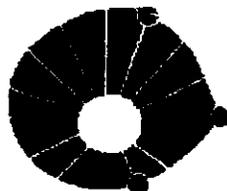


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA



UNICAMP



**DETERMINAÇÃO SELETIVA DE p-NITROFENOL COM  
ELETRODO DE CARBONO VÍTREO RECOBERTO COM  
MEMBRANA DE NAFION**

Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão de Pós-graduação do Instituto de Química como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

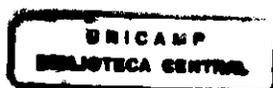
*Aluno: Percy Calvo Marzal*

*Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota*

Campinas-SP

Agosto 2000

200101891



*Dedico esta Tese a minha mãe Maria V. Marzal Gamarra. por seu amor, dedicação e apoio em todo momento, para que lograsse meus objetivos traçados.*

*A meus irmãos Celia e Jhonny que sempre me apoiaram para sair adiante.*

*Ao Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota  
pela orientação, dedicação, apoio, amizade  
e interesse com que acompanhou o  
desenvolvimento deste trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, pela oportunidade concedida na minha formação.

Ao corpo docente do Departamento de Química Analítica IQ-UNICAMP pelos ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial a Bel e André da CPG pela eficiência em suas funções e apoio constante desde minha chegada ao Brasil, e a todos da Biblioteca do IQ por estarem sempre disponíveis.

A CAPES pelo auxílio financeiro e bolsa concedido.

A meus colegas do Laboratorio Antonio, Arnaldo, Adriana, Beth, Eric, Júlio, Karin, Laércio, Miyuki, Rogério, Rosângela, Simone e Tânia, Valter pelo companheirismo, participação e bom humor.

Ao Prof. Ronei e seus alunos colegas do laboratorio: Cleidiane, Eduardo, Jaqueline, Marcelo, Paulo, Rosângela e Sílvio.

Ao Prof. Bertran e seus alunos colegas do laboratorio: Bete e Nidi.

Ao Prof. Hiroshi Aoyama do Instituto de Biologia da UNICAMP pela contribuição deste trabalho.

A todos os amigos que encontrei durante estes dois anos: Karin, Maria, Gliseida, Jaqueline, Rodolfo, Anita, Adélia, Pilar, José, Berenice, Gaspar, Celina, Rigoberto, Maria del Jesus, Antonio, Atenor, e Roberto pela amizade, motivação e convívio amistoso.

A minha avó Julia e meus tios, Adriana, Alejandrina, Elena, Fermina, Felicita, Luis e Orfelinda, e a todos meus primos.

Aos professores da UNMSM, Dolores, Inés, Nancy, Marco, Alé, Arroyo pelo apoio e orientação durante minha graduação.

A meus amigos da UNMSM, Alejandro, Alberto, Alex, Eduardo, Felix, Inés, Ivon, Jhon, José, Jorge, Juvenal, Luis, Manuel, Milagros, Ofelia, Oscar, Ruben, e Yesica, Ysabel.

*Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”*

*Albert Einstein*

## RESUMO

**Titulo: Determinação seletiva de p-nitrofenol com eletrodo de carbono vítreo recoberto com membrana de Nafion.**

**Autor** : Percy Calvo Marzal

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

**Palavras chave**: eletrodo quimicamente modificado, p-nitrofenilfosfato, fosfatase ácida, voltametria de pulso diferencial.

A presente dissertação descreve o desenvolvimento de um eletrodo modificado para a determinação seletiva de p-nitrofenol (pNF) e sua aplicação em determinações de atividade enzimática de fosfatases ácidas, cujo substrato é o p-nitrofenilfosfato (pNFF).

Inicialmente foi estudado o comportamento eletroquímico do pNF sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial. As condições otimizadas para a redução do grupo nitro foram: amplitude de pulso de 25 mV, velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup>, tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e pH entre 4 e 6. O eletrodo apresentou uma faixa de resposta linear de 2,0 10<sup>-5</sup> a 1,9 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> para o pNF, com eletrodo sem modificação. Entretanto, o pNFF apresentou um potencial de redução muito próximo do pNF, interferindo na resposta eletroquímica. A eliminação da interferência do pNFF foi obtida recobrindo a superfície do eletrodo de carbono vítreo com uma membrana de Nafion. Um volume de 25 µL de uma solução de Nafion 5% (m/v) foi suficiente para formar um filme sobre a superfície do eletrodo para eliminar a interferência do pNFF. Contudo a presença da membrana de Nafion provocou uma diminuição na sensibilidade de 18,5 para 8,8 µA mmol<sup>-1</sup> L e um aumento no limite de detecção de 14,86 para 17,08 µmol L<sup>-1</sup> para a determinação de pNF. Este comportamento foi atribuído à diminuição da constante de velocidade de transferência de elétrons ( $k_f$ ), e demonstrado através do

estudo cinético com o eletrodo de carbono vítreo recoberto com membrana de Nafion ( $k_f = 3,34 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ ) em comparação com o eletrodo de carbono vítreo sem membrana ( $k_f = 7,67 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ ). O eletrodo de carbono vítreo recoberto com membrana de Nafion mostrou um intervalo de resposta linear de  $2,0 \cdot 10^{-5}$  a  $2,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  para o pNF, ajustado pela equação:

$$I_p = 0,157(\pm 0,015) + 0,0089(\pm 0,0001) [\text{pNF}]$$

para  $N = 22$ , com um coeficiente de correlação linear de 0,9984.

O eletrodo de carbono vítreo recoberto com membrana de Nafion foi empregado para a determinação da atividade enzimática da fosfatase ácida de semente de mamona sendo o valor de  $K_m$  encontrado de  $0,31 \text{ mmol L}^{-1}$ , o que é da mesma ordem de grandeza ao obtido pelo método espectrofotométrico reportado na literatura cujo valor foi de  $0,52 \text{ mmol L}^{-1}$ .

**ABSTRACT**

**Title: Selective Determination of p-nitrophenol with glassy carbon electrode covered with Nafion membrane.**

**Author** : Percy Calvo Marzal

**Supervisor** : Lauro Tatsuo Kubota

**Key-words**: chemically modified electrode, p-nitrophenilphosphate, acid phosphatase, differential pulse voltammetry.

The development of a modified electrode for the selective determination of p-nitrophenol (pNP), as well as its application in the determination of enzyme activity of acid phosphatase, which the p-nitrophenilphosphate (pNPP) is the substrate, is described in this dissertation.

Initially the electrochemical behavior of the pNP on the glassy carbon electrode surface using the differential pulse voltammetry technique was studied. The optimized conditions for nitro group reduction were: pulse height of 25 mV, scan rate of 10 mV s<sup>-1</sup>, 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer with pH between 4 and 6. The electrode showed a linear response range of 2.0 10<sup>-5</sup> a 1.9 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> for pNP, before electrode modification. However, pNPP showed a reduction potential peak very closed to the pNP peak, interfering in the electrochemical response. The pNPP interference was eliminated covering the surface with a Nafion membrane. A volume of 25 µL of a 5% (m/v) Nafion was enough to form a film on the electrode surface for pNPP interference elimination. However the Nafion membrane provoked decrease in the sensitivity from 18.5 to 8.8 µA mmol<sup>-1</sup> L and an increase in the detection limit for 14.86 to 17.08 µmol L<sup>-1</sup> for pNP determination. This behavior was attributed to the decreasing in the electron transfer constant ( $k_f$ ), demonstrated by the kinetic study with the electrode covered with the Nafion membrane ( $k_f = 3.34 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ ) in comparison to the naked electrode ( $k_f = 7.67 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ ). The glassy carbon electrode covered with Nafion

membrane showed a linear response from  $2.0 \times 10^{-5}$  to  $2.3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  for pNP, adjusted by the equation  $I_p = 0.157(\pm 0.015) + 0.0089(\pm 0.0001) [\text{pNP}]$ , for  $N = 22$  with a correlation coefficient of 0.998.

The modified electrode was employed for determination of enzyme activity of acid phosphatase from castor bean (*Ricinus communis* L., IAC-80) found a  $K_m$  value of  $0.31 \text{ mmol L}^{-1}$ , that is in agreement to that obtained with spectrophotometric method which is  $0.52 \text{ mmol L}^{-1}$ .

