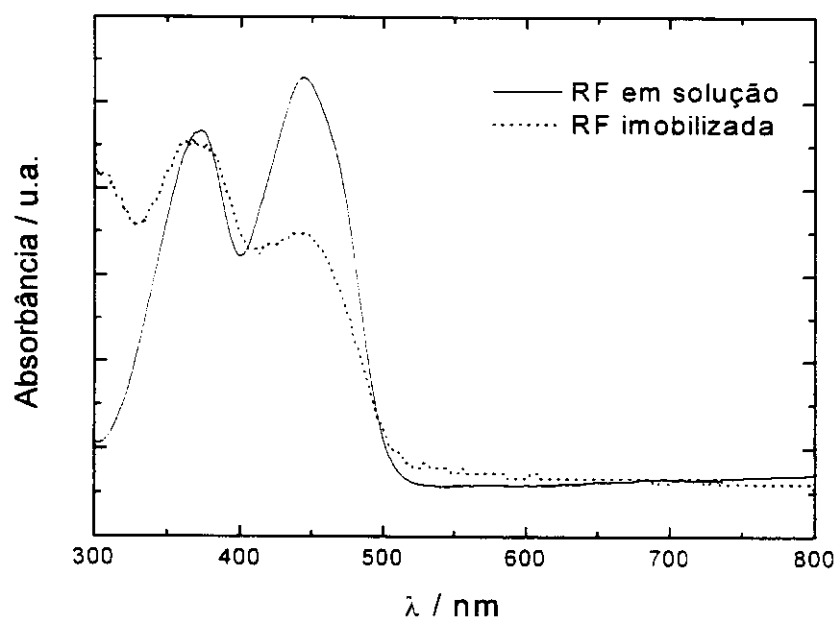


Figura II.3.1- Espectro na região do UV-visível para a RF em solução e imobilizada sobre Si:Zr.

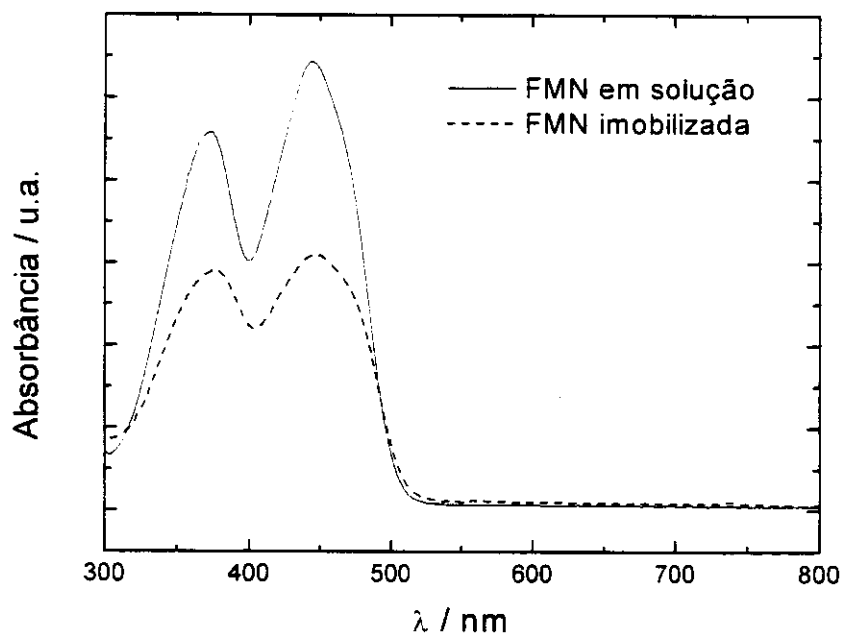


Figura II.3.2 - Espectro na região do UV-visível para a FMN em solução e imobilizada sobre Si:Zr.

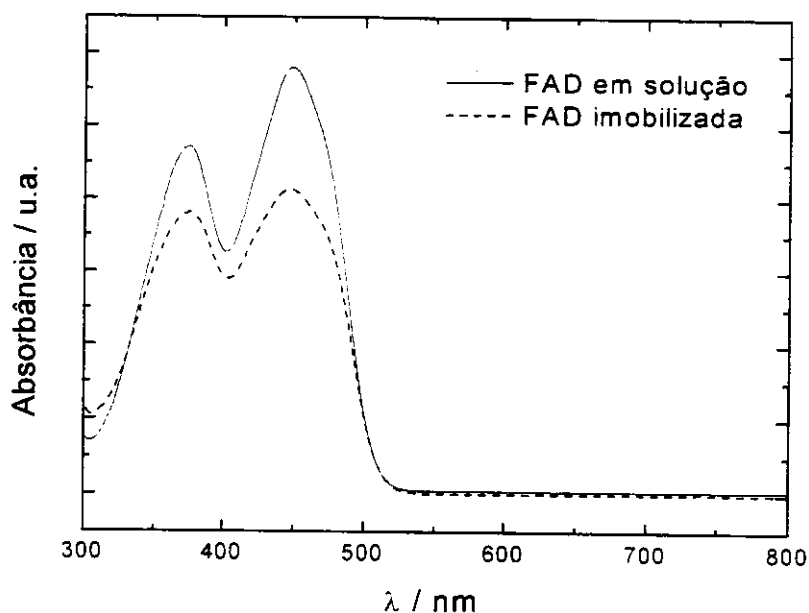


Figura II.3.3 - Espectro na região do UV-visível para a FAD em solução e imobilizada sobre Si:Zr.

II.3.4 - Comportamento eletroquímico das flavinas imobilizadas sobre Si:Zr

O voltamograma cíclico obtido para eletrodo de pasta de carbono modificado com Si:Zr (figura II.3.4) não apresentou nenhum pico redox entre -0,65 a -0,20 V vs. ECS. Porém, com a imobilização da RF sobre Si:Zr verificou-se um pico de oxidação e outro de redução, os quais são provenientes da RF.

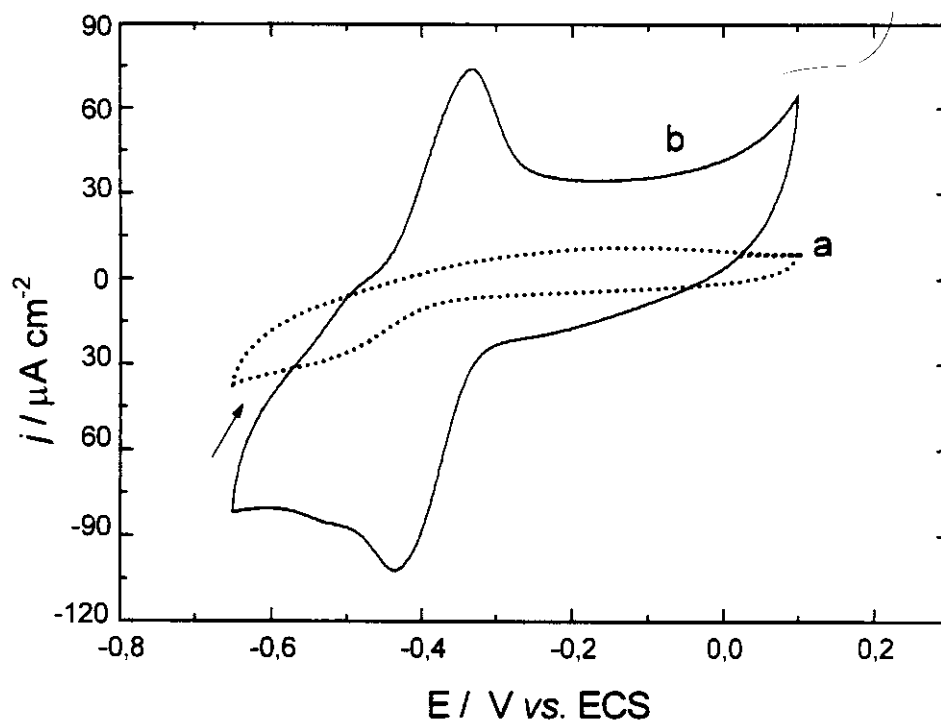


Figura II.3.4 - Voltamogramas cíclicos obtidos (após a estabilização do voltamograma, 5º ciclo) para os eletrodos de pasta de carbono modificado com Si:Zr (a) e Si:Zr:RF (b) a 20 mV s^{-1} em solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.

A flavina pode aceitar dois elétrons do eletrodo e dois prótons da solução, reduzindo para FADH_2 , como mostra a figura II.3.5.

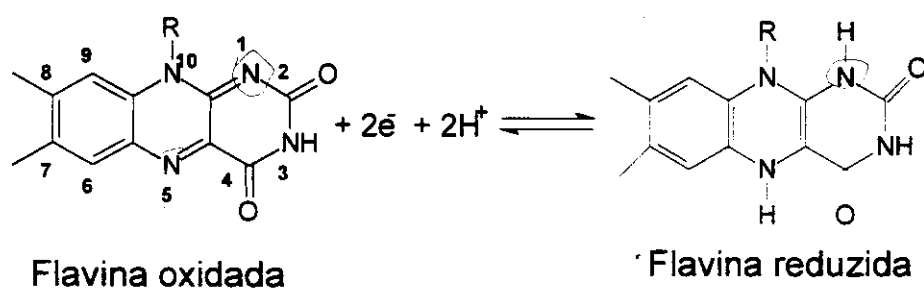


Figura II.3.5 - Representação do processo redox das flavinas.

Após ciclos sucessivos não foram verificadas quedas significativas das correntes de pico anódico e catódico, isto porque a RF deve estar fortemente adsorvida sobre a matriz Si:Zr (figura II.3.6).

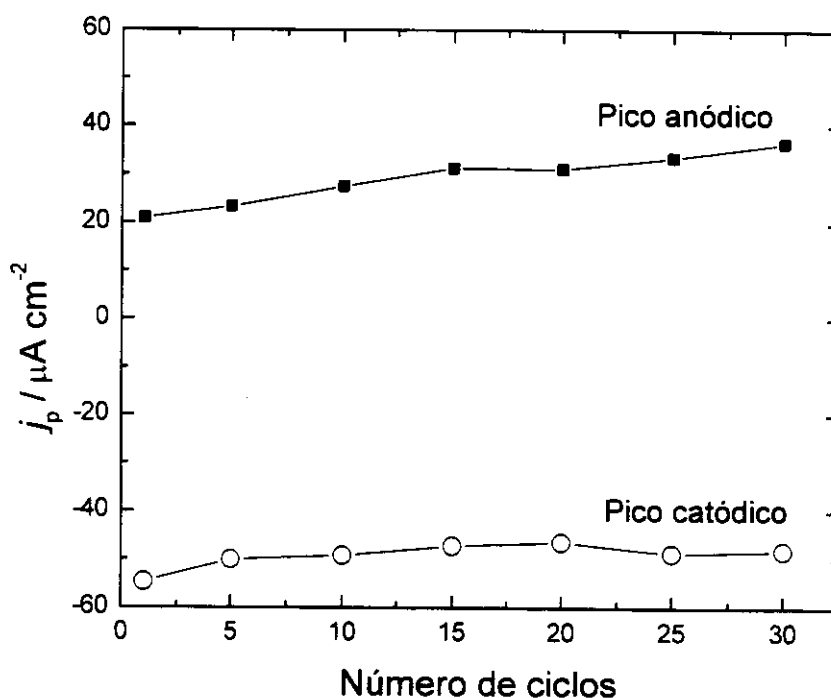


Figura II.3.6 - Densidades de correntes de picos (j_p) em função do número de ciclos obtidos para o eletrodo Si:Zr:RF a 20 mV s^{-1} . Solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.

A proporção de Si:Zr:RF/grafite na pasta de carbono foi avaliada. Aumentando a quantidade de Si:Zr:RF de 50% para 70% (m/m), ilustrado na figura II.3.7, verificou-se um aumento na intensidade de corrente de pico anódico e catódico. Contudo, acima de 56% do material, a superfície do eletrodo muda com o tempo de uso. Além disso, verificou-se que o aumento da quantidade de Si:Zr:RF na pasta de carbono acarreta um aumento na separação do potencial de pico anódico e de catódico (ΔE_p), como pode ser verificado na tabela II.3.1, o qual deve ser decorrente do aumento da resistência do material. Desta forma, a proporção de 56% de Si:Zr:flavina e 44% de grafite em pó foi utilizada para a preparação dos eletrodos de pasta de carbono.

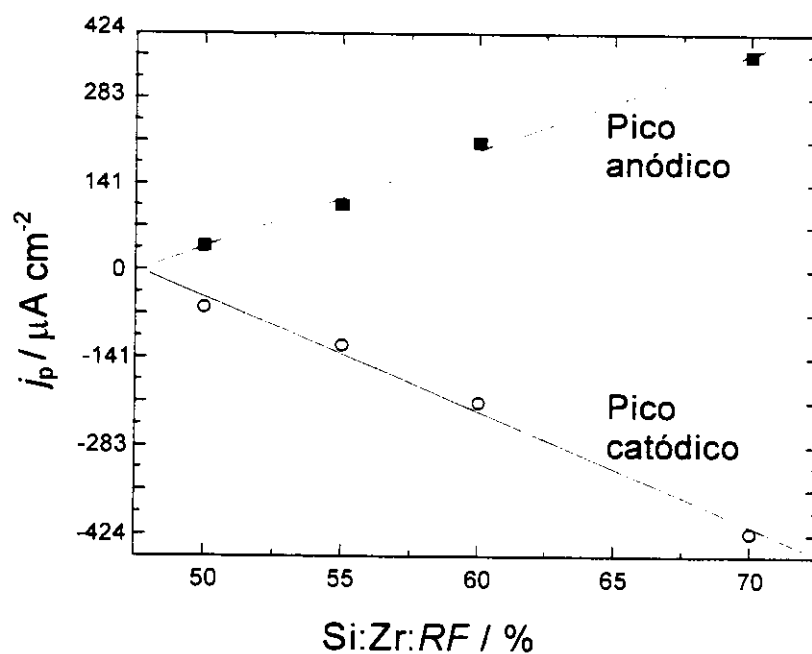


Figura II.3.7 – Variação da densidade de corrente de pico (j_p) em função da quantidade de Si:Zr:RF % (m/m) utilizada na pasta de carbono. Solução de KNO_3 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

Tabela II.3.1 - Variação do ΔE_p em função da quantidade de Si:Zr:RF na pasta de carbono. Solução de KNO_3 0,1 mol L⁻¹, pH 7,1 e velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

% Si:Zr:RF	ΔE_p / mV vs. ECS
50	100
56	104
60	185
70	200

Os perfis dos voltamogramas obtidos para RF, FMN e FAD adsorvidas sobre a Si:Zr foram similares para as três flavinas estudadas, como pode ser observado na figura II.3.8. O potencial formal, $E^{\circ'}$, obtido a partir da equação (Murray, 1984): $E^{\circ'} = (E_{pa} + E_{pc})/2$, em que E_{pa} e E_{pc} é o potencial de pico anódico e catódico, respectivamente, foi de aproximadamente -460 mV vs. ECS em pH 7,0, para os três casos estudados. Este valor foi próximo ao potencial formal da flavina em solução, cerca de -450 mV vs. ECS (Kzenzhek & Petrova, 1983), ou seja, apesar da acidez da matriz Si:Zr, não houve o deslocamento esperado para regiões de potenciais menos negativos. Em termos de densidade de corrente de pico, a figura II.3.8 mostra um menor valor para a RF, o qual está correlacionado à quantidade de flavinas adsorvidas sobre a superfície da Si:Zr.

A dependência linear da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, $v^{1/2}$, é ilustrada na figura II.3.9 para os três tipos de flavinas adsorvidas. Este comportamento indica que o processo é sem elhante ao controlado por difusão. Além disso, não foi observada queda da corrente de pico após os sucessivos ciclos do voltamograma, indicando que as flavinas estavam fortemente adsorvidas sobre Si:Zr. Deste modo, o processo redox deve ser controlado pela difusão dos contra-ions até a superfície do eletrodo, mantendo a eletroneutralidade do sistema. Outra possibilidade para este comportamento pode ser atribuída à resistência do material ou mecanismo de transferência de elétrons que ocorre pelo processo *jumping*.

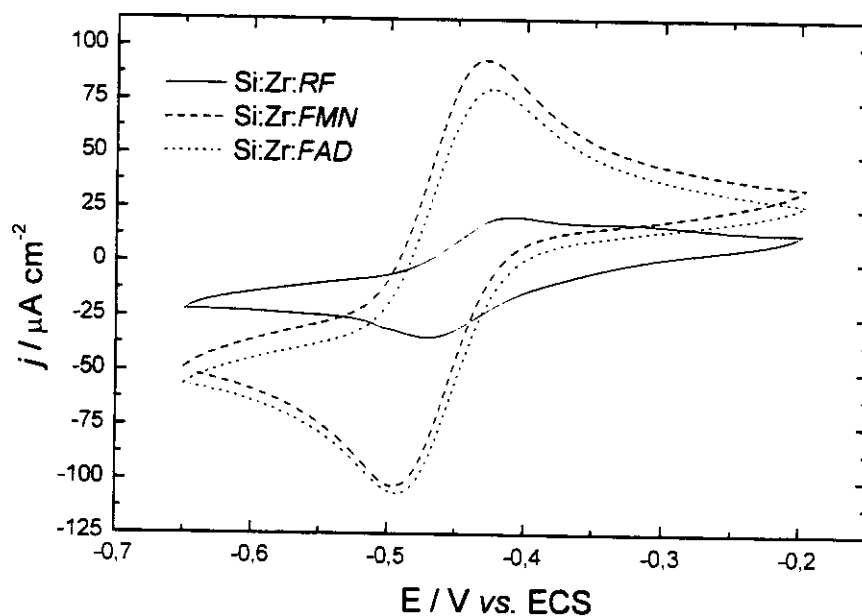


Figura II.3.8 - Voltamogramas cíclicos obtidos (após a estabilização da resposta) utilizando eletrodo Si:Zr:flavina. Solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

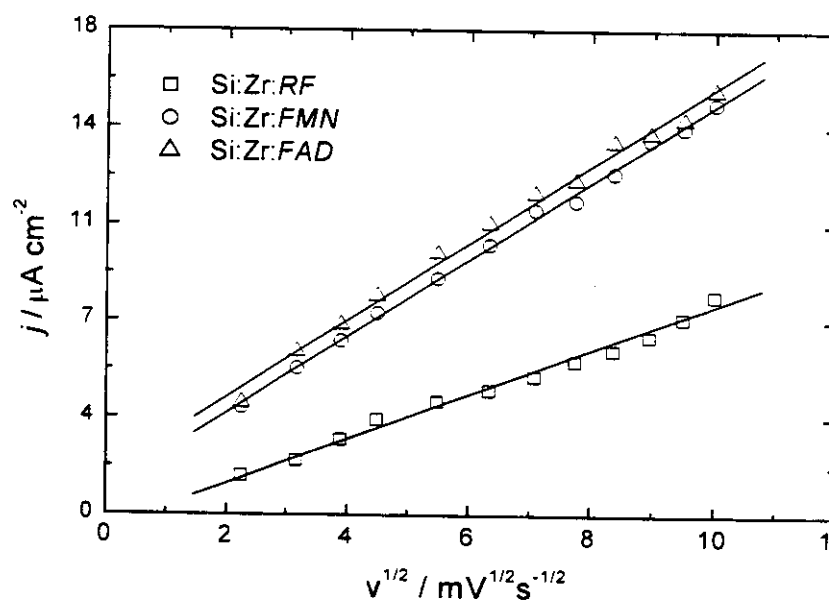


Figura II.3.9 - Dependência da densidade de corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura obtida para eletrodos Si:Zr:RF, Si:Zr:FMN e Si:Zr:FAD. Solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0.