## ***CURRICULUM VITAE***

### ***1. Dados Pessoais:***

Nome: Percy Calvo Marzal  
Nacionalidade: Peruana  
Nascimento: 29 de Janeiro de 1968  
Identificação: RNE: V226878-Y

### ***2. Formação:***

Escola Primária: C. N. M. N° 1174, concluído em 1979, Lima-Perú  
Escola Secundária: C. N. M. N° 1174, concluído em 1984, Lima Peru  
Bacheler em Química – Curso de Química, concluído em 1995, na Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

### ***3. Trabalhos Apresentados em Congressos:***

10° Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), realizado em Santa Maria-RS, “*Determinação Seletiva de p-nitrofenol com Eletrodo de Carbono Vítreo recoberto com membrana de Nafion*”, Calvo Marzal, P; Kubota, L. T.; Aoyama, H.; de 31 de Agosto a 3 de Setembro de 1999. Livro de Resumos, EL-26.

23ª Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Poços de Caldas-MG, “*Estudo cinético da redução eletroquímica de p-nitrofenol sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo recoberto com membrana de Nafion*”, Calvo Marzal, P.; Kubota, L. T.; Aoyama, H.; de 23 a 26 de Maio de 2000. Livro de Resumos, EQ-145.

***Percy Calvo Marzal***

## ÍNDICE

	Página
<b><i>I. Eletrodos Quimicamente Modificados.</i></b>	1
I.1. Eletroanálise.	2
I.1.1. Eletrocatalise.	3
I.1.2. Pré-Concentração.	5
I.1.3. Exclusão de Interferentes.	7
I.2. Preparação de EQMs.	9
I.2.1. Eletrodo Base.	9
I.2.2. Métodos de Imobilização do Modificador	10
<b><i>II. O p-nitrofenol.</i></b>	15
II.1. Métodos de Determinação.	15
II.2. Comportamento Eletroquímico do p-nitrofenol.	16
<b><i>III. Fosfatases Ácidas.</i></b>	18
III.1. Distribuição das fosfatases ácidas.	19
III.2. Importância da determinação das fosfatases ácidas em diagnósticos clínicos.	20
<b><i>IV. Objetivos.</i></b>	22
<b><i>V. Parte Experimental.</i></b>	23
V.1. Reagentes e Soluções.	23
V.2. Aparelhagem.	23
V.3. Limpeza do Eletrodo de Trabalho.	25
V.4. Comportamento Eletroquímico do pNF.	25

V.5. Estudo do Efeito do pH.	25
V.6. Obtenção da Curva Analítica.	26
V.7. Estudo da Interferência do pNFF.	26
V.8. Preparação do Eletrodo de Carbono Vítreo com membrana de Nafion.	27
V.9. Estudo Cinético.	28
V.10. Aplicação do Eletrodo na Determinação da Atividade da Fosfatase ácida da semente da Mamona.	28
V.10.1. Efeito do tempo de Incubação.	29
V.10.2. Determinação de Km, V <sub>máx</sub> e Atividade Enzimática.	29
<b>VI. Resultados e Discussões.</b>	31
VI.1. Limpeza do Eletrodo de Trabalho.	31
VI.2. Comportamento Eletroquímico do pNF.	32
VI.3. Estudo do Efeito do pH.	34
VI.4. Obtenção da Curva Analítica.	36
VI.5. Estudo da Interferência do pNFF.	38
VI.6. Preparação do Eletrodo de Carbono Vítreo com membrana de Nafion.	41
VI.7. Estudo Cinético.	46
VI.7.1. Estudo cinético do eletrodo sem membrana de Nafion.	47
VI.7.2. Estudo cinético do eletrodo de carbono vítreo com membrana de Nafion.	52

VI.8. Aplicação do eletrodo recoberto com membrana de Nafion na determinação da Atividade da Fosfatase Ácida da Mamona.	56
VI.8.1. Efeito do tempo de Incubação.	58
VI.8.2. Determinação de Km, V <sub>máx</sub> e Atividade Enzimática.	60
<b><i>VII. Conclusões.</i></b>	64
<b><i>VIII. Referências Bibliográficas.</i></b>	65

## ***I. ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS (EQM).***

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi introduzido por Murray e col.[1] em 1975 para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, deliberadamente imobilizadas em suas superfícies, com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução. A modificação da superfície do eletrodo, forma de impor e controlar sua reatividade e/ou seletividade, possibilita o desenvolvimento de eletrodos para vários propósitos e aplicações.

Os primeiros trabalhos envolvendo a preparação de eletrodos com superfícies modificadas surgiram no início da década de 70. Até então só eram utilizados eletrodos de materiais ditos “inertes” tais como carbono, ouro, platina e mercúrio.

O primeiro exemplo de uma modificação deliberada da superfície de um eletrodo foi o trabalho de Lane e Hubbard[2]. Estes pesquisadores adsorveram na superfície de eletrodos de platina várias olefinas funcionalizadas, explorando a propensão de grupos alceno quimissorverem sobre este metal. Neste trabalho pioneiro foram feitas observações importantes. Por exemplo, foi verificada a capacidade do ácido 3-alil-salicílico coordenar seletivamente o ferro, em função do potencial aplicado. Este fato foi a primeira indicação da utilidade analítica de eletrodos quimicamente modificados, pois demonstrou a capacidade de um grupo imobilizado complexar um íon metálico, e também a possibilidade de se direcionar a coordenação através da escolha do potencial aplicado.

Em 1975[3] foi publicado um trabalho descrevendo a construção de um eletrodo de grafite com superfície quirál usado para eletro-síntese de álcoois assimétricos a partir da redução de cetonas. A superfície do eletrodo de grafite, que contém grupos carboxílicos, foi modificada através da ligação de aminoácidos opticamente ativos via ligações amida, produzindo uma região interfacial quirál e estável para reações eletroquímicas. Também em 1975 surgiu o agora artigo clássico

de Murray e colaboradores[1] descrevendo a modificação química da superfície de eletrodos de SnO<sub>2</sub> via organossilanos.

A partir destes trabalhos pioneiros, a preparação e utilização de EQMs têm se expandido de forma bastante acentuada, como pode ser inferido pelo expressivo número de artigos publicados sobre este tema nos últimos anos. Além da eletroanálise, que tem se destacado como uma das áreas mais ativas neste campo, os EQMs têm sido utilizados para outros fins que não analíticos, incluindo estudos básicos de eletrocatalise, de cinética de transferência de elétrons, de permeação de membranas, síntese eletroorgânica e fotoeletroquímica.

Segundo a definição de EQM dada pelo *Compêndio de Terminologia Química da IUPAC*[4], EQM é um eletrodo feito de um material condutor ou semicondutor que é recoberto com um filme selecionado monomolecular, multimolecular, iônico ou polimérico de um modificador químico, que por meios de reações faradaicas (transferência de cargas) ou diferenças de potencial interfacial (nenhuma transferência de carga) exibem as propriedades química, eletroquímica e/ou óptica do filme.

### ***1.1. ELETROANÁLISE.***

A grande maioria das aplicações analíticas de EQMs envolve técnicas voltamétricas ou amperométricas. Entretanto também são descritos na literatura alguns casos de aplicação de EQMs como eletrodos íon seletivos.

Do ponto de vista analítico a sensibilidade e/ou seletividade de uma determinação deve aumentar com a utilização de um EQM para que seu uso seja justificado. Isto pode ser obtido por meio de um ou mais dos seguintes fenômenos: pré-concentração, eletrocatalise e exclusão de interferentes. Em geral a obtenção de sensibilidades mais altas ocorre por pré-concentração da espécie de interesse ou por eletrocatalise, sendo que a aplicação de qualquer destes princípios resulta num

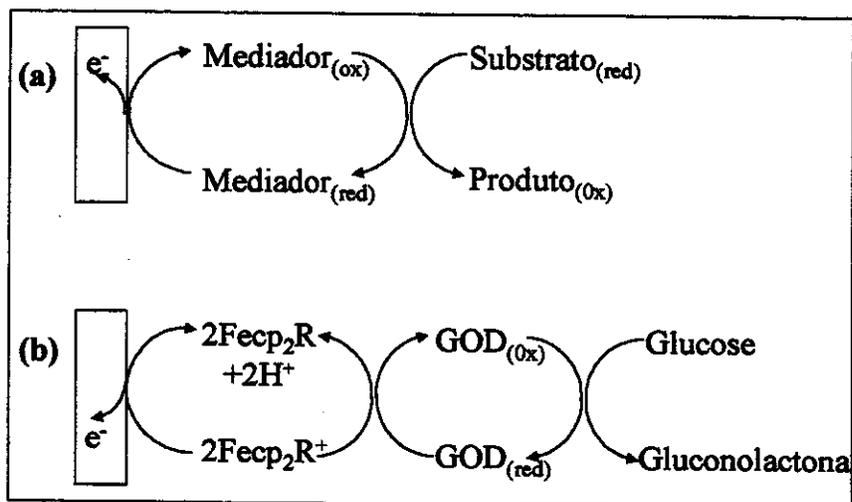
aumento inerente da seletividade. Ganhos adicionais neste item podem ser alcançados pela utilização de recobrimento com membranas poliméricas que bloqueiam o acesso de espécies interferentes à superfície do eletrodo.

### *1.1.1. Eletrocatalise.*

Para compreender os fundamentos da eletrocatalise, é necessário introduzir o conceito de sobrepotencial, uma vez que a eliminação dos efeitos do sobrepotencial é uma meta quase universal no desenvolvimento de sensores eletroquímicos e biossensores. Para um sistema redox perfeitamente reversível,  $E_{1/2} = E^{\circ}$ , qualquer desvio deste comportamento ideal resultará num certo sobrepotencial ( $\eta$ ), onde  $\eta = E_{1/2} - E^{\circ}$ ; existirá portanto, um sobrepotencial ( $\eta_{\text{efetivo}}$ ) para uma dada voltagem, que pode originar de uma combinação de quatro fontes, como o efeito de transporte de massa ( $\eta_{\text{transferência massa}}$ ), sobrepotenciais de reação ( $\eta_{\text{reação}}$ ), efeitos de resistência ( $\eta_{\text{ohmica}}$ ) e sobrepotenciais de ativação ( $\eta_{\text{ativação}}$ ), sendo que a última forma predomina quando eletrólitos práticos e eletrodos de trabalho de baixa resistência são usados.

Como em qualquer processo catalítico o objetivo da eletrocatalise é reduzir a energia de ativação da reação, no caso uma reação envolvendo transferência de elétrons. A oxidação ou redução de um substrato que apresenta uma cinética de transferência de elétrons lenta, à superfície do eletrodo, pode ser mediada por um sistema redox que pode trocar elétrons mais rapidamente com o eletrodo e o substrato conforme esquematizado na Fig. I(a) e (b), reduzindo assim o sobrepotencial de ativação. A Fig. I(a) mostra um esquema do processo de transferência de carga eletrocatalítico para uma molécula solúvel sendo oxidada por um mediador, que é subsequente re-oxidado na superfície do eletrodo. Este mecanismo é resumido como um processo químico-eletroquímico. Alternativamente, o mediador pode ser oxidado eletroquimicamente antes da sua

reação com a substância (exemplo ferroceno[5] Fig I(b)), que é conhecido como um processo eletroquímico-químico.



**Fig. I.** (a) Mecanismo da transferência de elétrons de uma biomolécula reduzida para um mediador oxidado. (b) Diagrama esquemático da oxidação da glucose oxidase (GOD) mediada por ferroceno usado para a determinação de glucose.

Uma característica comum dos processos eletroquímico-químico e químico-eletroquímico é o mecanismo de regeneração catalítico que permite renovar o mediador, proporcionando assim adicionais interações com o substrato.

A redução do sobrepotencial de ativação aumenta a seletividade da medida porque permite aplicação de potenciais de operação mais baixos, e a seletividade é inversamente relacionada à magnitude do potencial aplicado. Isto porque assim fica minimizada, ou mesmo eliminada, a possibilidade de que os potenciais de eletrólise de outras espécies presentes sejam atingidos.

Os mediadores redox podem ser espécies orgânicas (quinonas, tetratiofulvaleno, tetracianoquinodimetano, etc.), compostos organometálicos

(ferrocenos, ftalocianinas, óxidos de rutênio, metaloporfirinas, etc.) ou enzimas (oxidase, deidrogenase, etc.) formando os biossensores. Estas espécies atuam em solução ou no caso de EQMs, imobilizadas à superfície do eletrodo, podendo ser utilizado mais de um mediador. Como exemplo tem-se eletrodos a base de grafite espectroscópico, onde se tem imobilizado, covalentemente, a glucose oxidase para determinação de glucose[6], o eletrodo de carbono impresso sobre PVC modificado pela formação de compósito (tinta de carbono mais azul de Meldola) para determinação de NADH[7], e eletrodo a base de grafite-epóxi modificado pela formação de compósito com tirosinase para a determinação de fenol e catecol[8]. Um biossensor é um tipo de EQM ou eletrodo de íon seletivo no qual um processo de reconhecimento bioquímico é acoplado a um transdutor eletroquímico apropriado. A superfície do eletrodo é modificada pela fixação de um biocomponente (por exemplo enzima, antígeno, anticorpo, planta ou tecido vegetal, etc.) o qual funciona como um elemento de reconhecimento biológico ou receptor bioquímico.

### *1.1.2 Pré-Concentração.*

A sensibilidade das técnicas voltamétricas e amperométricas é diretamente relacionada à razão corrente faradaica ( $i_f$ )/ corrente capacitiva ( $i_c$ ). Os métodos que incluem uma etapa inicial de pré-concentração do analito, possibilitam um aumento na componente faradaica da corrente e portanto, elevam a sensibilidade da técnica voltamétrica utilizada. Em geral a concentração da espécie acumulada é de 10 a 1000 vezes maior na superfície do eletrodo do que originalmente em solução[9].

A forma convencional de pré-concentração, principalmente para íons metálicos, é a eletrodeposição, mas sua aplicação em amostras reais está sujeita a interferentes, que são eletrodepositados juntamente com a espécie alvo, ou ao

potencial de redução do íon de interesse, que prejudica a análise quando for muito negativo.

Em um EQM o fenômeno de pré-concentração envolve uma interação química (complexação, troca iônica, ligação covalente) entre a espécie a ser pré-concentrada e um agente modificador imobilizado à superfície do eletrodo. Este agente modificador, apresenta sob condições específicas, envolvendo ou não a aplicação de potencial, uma afinidade particular pela espécie alvo, o que confere seletividade à medida voltamétrica. Alternativamente a pré-concentração pode ser decorrente de um fenômeno de partição. É o que ocorre com certas espécies orgânicas hidrofóbicas que sofrem um processo de acumulação extrativa em eletrodos de pasta de carbono. Por ser a pasta de carbono uma mistura de carbono em pó com um líquido orgânico aglutinante (Nujol, Silicone, Vaselina, etc.), existe a possibilidade de algum composto orgânico eletroativo ser extraído pela pasta, devido à sua solubilidade na fase orgânica. Ainda uma outra forma de pré-concentração é possível, através da incorporação de uma espécie aniônica em um polímero condutor na forma oxidada carregado positivamente. Este processo, conhecido como dopagem, é induzido eletroquimicamente. Assim, podem-se citar alguns exemplos de EQMs desenvolvidos para aplicação em determinações voltamétricas que envolvem etapa de pré-concentração não eletrolítica, como o eletrodo de pasta de carbono modificado pela formação de compósito com sílica funcionalizada para a determinação de Hg(II) devido a acumulação por complexação[10], eletrodos de pasta de carbono formando compósito com sais inorgânicos ( $\text{PbSO}_4$ ) para a determinação de oxalato onde a acumulação é dada pela troca iônica[11], eletrodo de carbono vítreo recoberto com PVP (poli(4-vinilpiridina) para determinar Au(III) também devido a acumulação por troca iônica[12], eletrodo de platina modificado por adsorção de alilamina para a determinação de ferroceno-carboxaldeído onde a forma de acumulação é por ligação covalente[13], entre outros exemplos de determinação.

### ***1.1.3 Exclusão de Interferentes.***

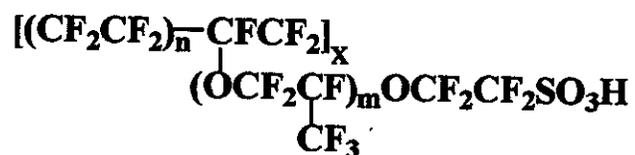
A ação de interferentes, inibindo ou mascarando a resposta eletroquímica da espécie de interesse, pode ser em geral devida a um ou mais dos seguintes fenômenos:

- (a) passivação – adsorção do interferente (espécies tensoativas ou macromoléculas) à superfície do eletrodo, o que impede o acesso da espécie de interesse ou reduz a velocidade de troca de elétrons, por exemplo em fluidos biológicos;
- (b) competição do interferente com a espécie de interesse pelos sítios ligantes existentes na superfície do eletrodo;
- (c) eletrólise do interferente, pré-concentrado à superfície do eletrodo ou em solução, em valor de potencial próximo ao potencial de eletrólise da espécie de interesse.