A separação entre os potenciais de pico, ΔE_p ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$), foi próxima de 50 mV para Si:Zr:RF e de 65 mV para Si:Zr:FMN e Si:Zr:FAD a 20 mV s⁻¹. Outro parâmetro observado foi que a razão entre a corrente de pico anódico e a corrente de pico catódico foi próxima de 1. Esse comportamento sugere que a transferência de elétrons entre a flavina adsorvida e o eletrodo é rápida (Laviron, 1982; Honeychurch & Rechnitz, 1998).

O número de elétrons transferido entre o eletrodo e a flavina adsorvida, a 5 mV s⁻¹, durante o processo redox foi calculado pela equação: $E_{Lmapa} = 90,6/n$, em que n é número de elétrons total envolvido na reação e E_{Lmapa} é a largura da meia altura de pico anódico. Para os três tipos de flavinas imobilizadas sobre Si:Zr, o número de elétrons foi próximo de 1,5, isto porque, durante o processo redox, parte da flavina reduzida deve ser transformada no estado semiquinona.

Como mostrado na Figura II.3.9, o processo redox das flavinas adsorvidas é controlado por difusão. Os íons podem afetar a resposta eletroquímica do eletrodo devido à interação com a espécie eletroativa adsorvida ou com a matriz Si:Zr. Dessa forma, a influência dos diferentes eletrólitos no $E^{\circ'}$ e ΔE_p foi investigada e os resultados obtidos são mostrados em Tabela II.3.2. Para RF e FAD, os diferentes cátions apresentam pequena influência no valor do $E^{\circ'}$, com exceção para íons Ca²⁺, que provocam o deslocamento do $E^{\circ'}$ para valores mais positivos, indicando uma interação do Ca²⁺ com a flavina, estabilizando a forma reduzida da flavina. Os ânions Cl⁻ e ClO₄⁻ provocaram uma influência significativa no processo redox da RF adsorvida, mudando o $E^{\circ'}$ para regiões de potenciais mais negativos, causando aumento no valor de ΔE_p . Isto ocorre, provavelmente, devido à estabilização da forma oxidada da riboflavina atribuída à interação desta com os ânions Cl⁻ e ClO₄⁻. De uma forma geral, os diferentes cátions e ânions não tiveram influências significativas na resposta do eletrodo Si:Zr:flavina.

Tabela II.3.2 - Valores de $E^{\circ'}$ e ΔE_p para os eletrodos Si:Zr:RF e Si:Zr:FAD em diferentes eletrólitos de suporte, pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

Cátions 0,1 mol L ⁻¹ contra-íons NO ₃ ⁻	Si:Zr:RF		Si:Zr:FAD	
	ΔE_p / mV	$E^{\circ'}$ / mV	ΔE_p / mV	$E^{\circ'}$ / mV
Li ⁺	104	-413	94	-420
Na ⁺	102	-405	112	-425
K ⁺	105	-391	106	-415
NH ₄ ⁺	91	-396	127	-415
Ca ²⁺	112	-382	116	-378
Ânions 0,1 mol L ⁻¹ contra-íons Na ⁺	Si:Zr:RF		Si:Zr:FAD	
	ΔE_p / mV	$E^{\circ'}$ / mV	ΔE_p / mV	$E^{\circ'}$ / mV
Cl ⁻	180	-450	104	-433
NO ₃ ⁻	102	-405	106	-425
SO ₄ ²⁻	104	-421	93	-417
ClO ₄ ⁻	207	-474	102	-426

O valor do $E^{\circ'}$ para Si:Zr:FMN em diferentes eletrólitos não foi calculado porque os voltamogramas não foram bem definidos, conforme ilustrado na figura II.3.10, mostrando que a interação com a matriz não deve ser exatamente a mesma como no caso da FAD.

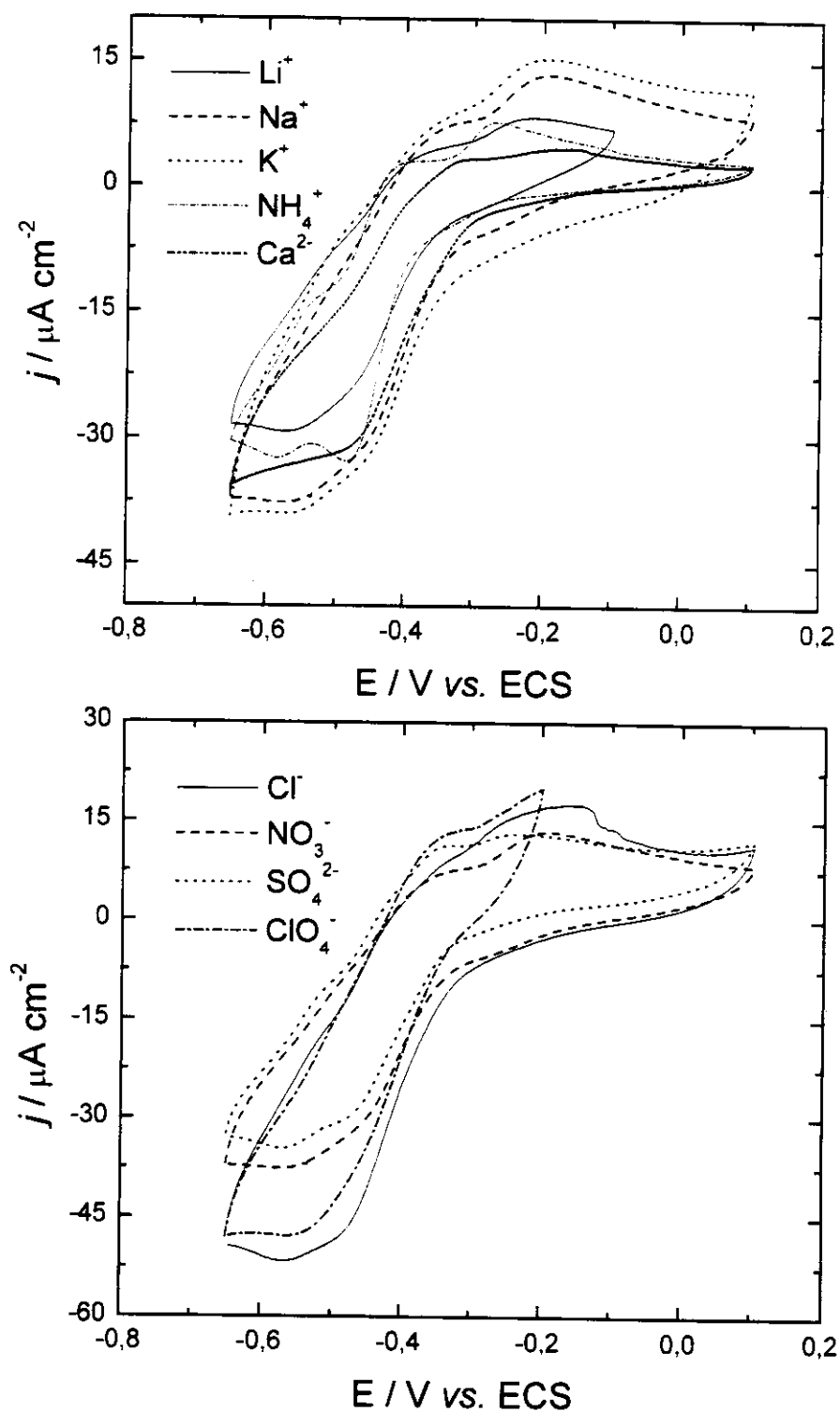


Figura II.3.10 - Voltamogramas do Si:Zr:FMN obtidos em diferentes eletrólitos de suporte com concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Contra-íons NO_3^- e Na^+ .

A Tabela II.3.3 mostra a influência das diferentes soluções tampão sobre o processo redox das flavinas adsorvidas. Com exceção do tampão TRIS sob Si:Zr:RF e Si:Zr:FAD, em todos os outros casos um baixo valor do ΔE_p foi observado, provavelmente devido à menor resistência na transferência de elétrons. As soluções tampão empregadas não apresentaram influência significativa no valor do E° dos eletrodos Si:Zr:RF, Si:Zr:FMN e Si:Zr:FAD. Para RF imobilizada sobre fosfato de zircônio foi relatado que em solução tampão fosfato o valor do E° muda para regiões de valores mais negativos, sugerindo que ocorre a competição entre o grupo fosfato do material imobilizado e o grupo fosfato da solução (Kubota & Gorton, 1999a). Esse tipo de comportamento, deslocamento do E° , em solução tampão fosfato não foi observado para a RF adsorvida sobre fosfato de titânio (Kubota *et al.*, 2000) nem para Si:Zr:flavina, isto porque no presente caso o grupo fosfato da solução não deve competir com FAD ou FMN pela matriz Si:Zr, já que não foram verificadas experimentalmente quedas significativas da densidade de corrente anódica e catódica com os sucessivos ciclos dos voltamogramas. Adicionalmente, uma melhor definição dos voltamogramas para as flavinas imobilizadas foi obtida em solução tampão fosfato e a razão entre a corrente de pico anódico e a de pico catódico foi de aproximadamente 1. Portanto, a solução de trabalho escolhida para os estudos foi a solução tampão fosfato.

Tabela II.3.3 - Valores do E° e ΔE_p para eletrodo Si:Zr:RF, Si:Zr:FMN e Si:Zr:FAD em diferentes soluções tampão, em pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

Tampão 0,1 mol L ⁻¹	Si:Zr:RF		Si:Zr:FMN		Si:Zr:FAD	
	ΔE_p / mV	E° / mV	ΔE_p / mV	E° / mV	ΔE_p / mV	E° / mV
Pipes	50	-456	52	-468	69	-450
Hepes	40	-446	53	-466	73	-451
Fosfato	53	-443	60	-466	65	-460
Tris	140	-402	58	-459	89	-429

Pipes = Piperazina-N,N'-bis(2-ácido etanossulfônico); HEPES = N-2 Hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanossulfônico;

Tris = Tris (hidroximetil) aminometano.

A Figura II.3.11 mostra que o efeito do pH sobre o $E^{\circ'}$ das flavinas adsorvidas é similar ao observado para as flavinas em solução, sendo que o $E^{\circ'}$ muda para valores mais negativos com o aumento do pH da solução. A inclinação da reta foi próxima de -50 mV por década de pH para FMN e FAD, enquanto para RF adsorvida a influência do pH foi menos pronunciada na região de pH entre 4 e 5. De certa forma, neste intervalo de pH, a matriz Si:Zr exerce algum efeito protetor. Esta é outra evidência de que o mecanismo de adsorção que atua entre RF e a matriz Si:Zr é diferente da adsorção FMN ou FAD sobre Si:Zr. Shinohara *et al.* (1991) observaram uma fraca adsorção da RF sobre a superfície do TiO_2 comparado com FAD e FMN. De acordo com o comportamento verificado, os autores acreditam que exista uma importante contribuição do grupo fosfato da flavina na adsorção desta sobre a superfície do TiO_2 . Esta explicação pode ser usada para Si:Zr:FAD e Si:Zr:FMN, uma vez que o óxido de zircônio tem grande afinidade pelo grupo fosfato (Veselý & Pekárek, 1972).

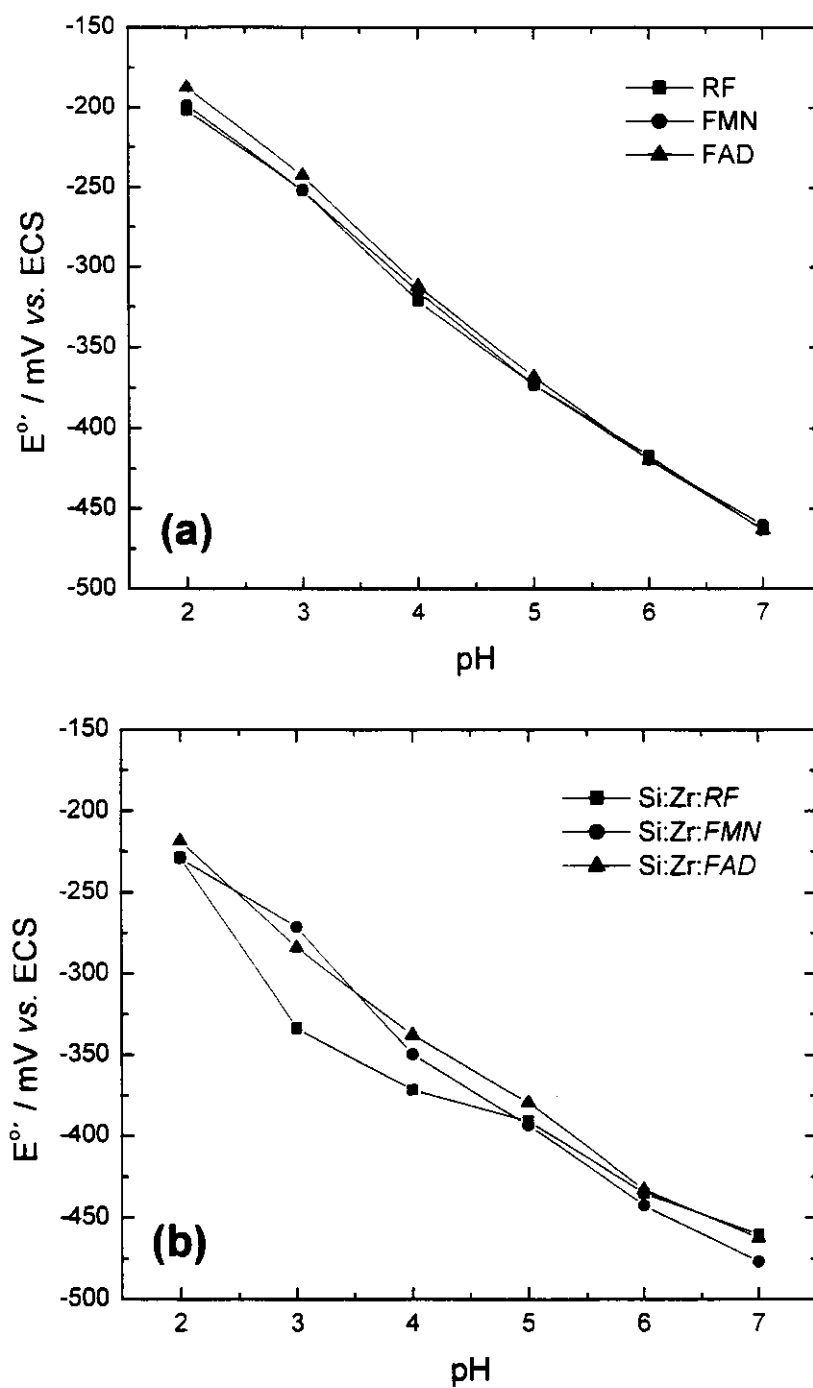


Figura II.3.11 - Dependência do $E^{\circ'}$ em função do pH da solução para as flavinas em solução (a) e flavinas adsorvidas (b).

II.2.5 - Efeito do oxigênio do meio na resposta dos eletrodos

Em sistemas biológicos o oxigênio é oceptor final de elétrons entre a flavina e o NADH no metabolismo dos seres vivos. A eletrocatalise da redução do oxigênio tem um papel importante em vários processos biológicos redox. Sun *et al.* (1996) modificaram a superfície do eletrodo de carbono vítreo com a RF e observaram que sua resposta se mantinha estável por um longo período de uso e que este eletrodo modificado era sensível ao oxigênio do meio. Os autores utilizaram um potencial para a redução do oxigênio de -420 mV. Neste sentido, com intuito de conhecer melhor o sistema em estudo, foi verificada a resposta das flavinas imobilizadas sobre a matriz Si:Zr na presença e ausência do oxigênio.

Caso o oxigênio do meio não seja totalmente removido, observa-se um segundo pico de redução em regiões de potenciais menos negativos, como pode ser verificado nos voltamogramas das Figuras II.3.12, II.3.13 e II.3.14.