Uma maneira de promover a exclusão de interferentes, por meios físicos, é recobrir a superfície do eletrodo com uma membrana polimérica, que possa, com base na carga e/ou tamanho, bloquear o acesso do interferente, sendo permeável à espécie de interesse. Assim apenas esta chega até a superfície do eletrodo. Filmes, tais como acetato de celulose ou Nafion<sup>®</sup>, têm sido utilizados para este fim. O Nafion<sup>®</sup> é um ionômero perfluoro-sulfonatado polianiônico, que tem a capacidade de acumular cátions[14-22], e exhibe permeabilidade seletiva pela acumulação de cátions hidrofóbicos grandes preferencialmente do que cátions hidrofílicos pequenos[17].

A permeabilidade seletiva do Nafion<sup>®</sup> também resulta da natureza polianiônica do filme, a qual faz uma barreira para ânions[20] e de sua estrutura microscópica de canais estreitos[23] que evita a penetração de moléculas volumosas tais como proteínas[15, 21].

A estrutura geral do Nafion<sup>®</sup> é [24]:



Devido a estas propriedades, o uso do Nafion<sup>®</sup> tem permitido o desenvolvimento de eletrodos modificados e biossensores que são aplicados na determinação seletiva de analitos especiais como por exemplo óxido nítrico (NO)[25], que é uma importante molécula bioreguladora responsável pelo fator de relaxamento do derivado de endotelium (EDRF). O oxido nítrico pode ser analisado sem interferência do íon  $\text{NO}_2^-$ , devido ao processo de repulsão de carga usando um microsensor, que foi construído com fibra de carbono e modificado com um semicondutor tipo p de porfirina polimérica e Nafion, permitiu eliminar a interferência do íon  $\text{NO}_2^-$ . Similarmente um sensor para glucose[26] para a avaliação *in vitro* e *in vivo* do metabolismo do açúcar em cães, que foi preparado utilizando-se como eletrodo de trabalho platina de 0,5 mm de diâmetro recoberto com membranas de poli(o-fenilendiamina) e Nafion, que permitiu reduzir a interferência de compostos presentes no fluido corporal. Neste caso a enzima glucose-oxidase em uma matriz de albumina e glutaraldeído foi colocada na forma de sanduíche entre as duas membranas. Um outro exemplo consiste na utilização de um eletrodo de carbono vítreo recoberto com Nafion para a determinação amperométrica de neurotransmissores catiônicos[27] sendo que seus potenciais interferentes, o ácido ascórbico e ácido úrico, foram eliminados pela repulsão eletrostática, já que estes encontram-se carregados negativamente em pH fisiológicos.

Já as membranas de acetato de celulose, atuam com base no tamanho das espécies envolvidas e igualmente ao Nafion apresentam permeabilidade seletiva[28-31]. A aplicação de tais membranas deu origem ao princípio do sensor Yellow Springs Instrument, que foi o primeiro biossensor comercial para a medida

de glucose em sangue[28]. A seletividade foi alcançada através de uma membrana ativada de acetato de celulose – glucose oxidase localizada sobre um ânodo de platina sensível a  $H_2O_2$ , sendo que apenas as moléculas pequenas de  $H_2O_2$ , liberadas via a reação específica enzima – substrato, poderiam alcançar a superfície do eletrodo e originar um sinal. Esta configuração é amplamente considerada como um método de referência para a determinação seletiva de glucose.

## ***1.2. PREPARAÇÃO DE EQM.***

A utilização de EQMs é uma área em franco desenvolvimento e a cada dia novos métodos de preparação são descritos. Aqui será feita apenas uma rápida abordagem deste tópico, procurando-se dar uma visão bem geral dos métodos de preparação mais comuns.

### ***1.2.1. Eletrodo Base.***

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

## ***1.2.2. Métodos de Imobilização do Modificador.***

### ***Adsorção***

Adsorção ou mais apropriadamente quimissorção, foi o processo pioneiro e é a maneira mais simples de fixar um modificador ao substrato do eletrodo base. Consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado, e na exposição, em geral por imersão, do eletrodo à esta solução. Pode também envolver a dispersão desta solução, por exemplo com o auxílio de uma micro-pipeta, sobre a superfície a ser modificada, com posterior evaporação do solvente. Embora os primeiros estudos envolvendo adsorção[2](Lane e Hubbard) tenham utilizado eletrodos de platina, a maioria dos trabalhos subsequentes com adsorção foram realizados com eletrodos de grafite e carbono vítreo. Eletrodos de carbono apresentam uma capacidade particular de quimissorver reagentes que possuam sistemas de elétrons  $\pi$  estendidos, como por exemplo compostos orgânicos aromáticos. Esta adsorção é devida à forte interação entre o plano basal do eletrodo de carbono e o sistema de elétrons  $\pi$  da molécula aromática.

Embora simples, esta técnica apresenta a desvantagem de produzir EQMs com no máximo uma monocamada do modificador imobilizado, o que limita a faixa de resposta linear. Além disso, em se tratando de fenômeno de adsorção é um processo de equilíbrio, inevitavelmente ocorrerá dessorção do modificador para o meio durante sua utilização, o que redundará em perda de reprodutibilidade, reduzindo portanto a vida útil do EQM assim preparado.

### ***Formação de compósitos***

O eletrodo de pasta de carbono é um exemplo de um eletrodo compósito, uma mistura de componentes. Os eletrodos de pasta de carbono são preparados por uma mistura de carbono em pó com um aglutinante apropriado tais como parafina

líquida, óleo mineral ou graxa de silicone. A incorporação de um reagente químico à mistura produz um eletrodo de pasta de carbono quimicamente modificado. Uma das vantagens do eletrodo de pasta de carbono é a facilidade de renovação da superfície. Outros tipos de eletrodos compósitos são os de grafite-epóxi, “screen-printed” e pastilhas.

### *Formação de Ligação Covalente*

O modificador pode também ser ligado covalentemente ao substrato do eletrodo. São empregadas por exemplo reações de silanização, envolvendo organossilanos e óxidos presentes à superfície do eletrodo. A maioria dos eletrodos metálicos, quando oxidados em meio ácido, são recobertos com uma camada fina de óxido, bastante reativa em relação a silanos. Portanto, um metal após ser oxidado, pode ser silanizado e posteriormente reagir com outra molécula, contendo o grupo funcional que se queira imobilizar. O silano atuará como um tipo de ponte para fixar um grupo funcional específico à superfície do eletrodo.

Superfícies de carbono, apresentam grupos funcionais oxigenados tais como álcoois (fenóis), ácidos carboxílicos, cetonas (quinonas) e anidridos, resultantes da oxigenação de átomos de carbono do plano vertical, contendo ligações incompletas. Estas funções, cuja concentração pode ser aumentada através de reações de oxidação, são passíveis de derivatização. Portanto a modificação de superfícies de carbono, via ligação covalente do modificador, tem sido em grande parte baseada na manipulação da reatividade destes grupos funcionais, frente a reagentes como aminas, organossilanos, cloreto de tionila e cloreto cianúrico, entre outros. Entretanto, também tem sido explorada a possibilidade de modificar covalentemente superfícies de carbono livres de oxigênio. Nestes casos as reações envolvem os próprios átomos de carbono do plano vertical. Tratamentos como abrasão mecânica ou fratura sob atmosfera inerte, “decapagem” por plasma de argônio ou termólise

sob vácuo, são capazes de gerar superfícies livres de óxidos, com grande reatividade frente a uma ampla variedade de reagentes.

Os eletrodos modificados via ligação covalente são mais estáveis em relação aos obtidos pelos demais métodos, entretanto são mais difíceis de preparar. Da mesma forma que a modificação por adsorção, esta metodologia também gera coberturas com no máximo uma monocamada imobilizada.