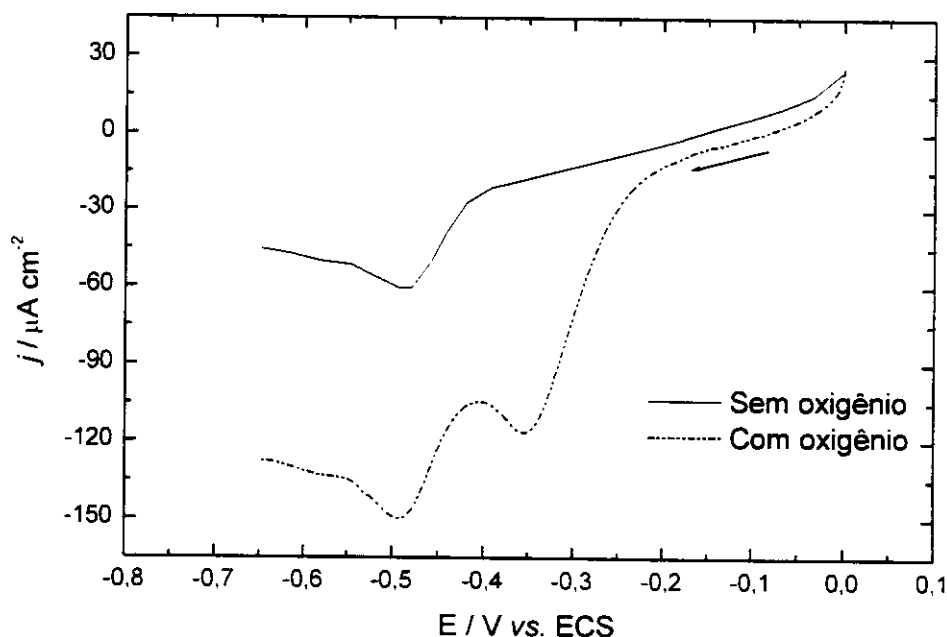


Figura II.3.12- Voltamogramas obtidos na presença e ausência de oxigênio para o eletrodo Si:Zr:RF a 5 mV s^{-1} , solução tampão fosfato, pH 7,0.

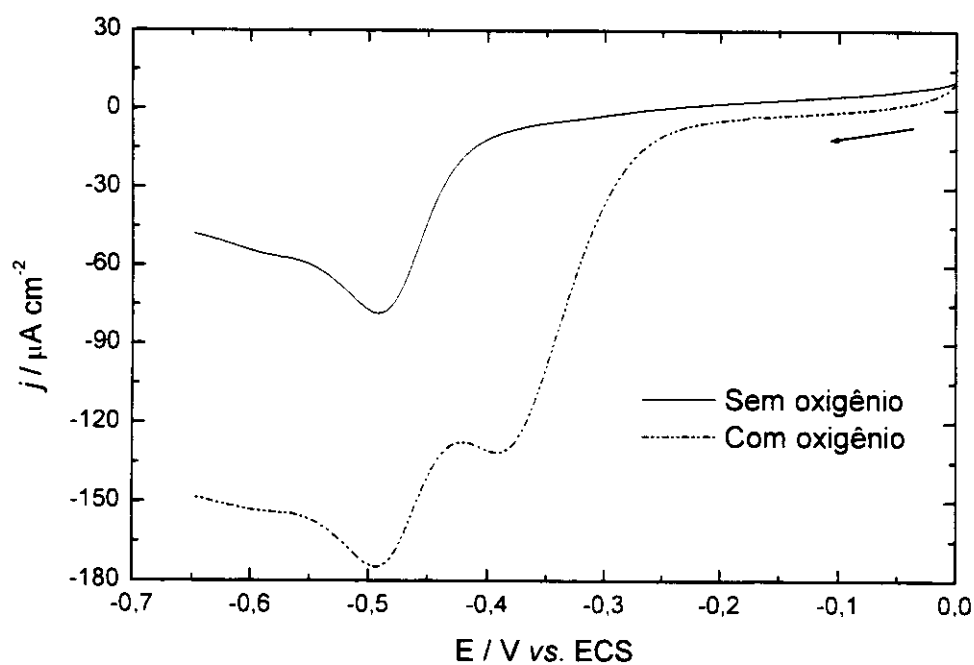


Figura II.3.13 - Voltamogramas obtidos na presença e ausência de oxigênio para o eletrodo Si:Zr:FMN a 5 mV s^{-1} , solução tampão fosfato, pH 7,0.

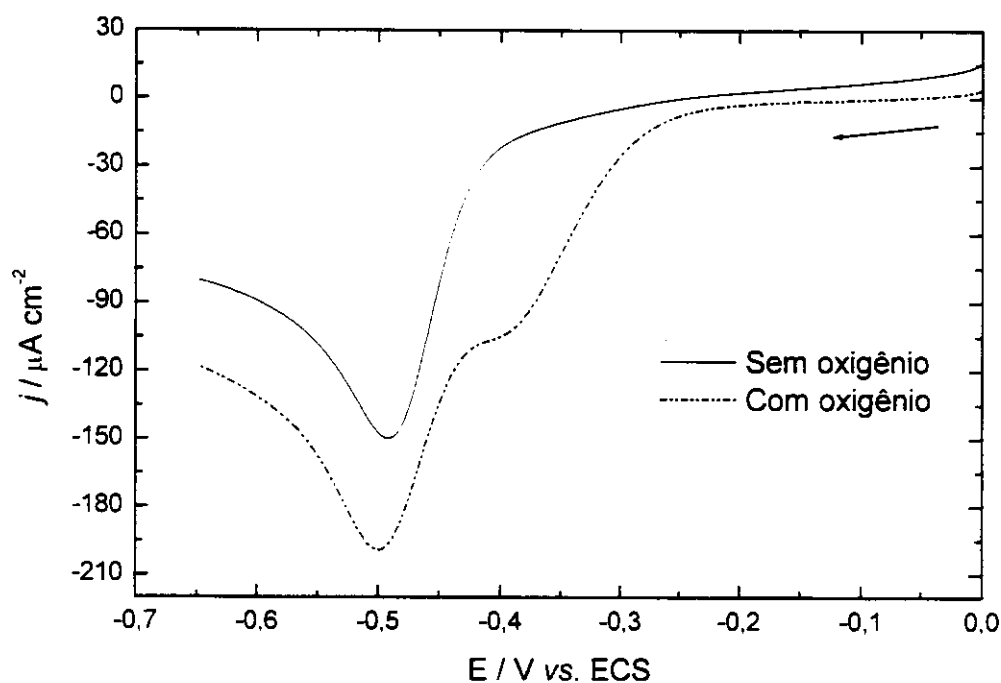


Figura II.3.14 - Voltamogramas obtidos na presença e ausência de oxigênio para o eletrodo Si:Zr:FAD a 5 mV s^{-1} , solução tampão fosfato, pH 7,0.

II.3.6 - Eletrooxidação de NADH pelo eletrodo Si:Zr:flavina

As Figuras III.3.15, III.3.16 e III.3.17 mostram os voltamogramas cíclicos obtidos para eletrodo Si:Zr:RF, Si:Zr:FMN e Si:Zr:FAD na ausência e presença de NADH. As condições de imobilização das flavinas não foram favoráveis para oxidar NADH, isto provavelmente porque a diferença entre o E° de NADH e o das flavinas não foi suficiente para permitir uma oxidação significativa.

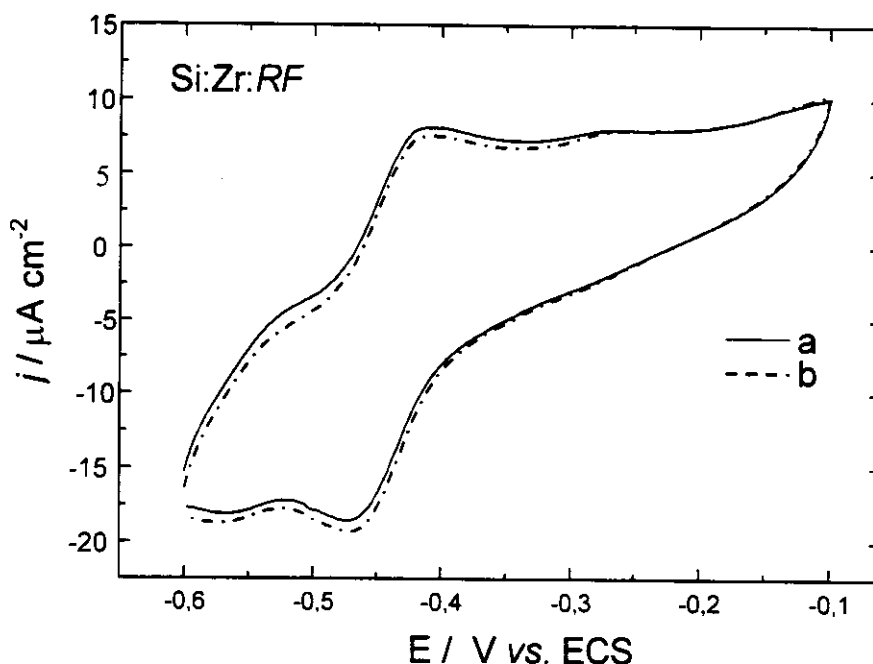


Figura II.3.15 - Voltamograma cíclico obtido para o eletrodo Si:Zr:RF na ausência (a) e presença (b) de 10 mmol L^{-1} de NADH a 5 mV s^{-1} . Solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.

Com a imobilização das flavinas sobre Si:Zr não houve o deslocamento do E° para regiões de potenciais menos negativos quando comparado com o E° da flavina em solução. Esta deve ser a provável explicação para que a flavina não apresente propriedade catalítica para oxidar NADH.

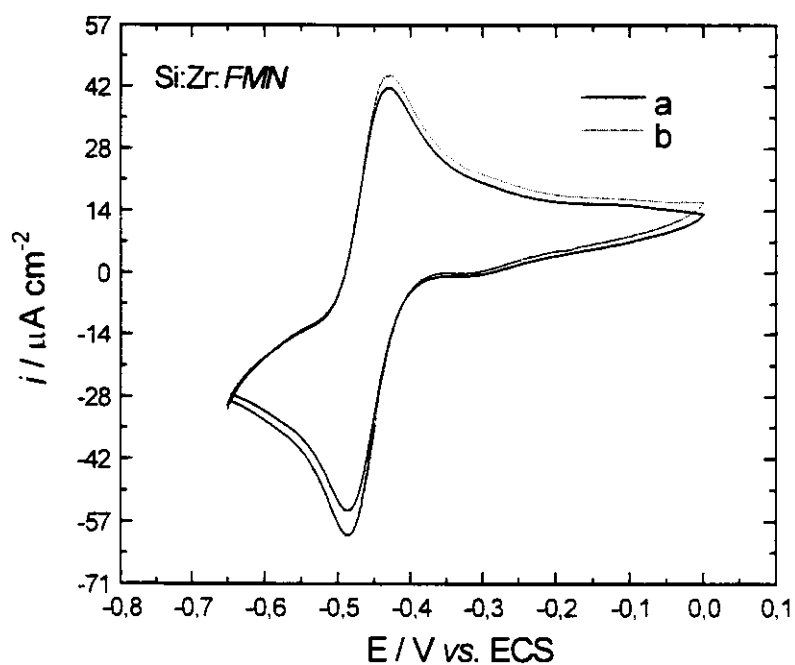


Figura II.3.16 - Voltamograma cíclico obtido para o eletrodo Si:Zr:FMN na ausência (a) e presença (b) de 10 mmol L^{-1} de NADH a 5 mV s^{-1} . Solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.

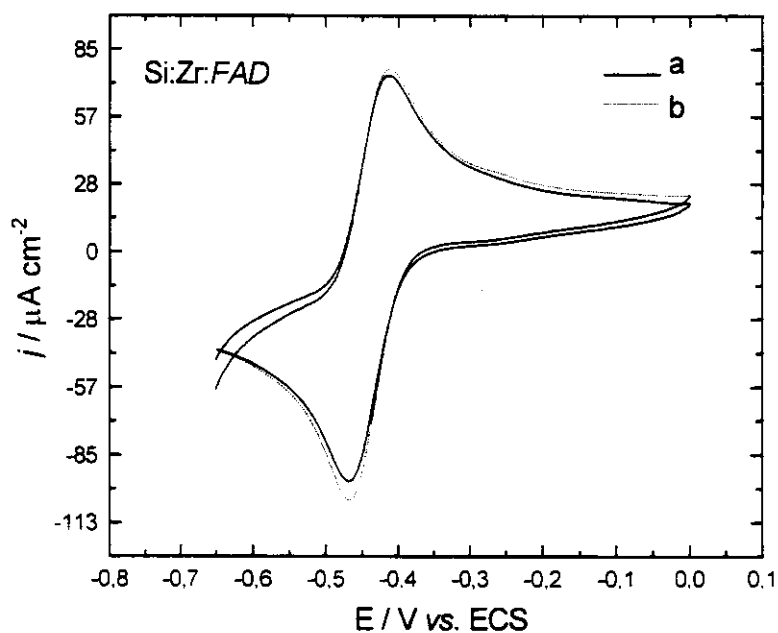


Figura II.3.17 - Voltamograma cíclico obtido para o eletrodo Si:Zr:FAD na ausência (a) e presença (b) de 10 mmol L^{-1} de NADH a 5 mV s^{-1} . Solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.

II.4 - CONCLUSÕES

As flavinas RF, RMN e FAD foram fortemente imobilizadas sobre a sílica gel modificada com óxido de zircônio (Si:Zr). Os dados obtidos por espectrofotometria de UV-visível e por eletroquímica mostraram uma interação com a matriz diferenciada para os três tipos de flavinas estudadas. A imobilização sobre Si:Zr não provocou mudança no potencial formal da FAD e FMN em todo o intervalo de pH estudado, cujo comportamento foi similar aos das flavinas dissolvidas em solução. No entanto, para Si:Zr:RF, uma menor dependência do potencial formal em função do pH, no intervalo entre 4 e 5, foi observada. Os resultados eletroquímicos e espectrofotométricos permitem concluir que a interação da RF com Si:Zr ocorre através do anel aloxazina, enquanto a interação de FAD e FMN com a matriz Si:Zr ocorre através do grupo fosfato presente na estrutura destas flavinas.

A presença do oxigênio no meio leva à formação de um segundo pico catódico devido à redução do oxigênio pela flavina.

Os eletrodos Si:Zr:flavina não apresentaram potencial para a eletrooxidação de NADH, uma vez que a imobilização das flavinas sobre a matriz Si:Zr não permitiu o deslocamento do E^0 para regiões mais positivas.

Este estudo nos forneceu informações importantes sobre como a superfície da matriz pode influenciar a resposta do eletrodo. Por meio delas podemos compreender melhor os sistemas propostos e dessa forma novos tipos de configurações de eletrodos podem ser elaborados uma vez que temos uma infinidade de mediadores e metodologias disponíveis para ser explorada visando à construção de sensores "ideais" para a quantificação de NADH.

II.5 - REFERÊNCIAS

- Andreotti, E. I. S.; Gushikem, Y.; Kubota, L. T.; *J. Braz. Chem. Soc.*, 3 (1992) 21.
- Bartlett, P. N.; Tebbutt, P.; Whitaker, R. G.; *Prog. React. Kinet.*, 16 (1991) 56.
- Birss, V. I.; Guha-Thakurta, S.; McGarvey, C. E.; Quach, S.; Vanýsek, P.; *J. Electroanal. Chem.*, 423 (1997) 13.
- Bruice, T. C. *In Flavins and Flavoproteins*; Bray, R. C.; Engel, P. C.; Mayhew, S. E., eds.; Walter De Gruyter and Co.: Nova York, 1984, p. 45.
- Bruice, T. C.; *Acc. Chem. Res.*, 13(1980) 256.
- Dixon, M.; *Biochim. Biophys. Acta*, 2261 (1971) 269.
- Edwards, T. R. G.; Cunnane, V. J.; Parsons, R.; Gani, D.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1989) 1041.
- Gorton, L.; Johansson, G.; *J. Electroanal. Chem.*, 113 (1980) 151.
- Gushikem, Y.; Rosatto, S. S.; *J. Braz. Chem. Soc.*, 6 (2001) 695.
- Hemmerich, P.; Veeger C.; Wood, H. C. S.; *Angew. Chem. Int. Edit.* 4 (1965) 671.
- Honeychurch, M. J.; Rechnitz, G. A.; *Electroanalysis*, 19 (1998) 453.
- Iler, R. K. *The Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons, Nova York (1979), cap. 6, p.p. 626-633.
- Kubota, L. T.; Gorton, L.; *J. Solid State Electrochem.*, 3 (1999b) 370.
- Kubota, L. T.; Gorton, L.; *Electroanalysis* 11 (1999a) 719.
- Kubota, L. T.; Gorton, L.; Roddick-Lanzilotta, A.; McQuillan, A. J.; *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 47 (1998) 39.
- Kubota, L. T.; Munteanu, F.; Roddick-Lanzilotta, A.; McQuillan, A. J.; Gorton, L.; *Quim. Anal.* 19 (2000) 15.
- Kenzhek, O. S.; Petrova, S. A.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* 11 (1983) 105.
- Laviron, E. *In Electroanalytical Chemistry*; Bard A. J., ed. Dekker: Nova York, 1982, p. 53.

- Maedayorita, K.; Russell, G. C.; Guest J. R.; Massey, V.; Williams, C. H.; *Biochemistry* 30 (1991) 11788.
- Massey, V.; *FASEB, J.* 9 (1995) 473.
- Massey, V.; Hemmerich, P.; *Biochemistry* 17 (1978) 664.
- Murray, R. W. *In Electroanalytical Chemistry*; Bard A. J., ed. Dekker: Nova York, 1984, p. 191.
- Narasimhan, K.; Wingard, L. B.; *J. Mol. Catal.*, 34 (1986) 263.
- Peixoto, C.R.M. *Síntese, caracterização e aplicações analíticas do óxido de zircônio (iv) altamente disperso sobre a superfície da sílica gel*. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Química - Unicamp, 1992. Dissertação de mestrado.
- Schiavo, D. A.; Perez, E. F.; Kubota, L. T.; *Quím. Nova* 23 (2000) 832.
- Schmidt, H.-L.; Schuhmann, W.; *Biosens. Bioelectron.* 11 (1996) 127.
- Shinohara, H.; Grätzel, M.; Vlachopoulos, N.; Aizawa, M.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* 26 (1991) 307.
- Sun, W.; Kong, J.; Deng, J. *Anal. Lett.*, 29 (1996) 2425.
- Ueyama, S.; Isoda, S.; Maeda, M.; *J. Electroanal. Chem.*, 264 (1989) 149.
- Veselý, V.; Pekárek, V.; *Talanta*, 19 (1972) 219.
- Zaitseva, G.; Gushikem, Y.; Ribeiro, E. S.; Rosatto, S. S. *Electrochim. Acta*, 47 (2002) 1469.

CAPÍTULO III

III.1 – INTRODUÇÃO

As quinoproteínas são enzimas que contêm como cofator pirroloquinolina quinona (PQQ) e têm sido extensivamente estudadas nos últimos anos (Husain *et al.*, 1987; Khan *et al.*, 1991) devido a sua importância em várias reações enzimáticas. Algumas enzimas conhecidas que possuem a PQQ como cofator são: glicose dehidrogenase (Ikeda *et al.*, 1998), colesterol dehidrogenase, lactato dehidrogenase, fosfato dehidrogenase, álcool dehidrogenase e glicerol dehidrogenase (Schmidt, 1997). As quinoproteínas pertencem à classe das oxidorreductase, e suas propriedades redox, tanto em solução como imobilizadas sobre a superfície de eletrodos, podem ser estudadas por métodos eletroquímicos (Katz *et al.*, 1994a, Katz *et al.*, 1994b). Enzimas contendo PQQ têm sido empregadas na construção de biossensores cujo mecanismo pode ser de transferência de elétrons direta (Katz & Willner, 1996) (terceira geração de biossensores) ou mediada com promoção da comunicação elétrica entre o eletrodo e a enzima (segunda geração de biossensores) (Katz *et al.*, 1994b; Curulli *et al.*, 1997). A molécula de PQQ é quimicamente ativa, capaz de catalisar vários tipos de reações tais como a oxidação de aminas, aminoácidos, álcoois, aldeídos, glicose e NADH. A PQQ possui em sua estrutura grupos carbonilas e três grupos carboxílicos, como mostra a figura III.1.1. Devido a estes grupos, a PQQ pode ser covalentemente imobilizada sobre diferentes suportes.

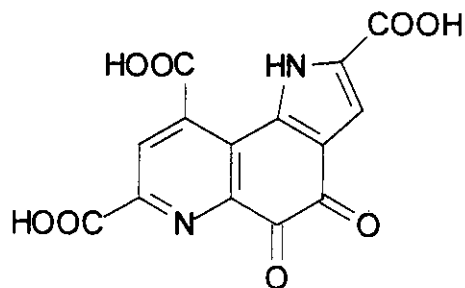


Figura III.1.1 - Estrutura da pirroloquinolina quinona (PQQ).

A eletroquímica deste cofator é irreversível quando se utiliza eletrodo de platina, ouro ou carbono vítreo; isto ocorre devido à dificuldade da transferência direta de elétrons da PQQ para o eletrodo. Shinohara *et al.* (1991) eletropolimerizaram o polímero condutor polipirrol juntamente com a PQQ e observaram um processo redox reversível para a PQQ. O problema encontrado para este tipo de configuração de eletrodo é a baixa estabilidade deste, devido à lixiviação da PQQ da superfície do eletrodo para a solução. Curulli *et al.* (1997) eletropolimerizaram diaminobenzeno e aminobifenil (polímero não-condutor) juntamente com a PQQ sobre eletrodo de platina, ouro, carbono vítreo e grafite pirolítico e verificaram picos redox pouco definidos. Apesar disso, este eletrodo apresentou eletrocatalise para NADH a um potencial de 200 mV vs. ECS, valor de potencial menor do que para eletrodo não modificado.

O grupo de Katz tem usado a PQQ como mediador de elétrons entre a enzima e o eletrodo (Bardea *et al.*, 1997; Katz *et al.*, 1997). A PQQ imobilizada sobre eletrodo de ouro, descrita pelo grupo de Katz, consiste na ligação covalente da PQQ com a monocamada de uma série de derivados da cistamina adsorvida sobre a superfície do eletrodo, sendo que a resposta da PQQ depende do grupo funcional na extremidade da cadeia e do pH da solução como mostra a figura III.1.2.

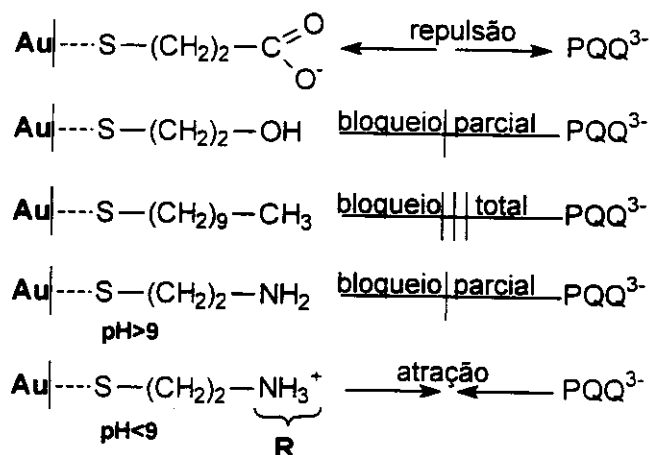


Figura III.1.2 - Representação esquemática do eletrodo de ouro modificado com derivados de tiol na presença da PQQ.

Nos casos em que houve atração eletrostática entre a PQQ e a matriz foi verificado processo redox quase reversível. Katz *et al.* (1994a) observaram ainda que na presença de íons Ca^{2+} em solução ocorre um considerável aumento na corrente eletrocatalítica de oxidação da NADH usando eletrodo modificado com monocamada de pirroloquinolina quinona (PQQ). Os autores sugeriram que esse aumento se deve à formação de um complexo ternário entre o íon Ca^{2+} , a PQQ e a NADH. Os íons Ca^{2+} poderiam promover uma orientação favorável das moléculas de NADH com aumento do processo eletrocatalítico.

OBJETIVOS

O objetivo desta etapa do trabalho foi aumentar a transferência de elétrons entre pirroloquinolina quinona (PQQ) e o NADH. Dessa forma, a PQQ foi imobilizada sobre a superfície da sílica modificada com óxido de zircônio e incorporada em pasta de carbono com intuito de estudar a interação da PQQ com a matriz Si:Zr utilizando técnicas eletroquímicas e avaliar a potencialidade da PQQ imobilizada sobre Si:Zr na eletrooxidação de NADH.

III.2 - PARTE EXPERIMENTAL

III.2.1 - Reagentes

Sílica gel 60, com granulometria entre 0,040-0,063 mm e área específica de $460\text{-}520\text{ m}^2\text{g}^{-1}$ (Merck-Alemanha), oxicloreto de zircônio (Vetec-Brasil), grafite em pó (Aldrich-USA), óleo mineral (Schering-Ploung Ltda.-Brasil), 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrolo[2,3-f]-quinolina-2,7,9- ácido tricarboxílico, PQQ (Sigma-Japan) e β -nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida, NADH (Merck-Alemanha), foram de grau analítico e utilizados sem tratamento prévio, bem como os demais reagentes descritos abaixo.

Tampões

- 4,2- hidroxietil-piperazina-1-etanossulfônico, HEPES (Sigma-USA), ácido 1,4-piperazina-dietanossulfônico, PIPES (Sigma-USA), tris-hidroximetil-aminometano, TRIS (Sigma-USA) e KH_2PO_4 (Synth-Brasil).

Eletrólitos de suporte

- NaCl (Nuclear-Brasil), NaNO_3 (Nuclear-Brasil), Na_2SO_4 (Nuclear-Brasil), NaClO_4 (Merck-Alemanha), KNO_3 (Nuclear-Brasil), LiNO_3 (Vetec-Brasil), NH_4NO_3 (Nuclear-Brasil), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Synth-Brasil).

Ácido e base para ajuste de pH da solução

- HCl (Merck-Alemanha), HNO_3 (Merck-Alemanha), NaOH (Vetec-Brasil), LiOH (Vetec-Brasil), NH_4OH (Nuclear-Brasil) e H_3PO_4 (Synth-Brasil).

Os valores de pH das soluções foram ajustados utilizando o ácido ou a base contendo o íon comum do eletrólito de suporte empregado. A solução de NaOH (Nuclear-Brasil) foi usada no ajuste de pH das soluções tampão fosfato.

Todas as soluções foram preparadas com água purificada por destilação e, posteriormente, purificadas pelo sistema Milli-Q.

III.2.2 - Equipamentos

Analizador elementar 2400 CHN, Perkin Elmer, foi empregado na determinação da quantidade da PQQ adsorvida sobre a superfície da sílica gel modificada com óxido de zircônio.

As medidas eletroquímicas foram feitas num potenciostato modelo PGSTAT30 da AUTOLAB® interfaceado a um microcomputador usando *software* versão 4.8.

O espectrofotômetro da Beckman DU 640 foi empregado para as medidas espectrofométricas da PQQ em solução e imobilizada sobre Si:Zr usando cubetas de quartzo de 10 e 1 mm de caminho ótico, respectivamente.

O potenciômetro Corning 350, contendo eletrodo de vidro combinado, foi usado para auxiliar no ajuste do pH das soluções.

III.2.3 - Célula eletroquímica e eletrodos

A célula eletroquímica, eletrodo de referência, eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar empregados foram os mesmos descritos no capítulo II.2. Nos experimentos de cronoamperometria, em condições hidrodinâmicas, o eletrodo de trabalho utilizado foi o de disco rotatório de grafite pirolítico com diâmetro de 0,6 cm e com uma cavidade de 1 mm de profundidade preenchida com pasta de carbono.

III.2.4 – Procedimento experimental

III.2.4.1 – Imobilização da PQQ sobre Si:Zr

A escolha da quantidade de PQQ imobilizada sobre Si:Zr foi previamente estudada. Nas condições otimizadas, 500 mg de Si:Zr foram adicionados em 100 mL de uma solução aquosa de PQQ $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Após 1:30 h à temperatura ambiente, esta mistura foi filtrada, seca sob vácuo e armazenada sob refrigeração.

III.2.4.2 – Preparação da pasta de carbono modificada

A pasta de carbono foi preparada a partir da mistura de 50 mg de Si:Zr:PQQ, 50 mg de grafite em pó e 80 μL de nujol, a qual foi misturada até formar uma pasta homogênea. Em seguida, a pasta foi colocada na cavidade do eletrodo de trabalho, pressionada e polida sobre a superfície de vidro até obter uma superfície lisa.

III.2.4.3. - Medidas espectrofotométricas da PQQ imobilizada e em solução

O espectro de absorção da PQQ foi realizado utilizando uma solução de $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de PQQ numa cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico. A região do espectro estudado foi de 200 a 800 nm. Para a PQQ imobilizada, uma pequena quantidade Si:Zr:PQQ foi misturada com nujol. O branco utilizado para este estudo foi o nujol, o qual foi inserido em uma cubeta de quartzo de 1 mm de caminho ótico.

III.2.4.4 - Estudo da influência do íon Ca^{2+} sobre a resposta do eletrodo Si:Zr:PQQ

As soluções foram preparadas no mesmo dia da realização dos experimentos. Foram preparadas solução de fosfato, ajustando o pH para 4,5, e, posteriormente, a solução de íons Ca^{2+} foi misturado ao de fosfato de tal forma que a concentração final de fosfato foi de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e de Ca^{2+} de 10 mmol L^{-1} . Deve-se tomar cuidado durante a preparação da solução de fosfato contendo íons Ca^{2+} uma vez que o fosfato na presença de Ca^{2+} precipita.

III.3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

III.3.1 - Espectros de absorção da PQQ

O espectro de absorção característico da PQQ em meio aquoso apresenta três bandas de absorção em 250, 270 e 333 nm, que está de acordo com o descrito na literatura (Kano *et al.*, 1990). O espectro praticamente não muda no intervalo de pH entre 4,0 e 9,0 (Kano *et al.*, 1990).

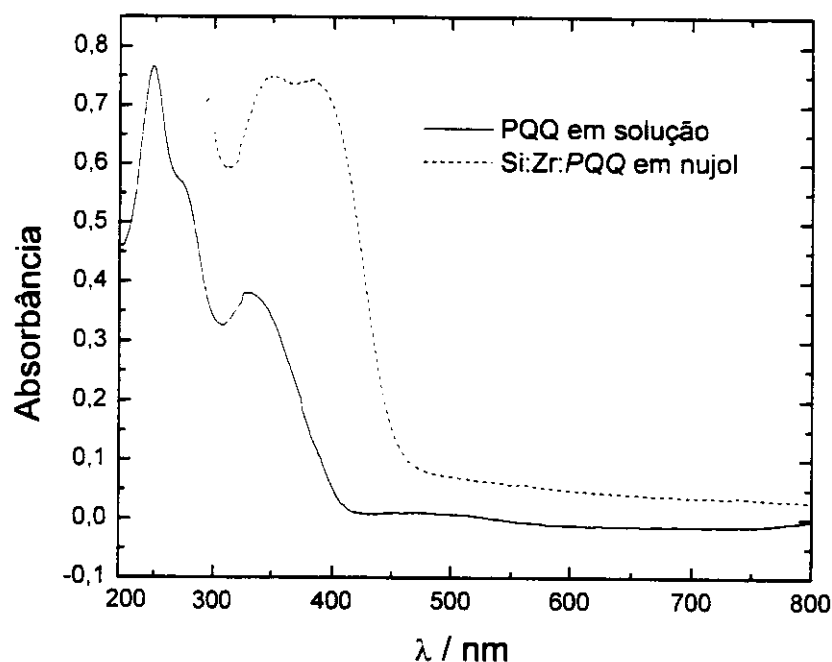


Figura III.3.1 - Espectro UV-visível da PQQ dissolvida em água (4×10^{-6} mol L⁻¹) e da imobilizada sobre Si:Zr, pH 7,0.

A Figura III.3.1 mostra os espectros de UV-visível obtidos para PQQ dissolvida em água e imobilizada sobre Si:Zr suspensa em nujol. No espectro da PQQ imobilizada sobre a matriz Si:Zr, duas bandas são observadas, uma em 330 e outra em 360 nm. Não foi possível obter o espectro da PQQ imobilizada abaixo de 300 nm

porque nesta região a matriz Si:Zr também absorve. Uma possível explicação para esta mudança no espectro de absorção se deve ao fato de o óxido de zircônio, presente na matriz Si:Zr, apresentar grande afinidade pelos grupos carboxílicos.

III.3.2 - Estudos eletroquímicos

A PQQ apresenta propriedade redox reversível, na qual estão envolvidos dois prótons e dois elétrons como mostra a Figura III.3.2. O processo de oxirredução ocorre na região da posição 4 e 5 da estrutura da PQQ.

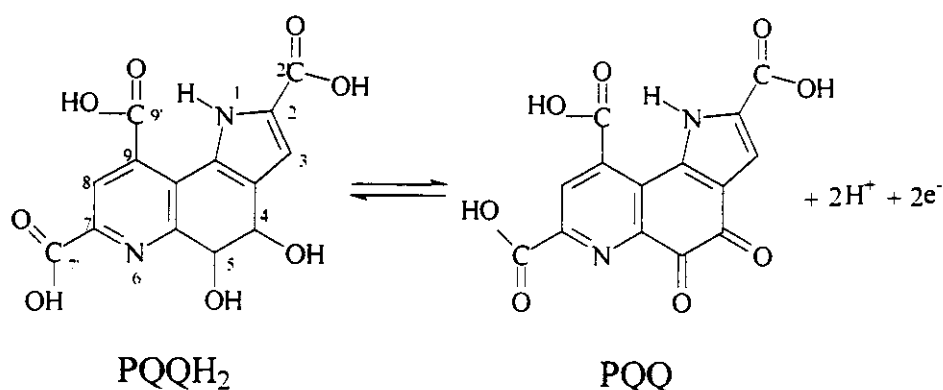


Figura III.3.2 - Representação esquemática do processo de oxidação da pirroloquinolina quinona (PQQ).

Voltamogramas cíclicos da solução aquosa de PQQ, obtidos usando eletrodo não modificado de ouro ou platina, são irreversíveis devido à dificuldade na transferência direta de elétrons entre a PQQ e o eletrodo (Katz *et al.*, 1994; Shinohara *et al.*, 1991). Entretanto, com apropriada modificação da superfície do eletrodo, de acordo com Katz *et al.* (1994), usando um eletrodo de ouro modificado com monocamada de cistamina, um par de picos redox, bem definido, foi observado para a PQQ em solução, com um potencial formal de -125 mV vs. ECS em pH 7,0.

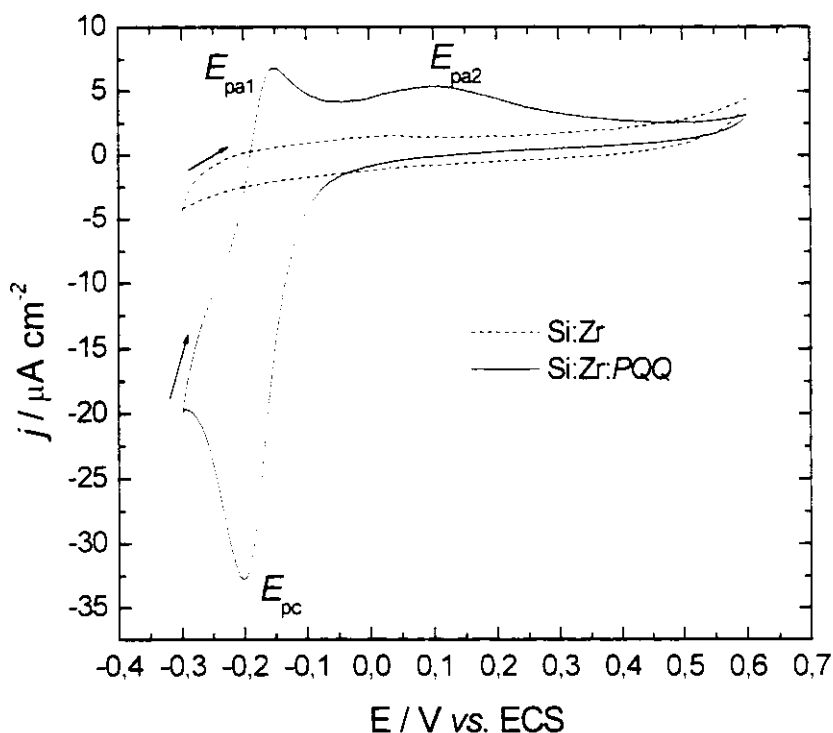


Figura III.3.3 – Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo Si:Zr e com Si:Zr:PQQ a $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Solução tampão fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.