### ***Recobrimentos com Membranas poliméricas***

Outra técnica bastante atrativa para a preparação de eletrodos modificados é o recobrimento da superfície do eletrodo com filmes poliméricos, que devem ser condutores ou permeáveis ao eletrólito suporte e à espécie de interesse. Ao contrário da modificação por adsorção ou por formação de ligação covalente, a modificação com membranas poliméricas permite a imobilização de muitas monocamadas (1 a 20000) da espécie ativa na superfície modificada, o que resulta na ampliação da resposta eletroquímica. Dependendo da aplicação pode ser escolhido um polímero eletroativo (se o objetivo é uma eletrocatalise), quimicamente ativo (propriedades ligante ou de troca iônica para pré-concentração), ou inerte (apenas exclusão de interferentes). Os filmes eletroativos se subdividem em duas categorias principais, dependendo de como o centro redox é imobilizado: polímeros redox, se o centro redox é parte do esqueleto polimérico; e polímeros de troca iônica se o componente redox ativo é um contra-íon de um filme poli-iônico como polivinilpiridina ou Nafion<sup>®</sup>.

A cobertura polimérica pode ser obtida a partir de soluções de polímeros pré-formados, ou através de polimerização *in situ* a partir de unidades monoméricas. Neste último caso, o recobrimento polimérico pode ser obtido via eletropolimerização ou por meio de métodos não eletroquímicos como por exemplo: polimerização ativada por plasma, foto-induzida por UV ou polimerização de organossilanos.

Os eletrodos recobertos com membrana polimérica podem ser adicionalmente subdivididos pelo processo usado na aplicação do filme:

(1) *Recobrimento por imersão.* Este procedimento consiste em emergir o material do eletrodo na solução do polímero por um período suficiente para a formação espontânea da membrana para que ocorra adsorção. A quantidade de membrana neste procedimento pode ser aumentada pela retirada do eletrodo da solução e permitindo a secagem do polímero sobre o eletrodo.

(2) *Evaporação do solvente.* Uma gota de uma solução de polímero é aplicada na superfície do eletrodo e o solvente é evaporado. Uma maior vantagem deste passo é que a cobertura do polímero pode ser conhecida a partir da concentração da solução original e do volume gotejado.

(3) *Recobrimento por rotação.* Também chamado de fusão por rotação, uma gota de uma solução diluída de polímero é aplicado na superfície do eletrodo rotatório. O excesso de solução é eliminado da superfície e a membrana polimérica fina que permanece é deixada secar. Camadas múltiplas são aplicadas da mesma forma até que a espessura desejada seja obtida. Este procedimento tipicamente produz membranas finas livres de defeitos.

(4) *Deposição eletroquímica.* Também chamada deposição redox, este procedimento conta com a variação da solubilidade do polímero com estados de oxidação (e iônico), de forma que ocorrerá a formação da membrana, muitas vezes irreversivelmente, quando um polímero é oxidado ou reduzido para seu estado menos solúvel.

(5) *Polimerização eletroquímica.* Uma solução de monômero é oxidada ou reduzida para uma forma ativada que polimeriza para formar uma membrana polimérica diretamente sobre a superfície do eletrodo. Este procedimento resulta em poucos defeitos, já que a polimerização pode ser acentuada em sítios expostos (defeito) na superfície do eletrodo. A menos que a própria membrana polimérica seja redox ativa, ocorrerá passivação do eletrodo e adicional crescimento da membrana é prevenido.

(6) *Polimerização por radiofrequência.* Neste método vapores de monômero são expostos a radiofrequência (RF) de descarga plasmática. As altas energias de descarga de RF podem resultar em perigos químicos, desse modo produzindo funcionalidades e modificações estruturais desconhecidas no polímero.

(7) *Ligações cruzadas* Uma etapa química planejada para acoplar componentes químicos de uma membrana sobre um eletrodo para conferir algumas propriedades desejáveis à membrana tais como aumento de estabilidade, diminuição da permeabilidade, ou alteração das características de transporte de elétrons. As membranas são freqüentemente formadas por copolimerização de monômeros bifuncionais e polifuncionais. As ligações cruzadas podem ser ativadas química, elétrica, fotolítica, radiolítica ou termicamente.

Em todos os casos acima mencionados, a porção redox (mediador de transferência de elétrons ou eletrocatalisador) pode ser ligada ao monômero ou polímero antes da aplicação da membrana no eletrodo, ou a membrana polimérica pode ser derivatizada (funcionalizada) subsequente à aplicação da membrana.

Há vários motivos para recorrer à modificação de polímeros: a imobilização é tecnicamente mais fácil do que trabalhar com monocamadas; as membranas são usualmente mais estáveis; e, por causa das múltiplas camadas de sítios redox, as respostas eletroquímicas são maiores. Entretanto algumas questões permanecem: como ocorrem as reações eletroquímicas de camadas multimoleculares de sítios eletroativos numa matriz polimérica, por exemplo, processos de transporte de massa e transferência de elétrons pelos quais as multicamadas trocam elétrons com o eletrodo e com espécies reativas: moléculas e íons na solução [32, 33]. Muitos destes resultam incertamente de uma falta de conhecimento suficiente sobre a estrutura e propriedades de filmes do polímero e as mudanças morfológicas que eles sofrem quando sujeitos a vários processos químicos, eletroquímicos e físicos durante o uso.

## ***II. O p-NITROFENOL***

O p-nitrofenol (pNF) é um composto especialmente importante, pois trata-se de uma substância extremamente tóxica, exibindo apreciável efeito cumulativo, que bloqueia a fosforilação oxidativa em células[34]. Sendo assim, sua determinação e controle é importante uma vez que os nitrofenóis são constituintes básicos de estimulantes de crescimento de plantas. Também são constituintes de pesticidas como o paration que são empregados em vegetais e apresentam como principais metabólitos o paraoxon e o p-nitrofenol[35]. Exposições prolongadas ao p-nitrofenol devem ser evitadas, pois este atua diretamente no sistema sangüíneo afetando o transporte de oxigênio, provocando febre, fortes dores de cabeça, fadiga, além de acelerar os batimentos cardíacos.

Por outro lado, o p-nitrofenol é gerado no organismo através de uma reação enzimática entre as enzimas fosfatase ácida ou alcalina e o substrato p-nitrofenilfosfato (pNFF)[36, 37]. Neste caso, a determinação de p-nitrofenol permite avaliar a atividade enzimática, o que apresenta utilidade em análises clínicas, em pesquisas bioquímicas e odontológicas.

### ***II.1. Métodos de Determinação.***

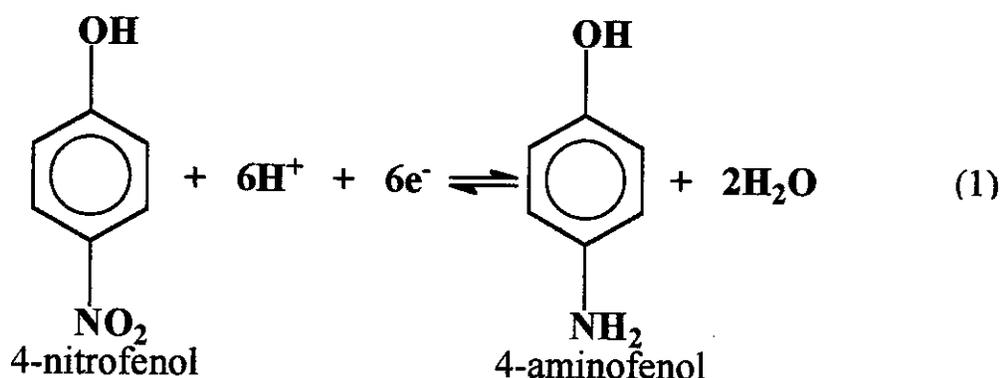
Muitos métodos para a determinação de p-nitrofenol são descritos na literatura[24], tais como os métodos eletroforéticos[37], espectrofotométricos[38], técnicas cromatográficas como cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta e cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-MS) ou detecção por ionização em chama[39-41], cromatografia líquida de alta eficiência[42-45], cromatografia de papel[46], cromatografia em camada delgada[42]. Entretanto, estas técnicas não permitem um monitoramento adequado, pois são caras, necessitam de operadores bem treinados, e em alguns casos, requerem etapas de extração[47],

adsorção ou cromatografia de coluna de troca iônica para sua purificação, aumentando o risco de perda de amostra. Também existem algumas técnicas eletroanalíticas incluindo polarografia, polarografia a.c., voltametria cíclica e voltametria adsortiva por redissolução[48-50].