O voltamograma cíclico obtido usando um eletrodo de pasta de carbono modificado com a matriz Si:Zr, proposto no presente trabalho, não apresentou pico redox (Figura III.3.3). Com a imobilização da PQQ sobre Si:Zr verificaram-se dois picos de oxidação em -150 mV e 100 mV vs. ECS, denominado E_{pa1} e E_{pa2} , e um de redução em -200 mV, E_{pc} (Figura III.3.3). Nos trabalhos descritos na literatura (Kano *et al.*, 1990; Katz *et al.*, 1994; Katz *et al.*, 1996; Loughran *et al.*, 1996), o segundo pico de oxidação em E_{pa2} da PQQ imobilizada sobre a superfície do eletrodo de ouro contendo monocamada de cistmina não aparece, mesmo quando a PQQ é imobilizada sobre filme de polipirrol; nestes casos foi verificado apenas um par redox. A molécula de PQQ deve ter se ligado à matriz Si:Zr de forma diferente, sendo este o motivo do aparecimento dos dois picos de oxidação. Deve-se levar em consideração que a PQQ tem, na sua estrutura, três grupos carboxílicos e duas iminas, os quais

podem se ligar à matriz Si:Zr. Outro fator que poderia explicar o aparecimento do segundo pico pode ser a reação química acoplada.

A seguir serão apresentados os dados referentes à otimização do sistema proposto e, posteriormente, serão apresentados os comportamentos eletroquímicos do eletrodo Si:Zr:PQQ em diferentes valores de pH, eletrólitos de suporte, tampão e sua potencialidade em eletrocatalisar a oxidação da NADH.

III.3.2.1 - Quantidade de Si:Zr:PQQ na pasta de carbono

Foi avaliada a melhor proporção da quantidade de Si:Zr:PQQ na preparação da pasta de carbono, com intuito de obter melhor definição dos voltamogramas. A Figura III.3.4 mostra os voltamogramas obtidos para 30%, 40% e 50% (m/m) de Si:Zr:PQQ na pasta de carbono. A densidade de corrente de pico anódico e catódico está relacionada com a quantidade de Si:Zr:PQQ utilizada na pasta de carbono, sendo a melhor proporção a de 50% de Si:Zr:PQQ e 50% (m/m) de grafite em pó. Dessa forma, esta proporção foi adotada para os demais estudos apresentados a seguir.

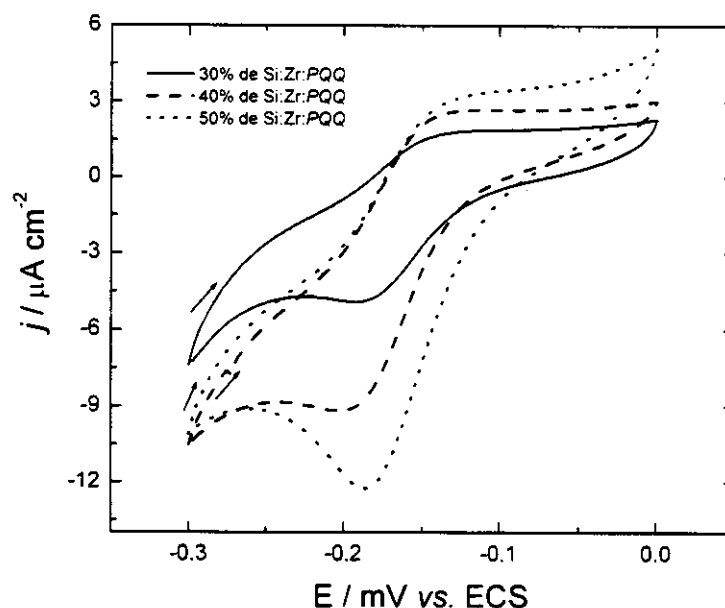


Figura III.3.4 – Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos de pasta de carbono contendo diferentes proporções de Si:Zr:PQQ na pasta de carbono, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.

III.3.2.2 - Influência da concentração do eletrólito de suporte

Os voltamogramas do eletrodo Si:Zr:PQQ em soluções de 0,05; 0,10; 0,25 e 0,50 mol L⁻¹ de KH₂PO₄ são apresentados na Figura III.3.5. Com o aumento da concentração do eletrólito houve um aumento na intensidade da corrente de pico anódico e catódico. A concentração escolhida para os estudos posteriores foi de 0,25 mol L⁻¹, na qual se obteve maior intensidade de corrente de pico, enquanto acima deste valor a corrente não teve variação significativa. Notou-se, porém, que houve um ligeiro alargamento dos picos, sugerindo que a alta concentração desse eletrólito poderia prejudicar o processo redox da PQQ. Provavelmente, o fosfato compete com a PQQ pela superfície da matriz Si:Zr, pelo fato de o zircônio ter grande afinidade pelo fosfato, o que poderia provocar a lixiviação da PQQ da pasta de carbono para a solução e, conseqüentemente, diminuição da resposta.

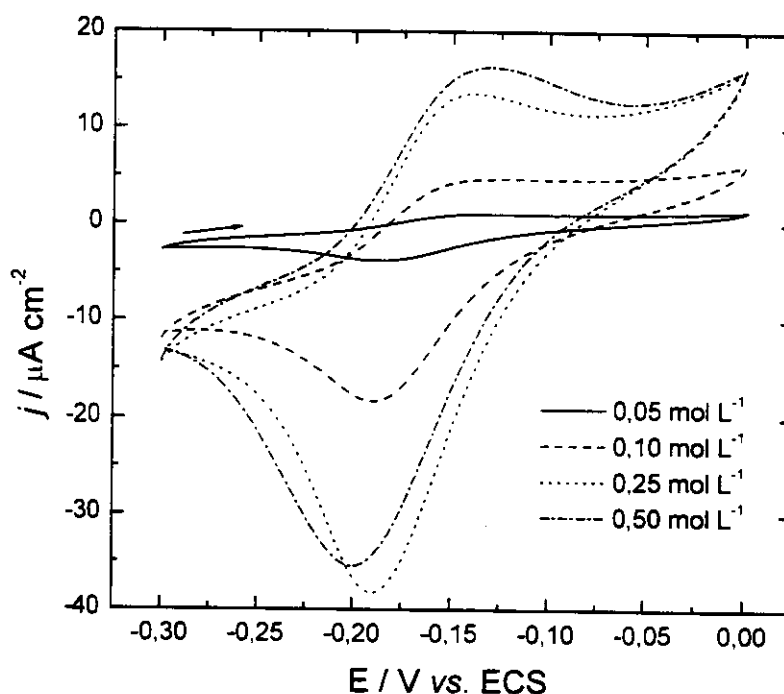


Figura III.3.5 - Voltamogramas cíclicos em diferentes concentrações de KH₂PO₄, pH 7,0, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

III.3.2.3 – Influência do pH

Como apresentado na Figura III.3.2, no processo redox da PQQ estão envolvidos dois prótons e dois elétrons, ou seja, a presença de prótons deve favorecer o processo redox (Kano *et al.*, 1990). Dessa forma, foi avaliado o efeito do pH da solução na resposta eletroquímica do eletrodo Si:Zr:PQQ. A Figura III.3.6b mostra que, com a diminuição do pH de 7,0 para 3,0, houve um deslocamento do potencial de pico E_{pa1} e do pico E_{pc} do voltamograma para regiões mais positivas de potencial. Este comportamento é semelhante ao comportamento do processo redox da PQQ em solução apresentado na Figura III.3.6a. A Figura III.3.6b mostra ainda que em valor de pH igual a 3,0 e abaixo deste ocorre a sobreposição dos dois picos de oxidação.

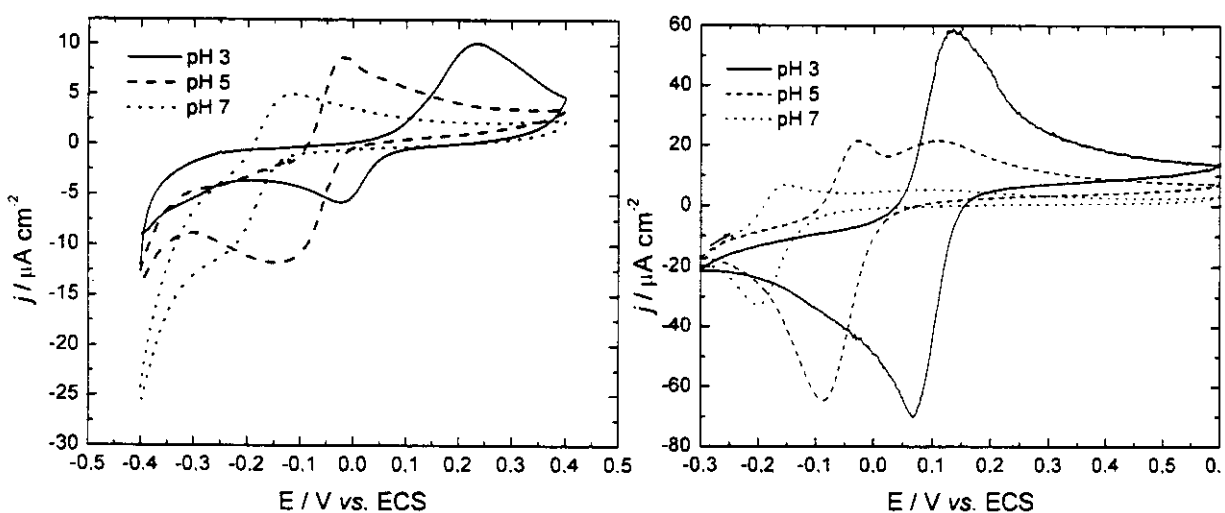


Figura III.3.6 – Voltamogramas cíclicos referentes a pH 3,0, 5,0 e 7,0 para a PQQ em solução (a) e para a PQQ imobilizada (b) a 20 mV s^{-1} . Solução fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$.

Graficando os valores dos potenciais de pico anódico em função do pH da solução, verificou-se que E_{pa2} praticamente se manteve constante ($\sim 100 \text{ mV}$) no intervalo de pH de 3,0 a 7,0 (Figura III.3.7). Por outro lado, neste mesmo intervalo de pH, o E_{pa1} mudou de 100 mV para -180 mV vs. ECS. Comportamento similar ao do E_{pa1} foi observado para a PQQ em solução (Kano *et al.*, 1990). No presente trabalho,

a PQQ deve estar imobilizada sobre a matriz Si:Zr de duas formas diferentes: em uma delas a PQQ deve estar mais exposta à solução e seu comportamento eletroquímico varia em função do pH da solução (E_{pa1}) enquanto, para a segunda forma da PQQ imobilizada (E_{pa2}), a acidez da matriz deve estar atuando sobre a PQQ, sendo este o motivo da independência do potencial, E_{pa2} , em função do pH da solução.

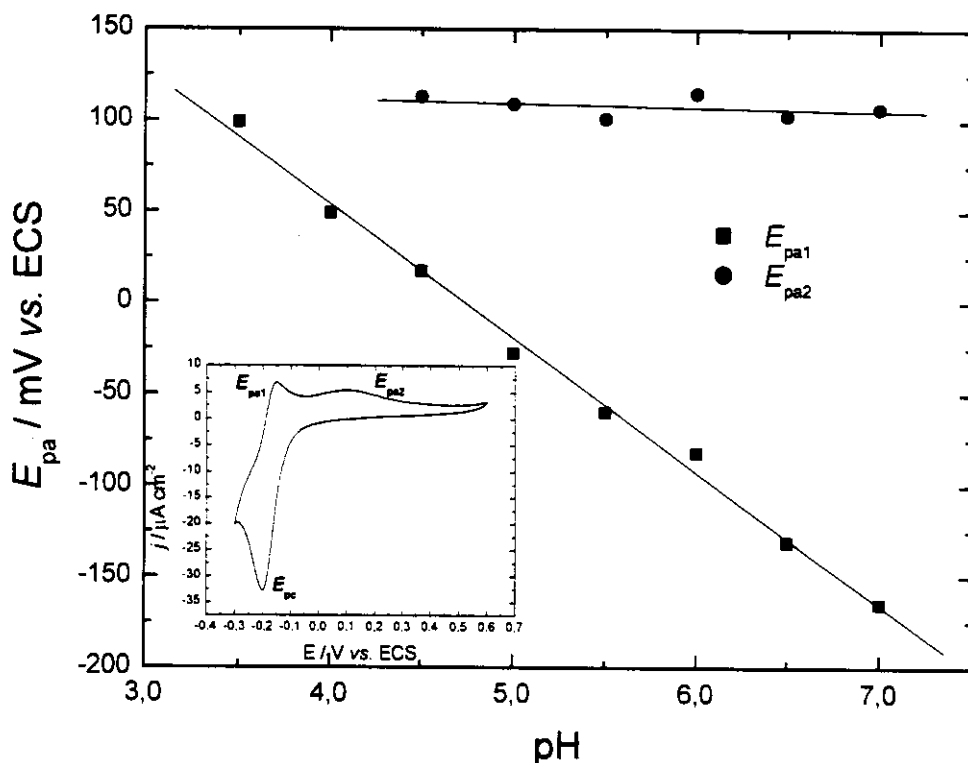


Figura III.3.7 - Comportamento do E_{pa1} e E_{pa2} em diferentes pH das soluções tampão fosfato 0,25 mol L⁻¹.

A Figura III.3.8 mostra a dependência linear do $E^{\circ'}$ versus pH da PQQ imobilizada e da PQQ em solução proveniente da Figura III.3.6. O valor de $E^{\circ'}$ do eletrodo Si:Zr:PQQ foi determinado considerando apenas o primeiro pico de oxidação e o pico de redução: $E^{\circ'} = (E_{pa1} + E_{pc})/2$. Obteve-se um ângulo de inclinação da reta de 67 mV/pH. Para a PQQ em solução, o valor obtido foi de 62 mV/pH. Estes valores são próximos ao valor da equação de Nernst (59 mV/pH), sugerindo que no processo de oxirredução da PQQ, em ambos os casos, devem estar envolvidos dois

prótons e, de acordo com a literatura (Katz *et al.*, 1996; Loughran *et al.*, 1996; Curulli *et al.*, 1997), dois elétrons.

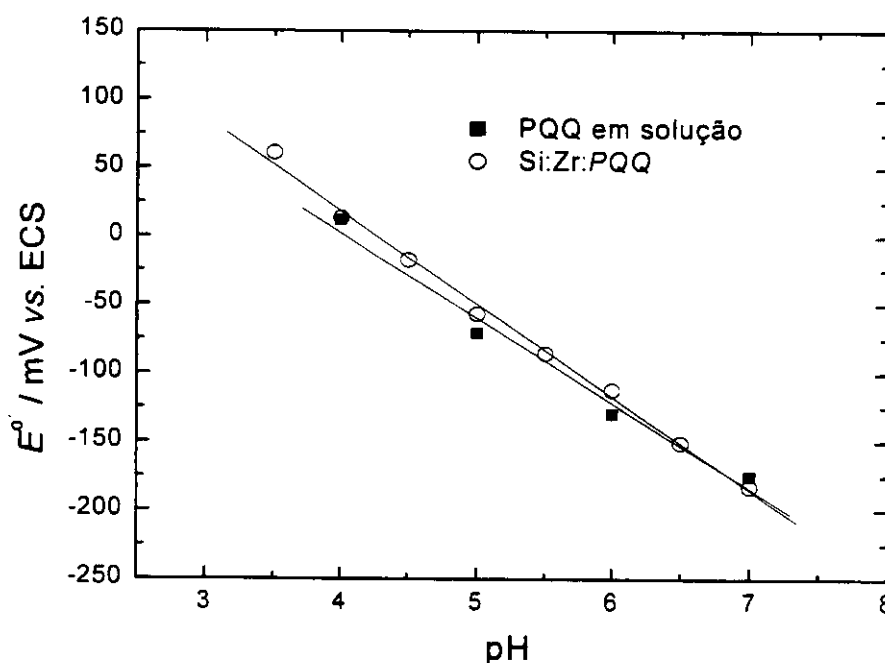


Figura III.3.8 - Potencial formal da PQQ imobilizada e da PQQ não imobilizada em função do pH da solução.

III.3.2.4 - Efeito dos diferentes ânions e cátions

A influência da natureza dos cátions e ânions sobre o E° e ΔE_p do eletrodo de pasta de carbono modificado com Si:Zr:PQQ foi avaliada. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Comparando os resultados apresentados na Tabela III.3.1 apenas na presença do cátion NH_4^+ e do ânion H_2PO_4^- , houve diferenças significativas nos valores de ΔE_p e E° nas regiões mais negativas de potencial. Apesar do baixo valor de ΔE_p em relação aos demais íons estudados, menor resistência, o valor de E° em solução contendo H_2PO_4^- é mais negativo. Em termos de eletrocatalise da NADH, seria interessante que o valor de E° fosse menos negativo. Por outro lado, uma melhor definição dos voltamogramas foi obtida em solução contendo ânions H_2PO_4^- . Os íons fosfato devem interagir com a matriz Si:Zr ou com a própria PQQ, facilitando a transferência de elétrons entre a PQQ e o

eletrodo, esta seria a explicação mais plausível para o baixo valor ΔE_p (40 mV vs. ECS) em relação aos demais íons estudados.

Tabela III.3.1 - Valores da separação de picos, ΔE_p , e do potencial formal, E° , obtidos utilizando eletrodo de Si:Zr:PQQ em diferentes eletrólitos a 20 mV s⁻¹. Solução 0,25 mol L⁻¹, pH 7,0.

Cátions 0,1 mol L ⁻¹ contra-íon NO ₃ ⁻	Si:Zr:PQQ		Ânions 0,1 mol L ⁻¹ contra-íon Na ⁺	Si:Zr:PQQ	
	ΔE_p / mV	E° / mV		ΔE_p / mV	E° / mV
Li ⁺	79	-92	Cl ⁻	82	-99
Na ⁺	73	-95	NO ₃ ⁻	73	-95
K ⁺	75	-108	SO ₄ ²⁻	69	-84
NH ₄ ⁺	63	-136	ClO ₄ ⁻	75	-98
Ca ²⁺	81	-98	H ₂ PO ₄ ⁻	40	-164

A resposta do eletrodo Si:Zr:PQQ também foi investigada na presença de íons Ca²⁺, em razão de a PQQ ter grande afinidade por este cátion. Entretanto, foi observado que os valores de ΔE_p e E° não diferem significativamente dos demais cátions estudados.

III.3.2.5 – Efeito da solução tampão

A Figura III.3.9 mostra os voltamogramas para o eletrodo Si:Zr:PQQ em diferentes soluções tampão. Uma melhor definição dos picos de oxidação e redução e um maior valor da densidade de corrente de pico foram obtidos em solução tampão fosfato (Figura III.3.9 e Tabela III.3.2). Na Tabela III.3.2 são mostrados os valores de ΔE_p e E° obtidos dos voltamogramas referentes à Figura III.3.9. O menor valor de ΔE_p foi obtido em solução fosfato, indicando que a difusão, neste caso, é mais efetiva do que para as demais soluções tampão, fato que possivelmente está relacionado com o tamanho do ânion e conseqüentemente com a mobilidade. Isto se torna mais evidente quando se observa o elevado valor da densidade de corrente de pico em solução tampão fosfato, ou seja, quanto maior a quantidade de íons que chegam até

a superfície do eletrodo, maior será o valor da densidade de corrente. Isto sugere que ânions são responsáveis pelo transporte de cargas.

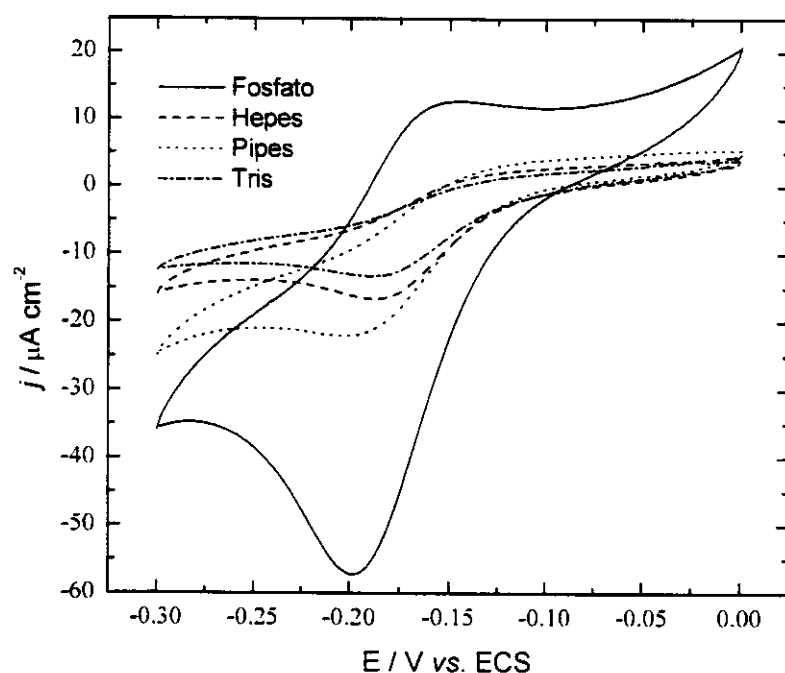


Figura III.3.9 – Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando o eletrodo Si:Zr:PQQ em diferentes soluções tampão $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 a 20 mV s^{-1} .

Tabela III.3.2 – Valores da separação de pico e do potencial formal obtidos em diferentes soluções tampão, pH igual a 7,0.

Solução tampão $0,25 \text{ mol L}^{-1}$	$\Delta E_p / \text{mV}$	$E^{\circ'} / \text{mV}$
Pipes	55	-162
Hepes	54	-152
Fosfato	45	-168
Tris	55	-155

III.3.2.6 - Influência dos íons Ca^{2+} na resposta do eletrodo Si:Zr:PQQ

Katz *et al.* (1994) mostraram em seu trabalho que a presença de íons Ca^{2+} dissolvidos em solução proporciona um considerável aumento na eletrooxidação de NADH usando eletrodo contendo PQQ imobilizada sobre eletrodo de ouro modificado. Por essa razão, a resposta do eletrodo Si:Zr:PQQ foi avaliada na presença dos íons Ca^{2+} .

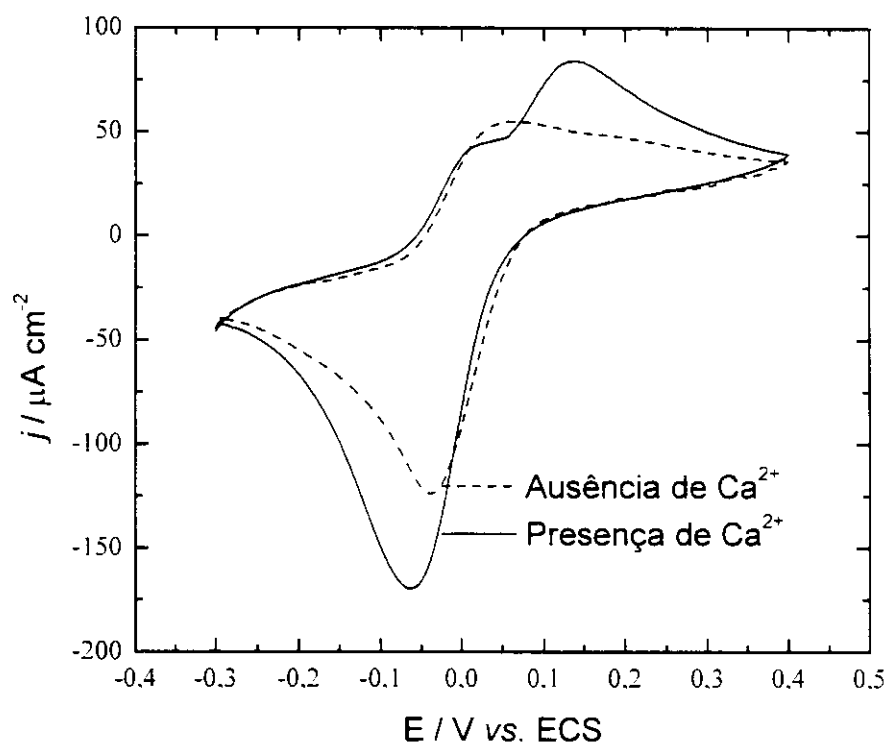


Figura III.3.10 - Voltamogramas obtidos utilizando eletrodo de Si:Zr:PQQ na ausência e presença de 10 mmol L^{-1} de Ca^{2+} . Solução fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH igual a 4,5.

A resposta do eletrodo Si:Zr:PQQ na presença de íons Ca^{2+} em pH 4,5 é apresentada na Figura III.3.10. Este valor de pH foi escolhido para verificar qual seria o efeito do íon Ca^{2+} , já que o eletrodo Si:Zr:PQQ apresenta uma maior potencialidade para a eletrooxidação do NADH (seção III.3.3.3) em pH igual a 4,5. Como pode ser verificado na Figura III.3.10, a presença deste íon causa o desaparecimento do segundo pico do eletrodo. Uma possível explicação seria que os

íons Ca^{2+} devem complexar com as duas diferentes formas de imobilização da PQQ sobre a Si:Zr, tirando desta forma o efeito da matriz.

Em termos de estabilidade do eletrodo Si:Zr:PQQ, verificou-se que a estabilidade foi maior na presença de Ca^{2+} , cuja densidade de corrente se manteve praticamente constante com os sucessivos ciclos voltamétricos apresentados na Figura III.3.11b. Por outro lado, na ausência deste íon, a corrente de pico anódica em E_{pa1} e E_{pa2} diminuiu, sendo mais acentuada em E_{pa2} , o que pode ser observado na Figura III.3.11a. Estes resultados foram melhores do que os obtidos nos estudos de Moore *et al.* (1996), onde os autores imobilizaram a PQQ sobre a superfície do eletrodo modificado com cistemina e polianilina e observaram que, em ambos os casos, houve a diminuição da corrente de pico em função dos sucessivos ciclos. Esta queda da corrente de pico em função do número de ciclos pode estar relacionada à perda da atividade da PQQ ou lixiviação desta para a solução. No caso em que a PQQ foi imobilizada sobre Si:Zr, a lixiviação da PQQ ou perda da atividade não foi observada na presença de Ca^{2+} , como pode ser observado na Figura III.3.11b.

Ao armazenar o eletrodo Si:Zr:PQQ, de um dia para outro, em solução contendo somente fosfato, pH 6,8, verificou-se que os picos de oxidação e de redução do voltamograma desaparecem, pois o fosfato deve competir com a PQQ pela matriz Si:Zr, já que o óxido de zircônio presente na matriz possui grande afinidade pelo grupo fosfato. Por outro lado, quando armazenado em solução contendo apenas íons Ca^{2+} , de um dia para outro, verificou-se que o processo redox do eletrodo Si:Zr:PQQ se mantém por um longo período de condicionamento. Esse fato pode estar relacionado com a dependência da atividade da PQQ imobilizada em função da presença dos íons Ca^{2+} (Schmidt & Schuhamann, 1996).

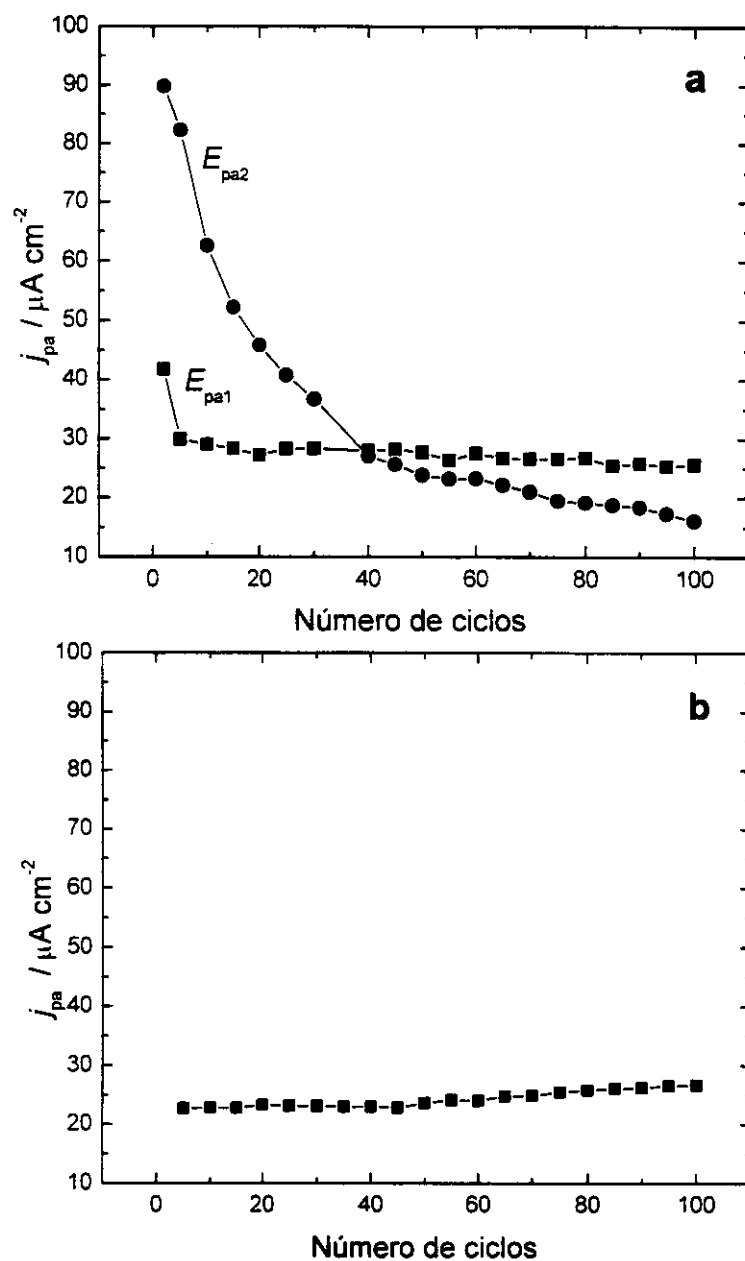


Figura III.3.11 - Estabilidade do eletrodo Si:Zr:PQQ em função do número de ciclos dos voltamogramas obtidos a 20 mV s^{-1} , na ausência (a) e presença de $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ (b). Solução fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5.

O efeito da velocidade de varredura sobre a resposta do eletrodo Si:Zr:PQQ em soluções em que os íons Ca^{2+} estão presentes e ausentes é apresentado na Figura III.3.12a e Figura III.3.12b. Para velocidades de varreduras maiores que 50 mV s^{-1} , observou-se maior reversibilidade.

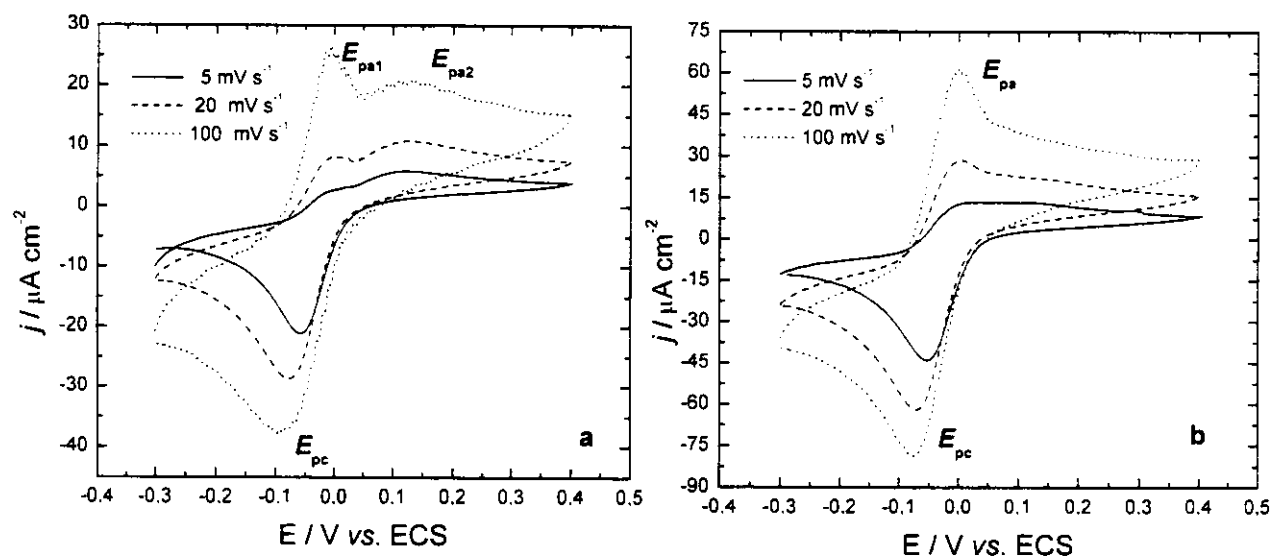


Figura III.3.12 - Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura na ausência (a) e presença de íons Ca^{2+} (b). Solução fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5.

As densidades de corrente dos picos anódicos, E_{pa1} e E_{pa} , apresentam comportamento linear em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando que o processo observado é semelhante ao processo controlado por difusão (Figura III.3.13a e Figura III.3.13b). Como a PQQ está imobilizada, o contra-íon deve ser a espécie que difunde para manter a neutralidade da superfície do eletrodo. Outra razão para este comportamento pode ser atribuída à resistência do material ou mecanismo de transferência de elétrons que ocorre pelo processo *jumping*.

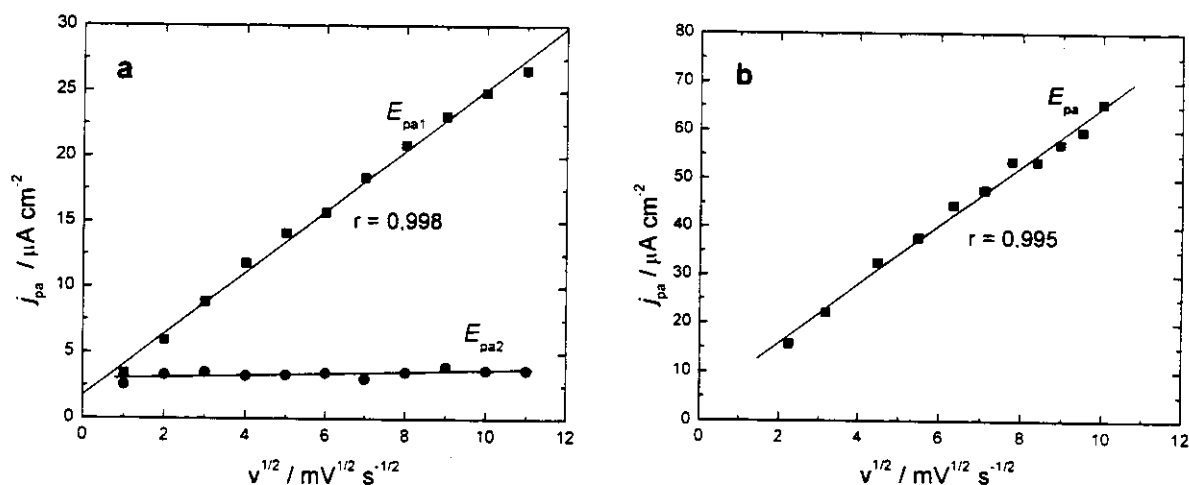


Figura III.3.13 - Densidade de corrente anódica obtida com eletrodo Si:Zr:PQQ em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na ausência (a) e na presença de íons Ca^{2+} (b). Solução tampão fosfato $0,25 mol L^{-1}$, pH 4,5.