Existe uma grande tendência em substituir as técnicas polarográficas, nas quais são empregados eletrodos de mercúrio, devido aos danos ambientais que este pode gerar. Nesse sentido os métodos voltamétricos estão sendo empregados com diferentes materiais de eletrodos, que são particularmente adequados para a análises de compostos orgânicos.

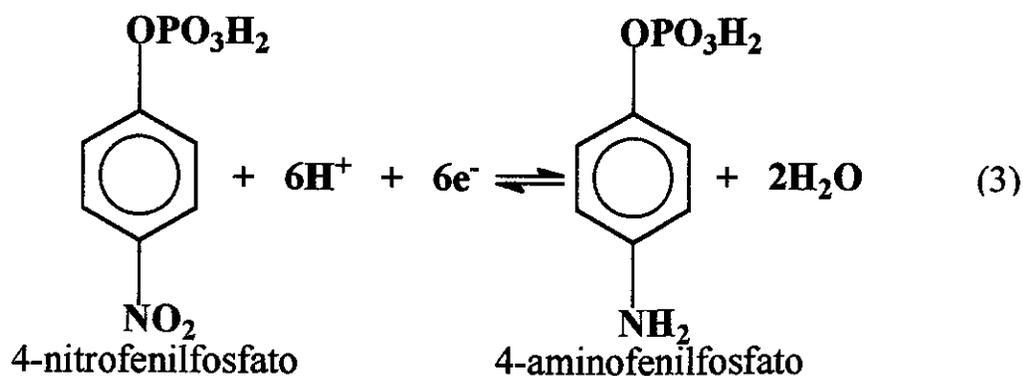
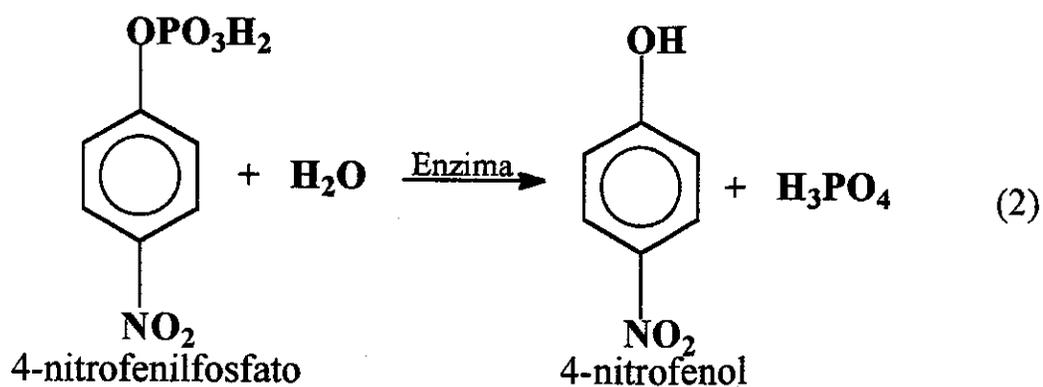
## II.2. Comportamento Eletroquímico do p-nitrofenol.

O comportamento eletroquímico do p-nitrofenol pode ser monitorado através da redução do grupo nitro segundo a equação (1):



Entretanto é esperado que outros nitrofenóis sejam interferentes na resposta eletroquímica do p-nitrofenol na maioria dos materiais de eletrodos. Daí o grande interesse no desenvolvimento de um método para determinação seletiva de

p-nitrofenol, usufruindo das vantagens propiciadas pela modificação de superfícies de eletrodo. Especificamente no caso da determinação de p-nitrofenol, gerado enzimaticamente conforme mostrado na equação (2), o interferente potencial nesta análise é o p-nitrofenilfosfato, devido a similaridade entre as estruturas destes dois compostos, como pode ser observado na equação (3).



### III. FOSFATASES ÁCIDAS.

As fosfatases ácidas ou ortofosfato monoéster fosfohidrolases (E. C.3.1.3.2) pertencem a uma classe de enzimas que catalisam reações de hidrólise de uma grande variedade de ésteres ortofosfato e reações de transfosforilação[51], como esquematizado a seguir:

Hidrólise



Transfosforilação



★ **Aceptor de fosfato**

A fosfatase ácida foi inicialmente observada em eritrócitos por Roche[52] em 1931, sendo capaz de hidrolisar a ligação éster do fosfato do monofenilfosfato e monoalquilfosfato, com pH ótimo entre 5,0 e 6,0, ao contrário da fosfatase de glóbulos brancos que catalisava esta reação com um pH ótimo de 8,8 a 9,0.

A distinção entre as fosfatases ácidas e fosfatases alcalinas, inicialmente era baseada somente no pH ótimo para atividade enzimática. Posteriormente outras características relacionadas com o mecanismo de reação ajudaram a diferenciar estas duas classes de enzima. Neuman[53] em 1968 observou que as fosfatases alcalinas além da hidrólise dos substratos usuais, catalisavam também a hidrólise de monoésteres S-substituídos de ácido fosfotióico  $\text{RSPO}_3\text{Na}_2$  do tipo S-P, produzindo ortofosfato e o tio-álcool correspondente. Já as fosfatases ácidas, por sua vez, catalisam a hidrólise de monoésteres O-substituídos de ácido fosfotióico do tipo

ROPO<sub>2</sub>SKH, produzindo o álcool e o tiofosfato. Estes fatos nos permitem visualizar mecanismos de reações diferentes para as duas enzimas, uma vez que a fosfatase ácida requer para sua atividade um oxigênio entre o radical e o fosfato. Chaimovich e Nome em 1970 observaram a insensibilidade das fosfatases ácidas à presença de cátions mono e bivalentes no meio de reação, ao contrário das fosfatases alcalinas que requerem metais, principalmente o Mg<sup>2+</sup>, para sua atividade[54].

### ***III.1. Distribuição das fosfatases ácidas.***

As fosfatases ácidas encontram-se distribuídas em diferentes partes da natureza. Nos organismos vivos, especificamente nos tecidos animais[36] há pelo menos três tipos de fosfatases ácidas com uma distribuição extremamente variada, podendo ser encontradas em secreções como saliva[55], leite[56], sêmen[57], onde é de grande importância em medicina legal na identificação de manchas suspeitas[58], e em diversos outros órgãos tais como próstata[59], placenta[60], testículo[61], cérebro[62], fígado[63], tireóide[64], coração[65], rim[66], baço[67], glândulas salivares[68], osso[69], dente[70], periodonto[71], gengiva[72], pele, nervos[73], gânglios nervosos[74] e na cauda de girino onde parece estar relacionado com a metamorfose[75]. No sangue esta enzima pode ser detectada tanto nos eritrócitos, leucócitos[52] como no plasma, onde algumas vezes é utilizada como meio de diagnóstico para algumas doenças[37] tais como osteoporoses, hipofosfatasia, hiperparatiroidismo, hipocalcemia, doenças tumorais[76], etc.

Similarmente, esta ampla distribuição também ocorre no reino vegetal onde a fosfatase ácida é detectada em plantas superiores[77] folhas de trigo[78], tabaco[79], milho[80], tubérculo de batata doce[81], no látex de *Hevea brasiliensis* (seringueira)[82], na membrana tilacóide de *Sorghum vulgare* (sorgo)[83], em escutela de semente de milho em fase de germinação[84], no pólen de *Brassica campestris* (mostarda) e *Lilium regale* (lírio)[85], na cama aleurônica de grãos de

arroz[86] e de cevada[87], em sementes de amendoim[88], de girassol[89], de algodão[90], de soja[91], coleóptiles da cevada[92], e em culturas de endosperma de milho[93]. A importância do estudo das fosfatases ácidas em plantas decorre principalmente da sua possível participação no metabolismo do fósforo, o qual é importante para o crescimento normal e para o desenvolvimento dos órgãos das plantas[88].

### ***III.2. Importância da determinação das Fosfatases Ácidas em diagnósticos clínicos.***

Devido à ampla distribuição e a facilidade em demonstrar a atividade das fosfatases ácidas, estas apresentam grande importância em diagnósticos clínicos, apesar do pouco que se conhece a respeito das suas funções fisiológicas. Diversos autores têm tentado estabelecer relações entre determinados estados patológicos e o nível de atividade da fosfatase ácida nas células[94].