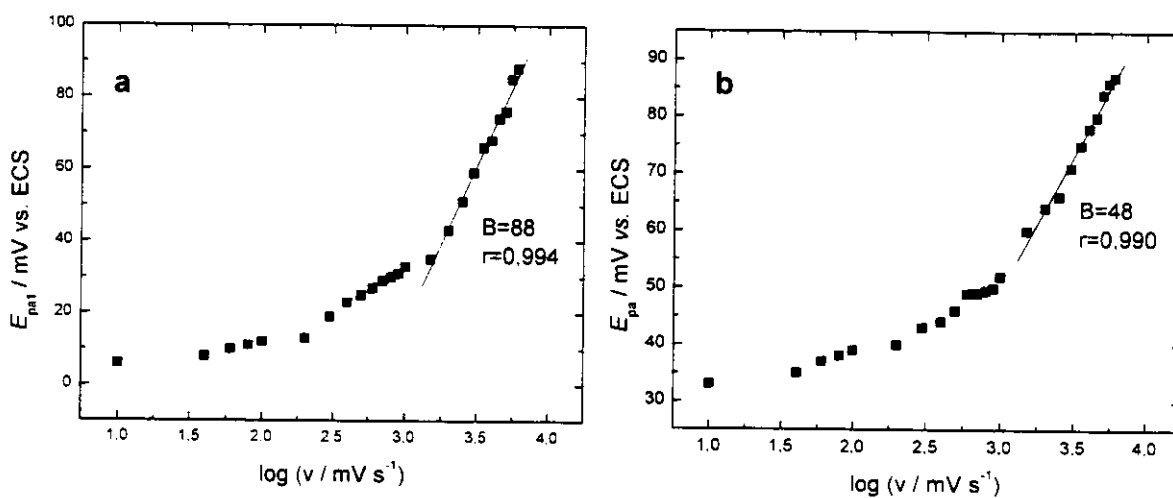


Figura III.3.14 - Dependência do primeiro potencial de pico anódico (E_{pa1}) na ausência (a) e potencial de pico anódico (E_{pa}) na presença de Ca^{2+} (b) em função do $\log v$. Solução fosfato $0,25 mol L^{-1}$, pH 4,5.

A constante de velocidade de transferência de elétrons aparente, k_s , do eletrodo Si:Zr:PQQ foi determinada, de acordo com Laviron (1980), a partir dos dados da Figura III.3.14, usando a seguinte equação:

$$\text{ângulo de inclinação da reta do pico anódico} = B = 2,3 RT/(1-\alpha)nF$$

$$k_s = (1-\alpha)nFv_a/RT$$

em que α é o coeficiente de transferência de elétrons; n é o número de elétrons, F é a constante de Faraday, R é a constante de gás, T é a temperatura e v (1 V s^{-1}) é a velocidade de varredura. Com a adição de íons Ca^{2+} , o valor de k_s mudou de 26 s^{-1} para 48 s^{-1} , indicando que a transferência de elétrons da PQQ para o eletrodo na presença de Ca^{2+} foi mais rápida, pois o valor de k_s é elevado. Esse aumento do valor de K_s também foi observado por Katz (1994), que imobilizou a PQQ sobre a monocamada de cistamina, em que, com a adição de Ca^{2+} , a constante de velocidade passou de 3,3 para $18,7 \text{ s}^{-1}$.

III.3.3 - Eletrooxidação de NADH utilizando eletrodo de Si:Zr:PQQ

O processo eletrocatalítico entre o mediador e o substrato é caracterizado pelo aumento da intensidade da corrente de pico de oxidação e diminuição da corrente de pico de redução devido à adição do substrato na solução.

A Figura III.3.15 mostra que a PQQ imobilizada sobre a Si:Zr apresenta propriedade eletrocatalítica de oxidar NADH em pH 7,0. Dessa forma, a otimização dos parâmetros analíticos e eletroquímicos para a melhor resposta do sensor para NADH foi avaliada.

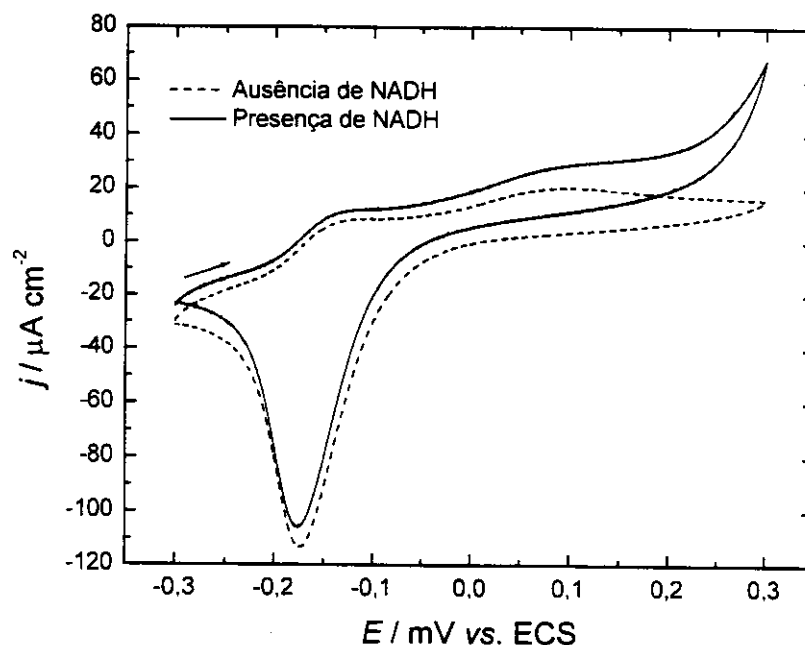


Figura III.3.15 - Voltamogramas cíclicos utilizando eletrodo Si:Zr:PQQ na ausência e na presença de 5 mmol L⁻¹ de NADH a 5 mV s⁻¹, solução tampão fosfato 0,25 mol L⁻¹, pH 7,0.

III.3.3.1 - Efeito da solução tampão na eletrocatalise de NADH

Foi avaliado o efeito da solução tampão na resposta da densidade de corrente catalítica do eletrodo Si:Zr:PQQ apresentado na Tabela III.3.3. O maior valor da corrente catalítica foi obtido em solução tampão fosfato, 11 $\mu\text{A cm}^{-2}$. Por outro lado, apesar da possibilidade de ocorrer a competição entre o fosfato da solução e a PQQ pela matriz Si:Zr, uma vez que o zircônio tem grande afinidade pelo grupo fosfato, foi em solução fosfato que a PQQ apresentou maior potencialidade em eletrooxidar NADH. A possível explicação para este efeito pode estar relacionada à formação de aducto, que consiste na formação de um complexo entre NADH e o fosfato, facilitando a eletrooxidação de NADH (Rover *et al.*, 1998).

Tabela III.3.3 - Densidade de corrente catalítica ($\Delta j_{\text{catalítica}}$), obtida a partir de medidas amperométricas para NADH (1 mmol L^{-1}) utilizando eletrodo Si:Zr:PQQ em diferentes soluções tampão (pH 7,0). $E_{\text{aplicado}}=100 \text{ mV vs. ECS}$ e $v=20 \text{ mV s}^{-1}$.

Tampão	$\Delta j_{\text{catalítica}} / \mu\text{A cm}^{-2}$
Pipes	$6,0 \pm 0,8$
Hepes	$3,0 \pm 0,5$
Tris	$3,2 \pm 0,5$
Fosfato	$11,0 \pm 1,1$

III.3.3.2 - Efeito do potencial aplicado

Foi avaliado o efeito do potencial aplicado na eletrocatalise de NADH (Tabela III.3.4). O valor de $\Delta j_{\text{catalítica}}$ praticamente manteve-se constante nos diferentes potenciais estudados. Apesar disso, o potencial escolhido para os experimentos de cronoamperometria foi de 150 mV vs. ECS por ser próximo ao potencial do segundo pico de oxidação, E_{pa2} , da PQQ imobilizada sobre Si:Zr, garantido dessa forma que a PQQ imobilizada seja totalmente oxidada.

Tabela III.3.4 - Densidade da corrente eletrocatalítica da oxidação de NADH em diferentes potenciais aplicados. Solução tampão fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.

$E_{\text{aplicado vs. ECS}}$ mV	$\Delta j_{\text{catalítica}}$ $\mu\text{A cm}^{-2}$
50	6
100	8
150	11
200	16

III.3.3.3 - Influência do pH na eletrooxidação de NADH

O efeito do pH na resposta eletrocatalítica do eletrodo Si:Zr:PQQ em oxidar o NADH foi avaliado e é apresentado na Figura III.3.16. A melhor resposta eletrocatalítica para a oxidação de NADH foi obtida em pH 4,5. Em meio ácido a reação entre NADH e PQQ é favorecida, isto porque os prótons estão envolvidos no mecanismo de oxidação de NADH. Porém, abaixo de pH 4,5, ocorre a diminuição da resposta do eletrodo, a qual deve estar relacionada com a baixa estabilidade de NADH em meio ácido. O pH usado para os estudos da eletrooxidação do NADH foi o de 4,5.

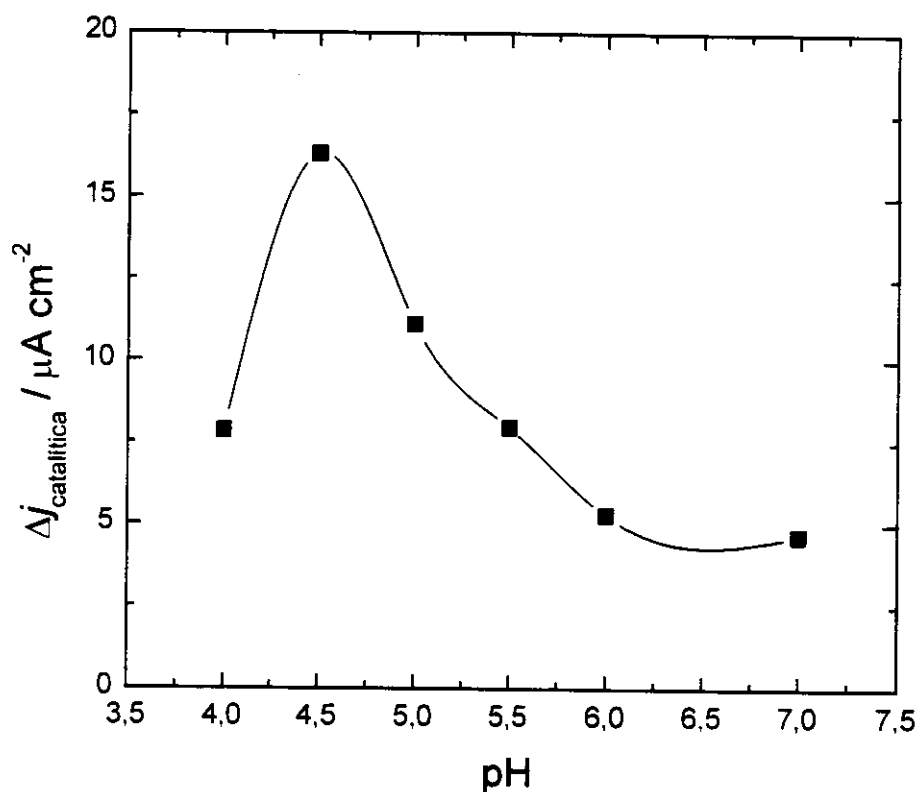


Figura III.3.16 – Variação da densidade de corrente catalítica para 1 mmol L⁻¹ de NADH em função do pH da solução, $E_{\text{aplicado}} = 150$ mV vs. ECS.

O mecanismo da eletrooxidação de NADH utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com Si:Zr:PQQ pode ser representado de acordo com esquema apresentado na Figura III.3.17.

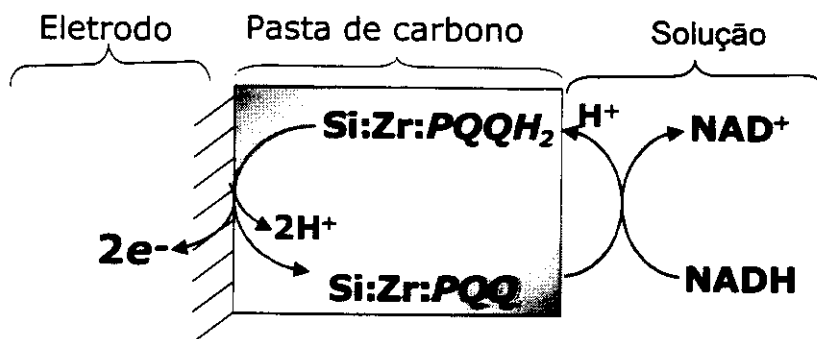


Figura III.3.17 - Representação esquemática da eletrooxidação de NADH utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com Si:Zr:PQQ.

Inicialmente, o NADH é oxidado para NAD⁺ na interface superfície do eletrodo/solução e a PQQ imobilizada sobre Si:Zr é reduzida para PQQH₂. Logo após a PQQH₂ é reoxidada para PQQ sobre a superfície do eletrodo com transferência de elétrons.

III.3.3.4 - Eletrooxidação do NADH utilizando eletrodo Si:Zr:PQQ na ausência e presença de íons Ca²⁺

A Figura III.3.18 é apresentado os voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo Si:Zr:PQQ na ausência e presença de NADH. Ao adicionar NADH na solução houve um aumento no sinal de densidade de corrente de pico de oxidação e diminuição da densidade de corrente de pico de redução devido a eletrooxidação de NADH. O valor da densidade de corrente catalítica de 53 $\mu\text{A cm}^{-2}$ foi obtido a partir da diferença entre a densidade de corrente de pico de oxidação na presença e da densidade de corrente de pico de oxidação na ausência de NADH (Figura III.3.18). A Figura III.3.18b mostra que o íon Ca²⁺ não teve influência significativa no valor da densidade de corrente catalítica, 49 $\mu\text{A cm}^{-2}$.

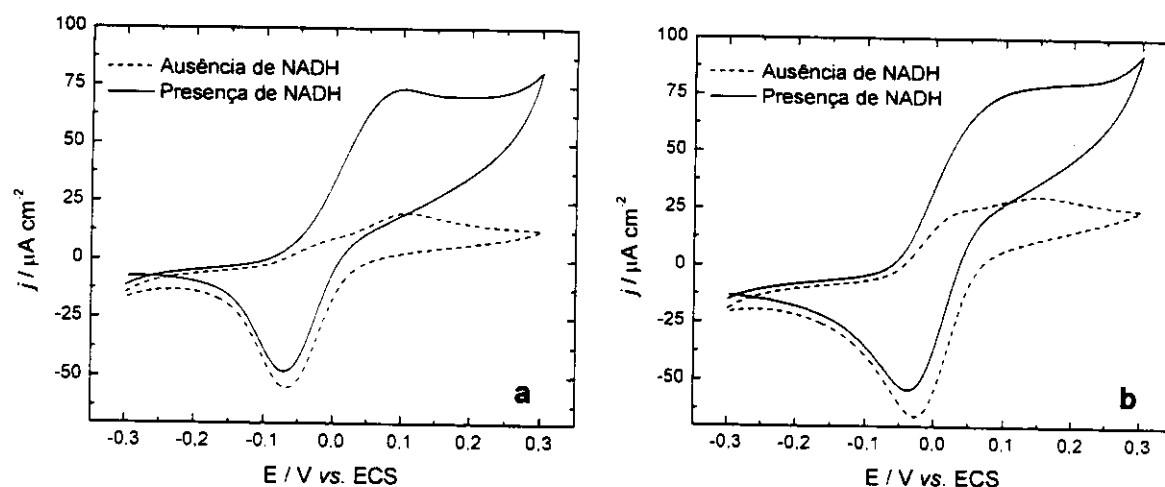


Figura III.3.18 - Voltamogramas cíclicos utilizando eletrodo Si:Zr:PQQ na ausência (a) e na presença de 10 mmol L^{-1} de cálcio (b). Adição de 5 mmol L^{-1} de NADH a 5 mV s^{-1} , solução fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, valor de pH igual a 4,5.

De acordo com Katz *et al.* (1994) demonstraram que a presença de Ca^{2+} dissolvido em solução aumenta consideravelmente a potencialidade da PQQ, imobilizada sobre cistamina, em eletrooxidar o NADH. Estes autores sugeriram a formação de um complexo ternário entre o íon Ca^{2+} , a PQQ imobilizada e o NADH, favorecendo, dessa forma, a oxidação de NADH. No presente trabalho, usando eletrodo Si:Zr:PQQ, o íon Ca^{2+} (Figura III.3.18b) não apresentou influência significativa como o observado por Katz *et al.* (1994). Possivelmente, a forma que a PQQ se encontra imobilizada sobre a matriz Si:Zr dificulta a formação do complexo ternário entre a PQQ e o Ca^{2+} o que resulta no comportamento da PQQ descrito acima. A combinação do grupo carboxílico na posição C(7), ilustrado na Figura III.3.19, do nitrogênio na posição N(6) e C(5) do grupo carbonila foi sugerida como o fator responsável pela complexação do íon Ca^{2+} (Duine, 1991).

O complexo formado entre Ca^{2+} e PQQ descrito na literatura (Katz *et al.*, 1994; Duine, 1991) é esquematicamente mostrado na Figura III.3.19.

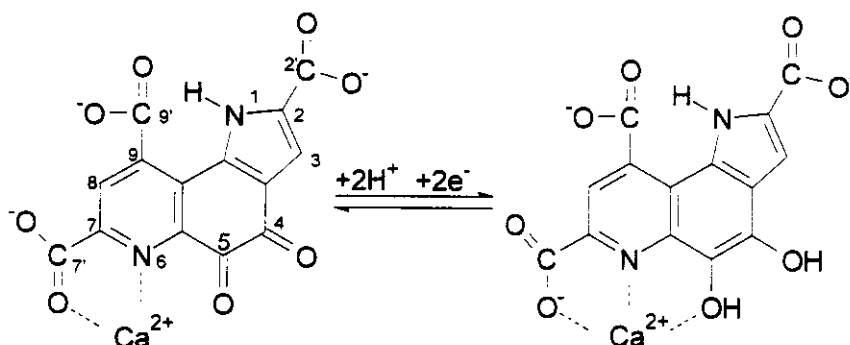


Figura III.3.19 - Representação esquemática do complexo formado entre a forma oxidada e a forma reduzida da PQQ e íon Ca^{2+} .

Segundo Noar *et al.* (1985), a ausência ou bloqueio do grupo carboxílico na posição C(9) ou/e na posição C(2) apresentou pequeno efeito sobre a propriedade de complexação do íon com derivados da PQQ, mas a ausência ou bloqueio do grupo carboxílico na posição C(7) diminui drasticamente a complexação com o íon (Noar *et al.*, 1985), ou seja, somente as moléculas de PQQ imobilizadas sobre a superfície que não apresentem grupos carboxílicos na posição C(7) bloqueados são responsáveis pela interação entre o Ca^{2+} e a PQQ imobilizada.

No presente estudo, uma das formas que a PQQ deve estar imobilizada sobre a superfície da matriz Si:Zr deve ser pelo grupo carboxílico na posição C(7), dificultando a formação do complexo ternário da $\text{PQQ}:\text{Ca}^{2+}:\text{NADH}$. Esta interação entre o grupo carboxílico na posição C(7) da PQQ com o íon Ca^{2+} deve ser fraca, sendo este o motivo do eletrodo Si:Zr:PQQ não apresentar um aumento considerável na oxidação de NADH devido a presença de íons Ca^{2+} .

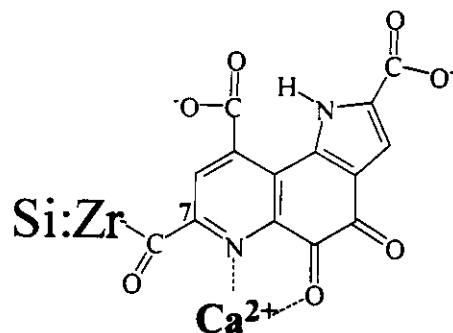


Figura III.3.20 - Representação esquemática do complexo formado entre a PQQ imobilizada sobre a superfície da sílica gel modificada com óxido de zircônio (Si:Zr) com o íon Ca^{2+} .

A Figura III.3.21 mostra a corrente devida à resposta catalítica do eletrodo Si:Zr:PQQ para diferentes concentrações de NADH, aplicando um potencial de 150 mV vs. ECS, na ausência e na presença de íons Ca^{2+} . A curva analítica obtida para NADH na presença de Ca^{2+} (Figura III.3.21b) foi ajustada no intervalo de resposta entre 3 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NADH, pela equação $\Delta j_{\text{Ca}^{2+}} = 0.0247(\pm 0.014) + 42.2(\pm 1.5)[\text{NADH}] - 284(\pm 36)[\text{NADH}]^2$ com coeficiente de correlação de 0,999 para $n=12$, em que a variação da densidade de corrente é dada em $\mu\text{A cm}^{-2}$ e a concentração de NADH em mmol L^{-1} . A curva analítica na ausência de Ca^{2+} apresentou uma maior sensibilidade cuja equação é dada por $\Delta j = -0.07491(\pm 0.0153) + 102.9(\pm 3.09)[\text{NADH}] - 2142(\pm 133)[\text{NADH}]^2$ e coeficiente de correlação de 0,999 para $n=4$ no intervalo de 3 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NADH (Figura 3.III.21a). O eletrodo Si:Zr:PQQ apresentou maior sensibilidade ao NADH quando o íon Ca^{2+} não estava presente, como pode ser observado na Figura III.3.21. Porém, mesmo na presença do Ca^{2+} , a sensibilidade do eletrodo Si:Zr:PQQ foi bem maior do que aquela relatada por outros autores, os quais imobilizaram PQQ sobre eletrodo de ouro modificado com cistamina (Willner & Riklin, 1994).

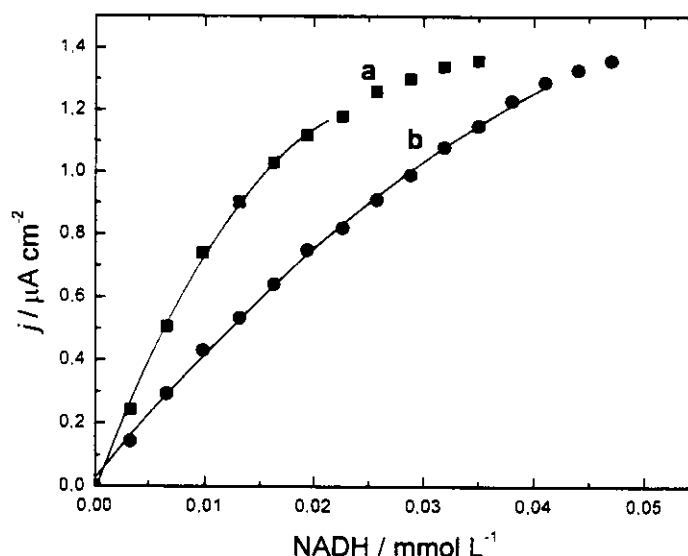


Figura III.3.21- Dependência da densidade de corrente em função da concentração de NADH usando eletrodo Si:Zr:PQQ na ausência (a) e na presença de íon Ca^{2+} (b). Potencial aplicado de 150 mV vs. ECS, solução tampão fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5.

O tempo de resposta do eletrodo Si:Zr:PQQ foi rápido, menor do que 0,5 s, e pode ser definido como sendo o intervalo de tempo necessário, desde a adição de substrato até sua estabilização (Figura III.3.22).

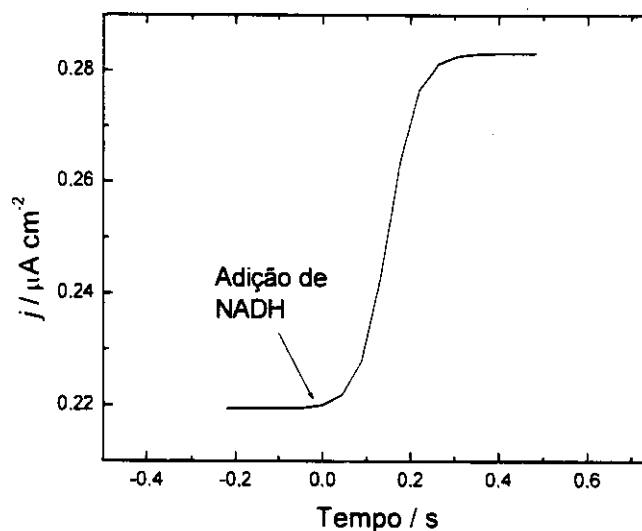
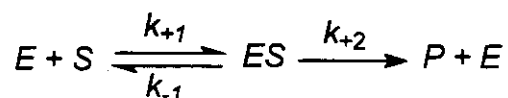


Figura III.3.22 - Tempo de resposta obtido para eletrodo Si:Zr:PQQ, adição de $5,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ NADH, aplicando um potencial de 150 mV vs. ECS. Solução fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e CaCl_2 10 mmol L^{-1} , pH 4,5.

A partir do gráfico da Figura III.3.21, foi calculada a estimativa da constante de Michaelis-Menten aparente, K_M , segundo Lineweaver-Burk. Considerando que o cofator PQQ faz parte do sítio ativo da enzima, foi calculada K_M , que é um parâmetro avaliado em sistemas enzimáticos. O valor de K_M pode ser considerado como sendo inversamente proporcional à afinidade da enzima pelo substrato, ou seja, quanto menor o seu valor, maior será a afinidade entre a enzima e o substrato. Segundo a teoria de Michaelis-Menten, a enzima, E , inicialmente combina com o substrato, S , formando um complexo enzima-substrato intermediário de transição, ES , que depois de rompido forma o produto, P , enquanto isso a enzima é regenerada:



em que $K_M = (k_{-1} + k_{+2}) / k_{+1}$

A determinação do valor de K_M obtido segundo Lineweaver-Burk é dado pela equação:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\text{máx}}} + \frac{K_M}{V_{\text{máx}}} \frac{1}{[S]}$$

em que K_M é a constante de Michaelis-Menten, $V_{\text{máx}}$ é a velocidade máxima da reação e S é a concentração do substrato. Para sensores amperométricos, pode-se fazer uma analogia, substituindo a velocidade da reação (V) pela corrente catalítica do substrato (I).

A estimativa da constante de Michaelis-Menten e a densidade de corrente máxima da eletrooxidação de NADH utilizando eletrodo Si:Zr:PQQ são apresentadas na Tabela III.3.5.

Tabela III.3.5 - Estimativa da constante aparente de Michaelis-Menten e da densidade de corrente máxima obtida pelo método de Lineweaver-Burk.

Constantes	Ausência de íons Ca^{2+}	Presença de íons Ca^{2+}
K_M	$0,015(\pm 0,001) \text{ mmol L}^{-1}$	$0,09(\pm 0,01) \text{ mmol L}^{-1}$
$j_{\text{máx}}$	$2,9(\pm 0,4) \mu\text{A cm}^{-2}$	$5,2(\pm 0,2) \mu\text{A cm}^{-2}$

A partir dos dados acima foi verificada uma maior afinidade do NADH pela PQQ, em soluções isentas de Ca^{2+} , visto que quanto menor o valor de K_M maior a afinidade do substrato pela espécie ativa. Por outro lado, o valor de $j_{\text{máx}}$ foi maior na presença de íons Ca^{2+} , devido à faixa de resposta linear mais ampla.

A estabilidade do eletrodo Si:Zr:PQQ, a partir das curvas de calibração para NADH, foi estudada graficando a sensibilidade do eletrodo em diferentes dias em relação à sensibilidade do primeiro dia de uso. O condicionamento do eletrodo após o uso foi realizado em água (Figura III.3.23a) e em solução de 3 mmol L^{-1} íons Ca^{2+} (Figura III.3.23b). A PQQ imobilizada apresentou baixa estabilidade quando condicionada em água. Entretanto, quando condicionada em solução de íons Ca^{2+} sua atividade se manteve por um período maior, o que mostra que o íon Ca^{2+} deve apresentar um papel importante na estabilização da PQQ. Portanto, além do tipo de configuração do eletrodo, este estudo mostrou que a forma de armazenamento deste tem grande influência em seu tempo de vida útil. Este trabalho abre caminhos para uma nova maneira de imobilizar a PQQ para a construção de eletrodo de pasta de carbono modificado, o qual apresenta grande potencialidade para ser utilizado na determinação de NADH.

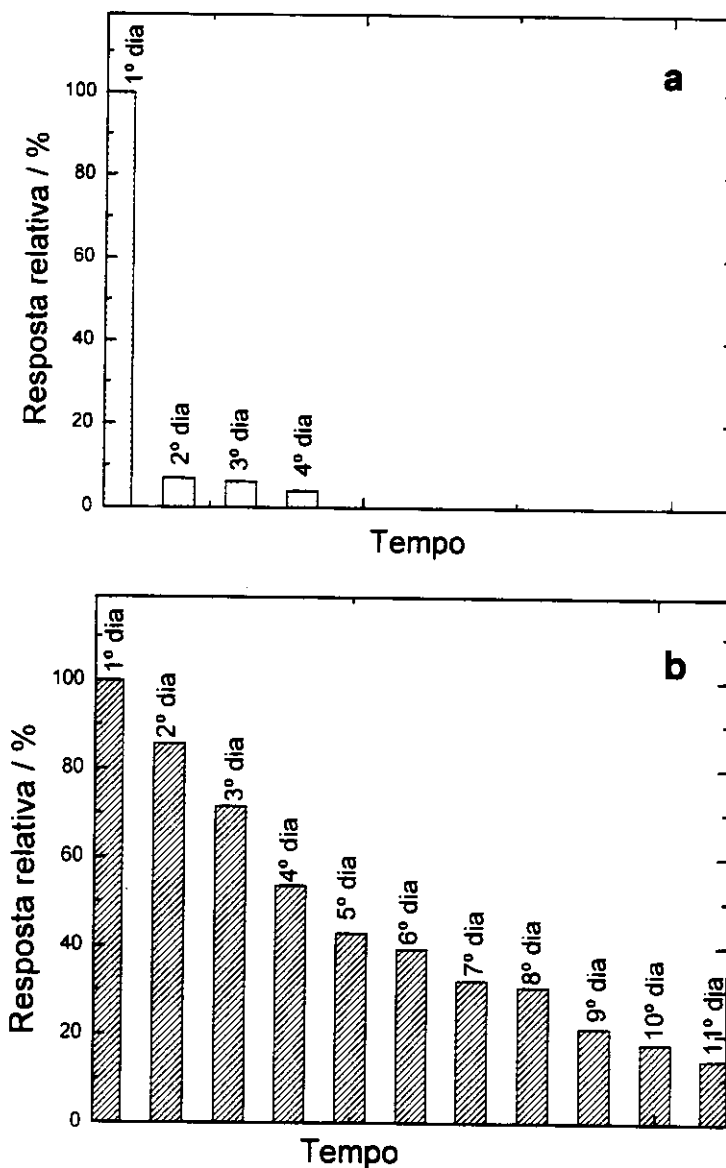


Figura III.3.23 - Resposta relativa da sensibilidade de NADH obtida por cronoamperometria, utilizando eletrodo Si:Zr:PQQ, realizada em diferentes dias na ausência (a) e na presença de íons Ca^{2+} (b). Solução fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH igual a 4,5 com um potencial aplicado de 150 mV vs. ECS.

III.4 - CONCLUSÕES

A PQQ foi eficientemente imobilizada sobre a sílica gel modificada com óxido de zircônio, Si:Zr, através da interação entre o grupo carboxílico da PQQ da posição C(7) da estrutura e o óxido de zircônio. Com a imobilização verificaram-se dois picos de oxidação e apenas um pico de redução, diferente dos estudos descritos na literatura, nos quais foram relatados apenas um pico de oxidação e um pico de redução. Os dois picos de oxidação do eletrodo Si:Zr:PQQ foram atribuídos a duas formas diferentes de interações da PQQ sobre a matriz Si:Zr.

O eletrodo Si:Zr:PQQ apresentou potencialidade eletrocatalítica para oxidar a NADH a um potencial relativamente menor (150 mV vs. ECS) quando comparado com eletrodos não modificados (~400 mV vs. ECS). A adição de íons Ca^{2+} na solução ocasionou o aumento na constante de transferência de elétrons entre a PQQ e o eletrodo de 26 s^{-1} para 48 s^{-1} , que é comparável aos descritos na literatura. Porém, nenhum aumento da potencialidade eletrocatalítica da PQQ imobilizada em oxidar o NADH, devido à adição de íons Ca^{2+} , foi observado. A interação entre o grupo carboxílico na posição C(7) da PQQ com o íon Ca^{2+} deve ser fraca, sendo este o motivo do eletrodo Si:Zr:PQQ não apresentar um aumento considerável na atividade catalítica de oxidar a NADH em relação à situação em que este íon está ausente.

Eletrodo a base de PQQ imobilizada sobre Si:Zr, tal como proposto neste trabalho, apresenta alta sensibilidade e rápido tempo de resposta, tendo, por isso, grande potencialidade para ser empregado na quantificação do NADH.

III.5 - REFERÊNCIAS

- Bardea, A.; Katz, E.; Bückmann, A. F.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (1997) 9114.
- Curulli, A.; Carelli, I.; Trischitta, O.; Palleschi, G. *Biosensors & Bioelectronics*. 12 (1997) 1043.
- Duine, J. A. *Eur. J. Biochem.* 200 (1991) 271.
- Husain, M.; Davidson, V. L.; Gray, K. A.; Knaff, D. B. *Biochemistry*, 26 (1987) 4139.
- Ikeda, T.; Matsubara, H.; Kato, K.; Iswantini, D.; Kano, K.; Yamada, M. *J. Electroanal. Chem.*, 449 (1998) 219.
- Kano, K.; Mori, K.; Uno, B.; Kubota, T.; Ikeda, T.; Senda, M. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 23 (1990) 227.
- Katz, E.; Heleg-Shabtai, V. Willner, B.; Willner, I. Bückmann, A. F. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 42 (1997) 95.
- Katz, E.; Lion-Dagan, M.; Willner, I. *J. Electroanal. Chem.*, 408 (1996) 107.
- Katz, E.; Schlereth, D. D.; Schmidt, H.-L. *J. Electroanal. Chem.*, 367 (1994a) 59.
- Katz, E.; Schlereth, D. D.; Schmidt, H.-L. *J. Electroanal. Chem.*, 368 (1994b) 165.
- Katz, E.; Willner, I. *J. Electroanal. Chem.*, 418 (1996) 67.
- Khan, G. F.; Shinohara, H.; Ikariyama, Y.; Aizawa, M. *J. Electroanal. Chem.* 315 (1991) 263.
- Laviron, E.; *J. Electroanal. Chem.*, 115 (1980) 65-74
- Loughran, M. G.; Hall, J. M.; Turner, A. P. F. *Electroanalysis*, 8 (1996) 107.
- Moore, A. N. J.; Katz, E.; Willner, I. *Electroanalysis*, 8 (1996) 1092.
- Noar, J. B.; Rodrigues, E. J.; Bruce, T. C. *J. Am. Chem. Soc.*, 107(1985) 7198.
- Rover, L.; Fernandes, J. C. B.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T.; Katekawa, E.; Serrano, S. H. P. *Anal. Biochem.*, 260 (1998) 50.
- Schmidt, B. *Clinica Chim. Acta*, 266 (1997) 33-37.
- Schmidt, H.-L.; Schuhamann; W.; *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 11 (1996) 127.

Shinohara, H.; Khan, G. F.; Ikariyama, Y.; Aizawa, M.; *J. Electroanal. Chem.*, 304 (1991) 75.

Willner, I.; Riklin, A.; *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1535.