A fosfatase ácida costuma se apresentar com a atividade aumentada, em fenômenos bem diferentes, tais como:

- a) na saliva de pessoas com câncer de boca[95];
- b) na gengiva de pacientes com periodontopatias[71];
- c) no soro de pacientes com desordens renais tais como: nefrite aguda, síndrome nefrótica, cálculo renal e hidronefrose[96];
- d) no soro de ratos nos primeiros estágios de artrite provocada[97];
- e) no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide[98];
- f) nos leucócitos durante os primeiros estágios de hepatite infecciosa[99];
- g) nos leucócitos de mulher durante a ovulação[99];
- h) no testículo de cobaias com hiper-vitaminose C[100];
- i) nas folhas de aveia após o corte ou injúria[101];

- 
- j) no soro de pacientes com carcinoma de próstata[102];
  - k) no fígado de rato com leucemia transplantada[103];
  - l) no fígado de rato castrado e tratado com estradiol[104];
  - m) no fígado de pacientes com muco polissacaridose[105];
  - n) em calo ósseo de ratos após a consolidação da fratura[69];
  - o) no plasma de pacientes com a doença de Leroy[105];
  - p) no plasma de patos após tratamento com tetracloreto de carbono[106];
  - q) no soro de ratos em jejum de 72 horas[107];
  - r) no fígado e epidídimo de ratos diabéticos[107];
  - s) no testículo de ratos tratados com etionina[108];
  - t) nos nervos de pacientes com lepra[73].

#### ***IV. OBJETIVOS.***

Tomando-se conhecimento do interesse por parte de pesquisadores da área bioquímica, médica e clínica em avaliar a atividade enzimática da enzima fosfatase, uma nova metodologia que fosse simples, rápida e confiável para determinar a atividade desta enzima contribuiria para obterem maiores informações sobre a real função fisiológica desta enzima. A reação enzimática entre a fosfatase ácida e o substrato p-nitrofenilfosfato (pNFF) gera p-nitrofenol (pNF) e ácido fosfórico. Os métodos de monitoramento de pNF descritos na literatura são baseados em técnicas cromatográficas que requerem etapas prévias de separação e purificação, ou métodos espectrofotométricos que necessitam paralisar a reação pela adição de hidróxido de sódio formando então o p-nitrofenolato de sódio, que é monitorado em 405 nm. Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia utilizando eletrodo de carbono vítreo para monitorar pNF e determinar a atividade da fosfatase ácida, sem que a reação enzimática seja paralisada. Como o pNFF, substrato da enzima, e o pNF são eletroativos e apresentam estruturas semelhantes, poderia ser empregada as vantagens da modificação de eletrodo para eliminação de interferentes. Nesse sentido a metodologia proposta consiste em recobrir o eletrodo de carbono vítreo com membrana de Nafion buscando eliminar a interferência do pNFF na resposta do pNF.

## ***V. PARTE EXPERIMENTAL.***

### ***V.1. Reagentes e Soluções.***

O p-nitrofenol foi adquirido da Merck, p-nitrofenilfosfato foi doado pelo professor Hiroshi Aoyama do Instituto de Biologia da UNICAMP para estudo deste composto como interferente, fosfato de sódio foi adquirido da Labsynth e ferricianeto de potássio da Ecibra. Todos os outros reagentes empregados foram de grau analítico e recém preparados em água deionizada em sistema milli-Q antes de sua utilização. Utilizou-se também suspensão de alumina com granulometria de 0,1  $\mu\text{m}$  para limpeza do eletrodo de carbono vítreo (polimento manual) e etanol.

Para a eliminação do interferente empregou-se solução de Nafion 5% (m/v) obtida da Aldrich e a eliminação de oxigênio ( $\text{O}_2$ ) dissolvido foi feita pelo borbulhamento de Argônio (Ar) nas soluções por 15 minutos antes das medidas.

A enzima fosfatase ácida da mamona também foi doada pelo professor Hiroshi Aoyama do Instituto de Biologia.

### ***V.2. Aparelhagem.***

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato PGSTAT20 da Autolab ECO CHEMIE, acoplado a um microcomputador com software GPES 4.5 para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados, usando-se célula de três eletrodos (Fig. V.1), com 5 mL de capacidade, sendo o eletrodo de referência o eletrodo de calomelano saturado (SCE) com  $\text{KCl } 4 \text{ mol L}^{-1}$ , o eletrodo auxiliar uma espiral de platina e o de trabalho o eletrodo de carbono vítreo (Metrohm<sup>®</sup>) com diâmetro de 3 mm e área de 0,071  $\text{cm}^2$ . Empregou-se um pH/Analisador de íons Corning modelo 350 ( $\pm 0,1 \text{ mV}$ ) com eletrodo combinado de vidro Corning para medidas de pH.

Para o estudo do comportamento cinético empregou-se a técnica de voltametria de varredura linear, utilizando-se um eletrodo de disco rotatório de carbono vítreo de 5 mm de diâmetro e área de  $0,196 \text{ cm}^2$ , sem e com a membrana de Nafion. O eletrodo de disco rotatório foi acoplado a um sistema de rotação e controlador de velocidade MSR-X da PINE Instrument Company

Um frasco lavador contendo amálgama de Zn(Hg) em solução ácida ( $\text{HCl } 2 \text{ mol L}^{-1}$ ) com  $\text{Cr}^{2+}$  foi utilizado para remoção de  $\text{O}_2$  eventualmente presente no cilindro contendo argônio.

Aparelho de ultra-som (Thornton) modelo T14 foi empregado para auxiliar na remoção de partículas de alumina da superfície do eletrodo de trabalho.

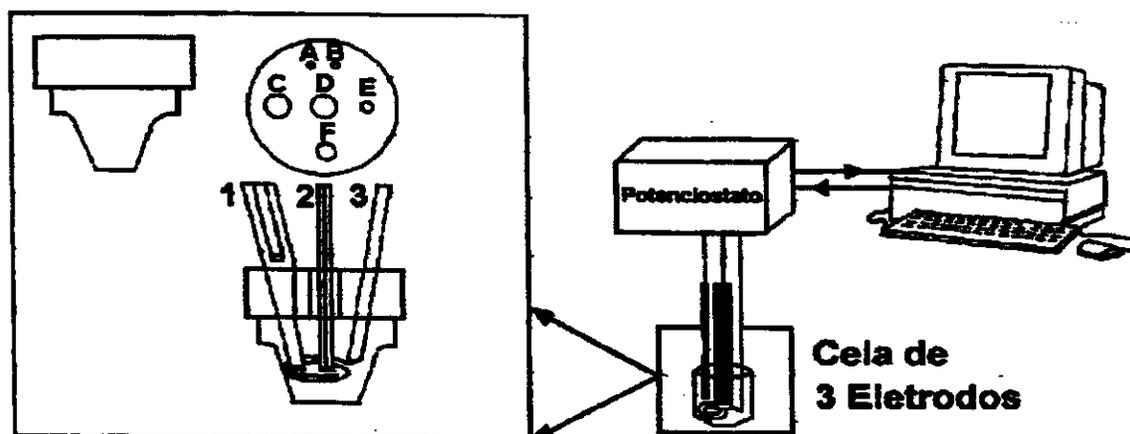


Fig. V.1. Célula de três eletrodos utilizada nas medidas eletroquímicas. A = entrada de Ar, B = saída de Ar, C = eletrodo de referência – SCE (1), D = eletrodo indicador – carbono vítreo (2), E = eletrodo auxiliar – espiral de Pt (3), F = orifício para adição de soluções com micropipeta.

### ***V.3. Limpeza do Eletrodo de Trabalho.***

A limpeza da superfície do eletrodo de carbono vítreo foi feita por polimento manual (movimentos circulares) com flanela suportada em uma placa de vidro, embebida em suspensão de alumina (0,1  $\mu\text{m}$ ). Após a lavagem com água destilada, o eletrodo foi ultrasonificado por 30 segundos em água deionizada, seguido de outros 30 segundos em etanol para eliminar eventuais partículas na superfície[109]. O procedimento adotado previne a formação de planos na superfície do eletrodo, o que poderia danificá-lo. Para verificar a limpeza do eletrodo, realizou-se uma varredura cíclica em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> a pH 5, seguida de uma varredura cíclica em solução de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> a uma concentração de 2,0 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, na faixa de potencial de -0,3 a 0,6 V vs. SCE, com velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup>.

### ***V.4. Comportamento Eletroquímico do p-nitrofenol.***

A redução do composto p-nitrofenol foi monitorada com o eletrodo de carbono vítreo por voltametria de pulso diferencial em potenciais positivos maiores a 0,2 V, na faixa de 0,2 a -0,9 V e potenciais mais negativos de -0,9 V vs. SCE em 5 mL de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7, com uma concentração fixa de 5,0 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de pNF, utilizando-se diferentes velocidades de varredura: 5, 10, 20 e 50 mV s<sup>-1</sup> e amplitude de pulso de 25 mV.

### ***V.5. Estudo do Efeito do pH.***

No estudo do efeito de pH na resposta do eletrodo preparam-se soluções de fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,1 mol L<sup>-1</sup> com o pH variando de 4 a 8, ajustado com HCl e NaOH respectivamente, utilizando-se um potenciômetro

Corning 350. As medidas foram realizadas à velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  e amplitude de pulso de  $25 \text{ mV}$  para as concentrações de p-nitrofenol de  $7,0 \cdot 10^{-5}$  e  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

#### *V.6. Obtenção da Curva Analítica.*

Para obter a faixa linear de resposta foram adicionados alíquotas de  $20 \mu\text{L}$  de pNF  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  na célula contendo  $5 \text{ mL}$  de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5, variando assim a concentração desde  $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  a  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Após cada adição de analito a solução foi agitada por 30 segundos e a resposta eletroquímica foi registrada numa faixa de potencial de  $-0,5 \text{ V}$  a  $-0,9 \text{ V}$  vs. SCE, com velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  e amplitude de pulso de  $25 \text{ mV}$ .

#### *V.7 Estudo da Interferência do pNFF.*

Para verificar a resposta do eletrodo frente ao pNFF, que é o principal interferente na determinação de pNF na análise da atividade da fosfatase ácida, foram realizados ensaios de voltametria de pulso diferencial na faixa de  $-0,5$  a  $-0,9 \text{ V}$ , adicionando-se alíquotas de  $20 \mu\text{L}$  de pNFF  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  na célula contendo somente  $5 \text{ mL}$  de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5, obtendo-se concentrações na faixa de  $1,0 \cdot 10^{-5}$  a  $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Igualmente para verificar a interferência de pNFF na resposta do pNF, foi fixado a concentração de pNF em  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e variado a concentração de pNFF de  $1,0 \cdot 10^{-5}$  a  $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

### V.8. Preparação do Eletrodo de Carbono Vítreo com Membrana de Nafion.

Com o objetivo de eliminar o interferente pNFF na análise de pNF o eletrodo de carbono vítreo foi recoberto com uma membrana de Nafion conforme esquema representado na Fig. V.2. Sobre o eletrodo de carbono vítreo previamente tratado para ativação e limpeza de sua superfície como é explicado em (V.3), foi disperso diferentes volumes de solução de Nafion (10, 15, 20, 25 e 30  $\mu\text{L}$ ) em diversas concentrações (2%, 4%, 4,5% e 5% m/v) e deixou-se secar por 30 minutos a temperatura ambiente.

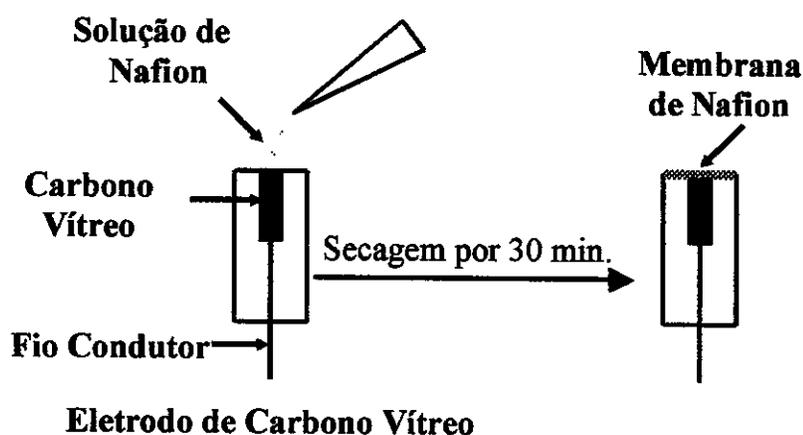


Fig. V.2. Preparação do eletrodo de carbono vítreo com a membrana de Nafion.

Com o eletrodo assim modificado foram realizados experimentos de voltametria de pulso diferencial para comprovar a possibilidade de eliminar a interferência do pNFF na resposta de pNF. Uma nova curva analítica foi obtida para avaliar possíveis mudanças na sensibilidade e no limite de detecção do eletrodo.

### ***V.9. Estudo Cinético.***

Foi realizado um estudo cinético para verificar o comportamento da constante de transferência de elétrons com o eletrodo sem e com membrana de Nafion, com a finalidade de verificar as etapas envolvidas no processo do eletrodo e os seus efeitos nos parâmetros analíticos na determinação de pNF. Numa célula contendo 10 mL de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5, foram adicionados volumes de 30, 50, 60, 70, 80 e 90  $\mu\text{L}$  de pNF  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  para obterem concentrações de 3, 5, 6, 7, 8 e  $9 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , e foram feitas varreduras numa faixa de potencial de -0,5 a -0,9 V com uma velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , sendo que para cada concentração de pNF, variou-se a velocidade de rotação do eletrodo desde 0 a 900 rpm.

### ***V.10. Aplicação do Eletrodo na Determinação da Atividade da Fosfatase ácida da semente da mamona.***

Para determinar a atividade da fosfatase ácida da mamona foi empregado tampão acetato de sódio, visto que a enzima apresenta maior atividade neste meio. Além disso, devido a quantidade de enzima disponível ser muito pequena ( $1 \mu\text{g}$ ), foi necessário modificar o tamanho da célula, para um volume final de 2 mL, bem como adaptar um eletrodo de Ag/AgCl como referência, o qual foi preparado no laboratório. Este eletrodo consiste de um fio de prata, no qual foi depositado uma camada de AgCl por eletrólise em solução de KCl saturado, aplicando-se um potencial de 200 mV durante 15 minutos.

Para verificar o comportamento de pNF em tampão acetato foi realizado um estudo em diferentes valores de pH desde 4 a 6, que são os valores próximos do pH ótimo da enzima fosfatase que é 5. No pH escolhido para a análise foi obtida uma curva analítica para o pNF.

### *V.10.1. Efeito do tempo de incubação*

O efeito do tempo de incubação na atividade da enzima foi estudado usando pNFF como substrato. A enzima ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi diluída 1:100 em tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5, minutos antes do ensaio. No meio de reação contendo  $100 \mu\text{L}$  de pNFF ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ),  $200 \mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,  $1600 \mu\text{L}$  de água deionizada, foram adicionados  $100 \mu\text{L}$  da enzima diluída ( $1 \mu\text{g}$ ) totalizando um volume final de  $2 \text{ mL}$  na célula.

A reação foi iniciada pela adição da enzima e o pNF formado como mostrado na equação (2), foi determinado por voltametria de pulso diferencial, após intervalos de 2 minutos de incubação, sem paralisar a reação durante um tempo de 60 minutos.

### *V.10.2. Determinação de $K_m$ , $V_{m\acute{a}x}$ e Atividade Enzimática.*

A determinação da atividade da enzima ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi realizada conforme descrito no item *V.10.1*, variando a concentração de pNFF de  $0,05$  a  $3,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e mantendo a quantidade de enzima em  $0,25 \mu\text{g}$ , sendo esta menor que a empregada no estudo de incubação, que mostrou que esta quantidade de enzima é suficiente para gerar o pNF a ser monitorado com boa sensibilidade. O pNF formado foi determinado após 10 minutos de incubação, sem paralisar a reação.

Uma unidade enzimática (UE) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir  $1 \text{ micromol}$  de pNF por minuto. A atividade enzimática (AE) é definida como UE por mg de proteína.

Os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram obtidos a partir de um gráfico duplo-recíproco da corrente versus a concentração de substrato conhecido como o gráfico de *Lineweaver – Burk*, Fig. V.3, que é dada pela equação (4):

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\text{máx}}} + \left(\frac{K_m}{V_{\text{máx}}}\right) \frac{1}{[S]_0} \quad (4)$$

onde  $V_0$  é a velocidade inicial,  $V_{\text{máx}}$  é a velocidade máxima,  $[S]_0$  concentração inicial de substrato e  $K_m$  é a constante de Michaelis.

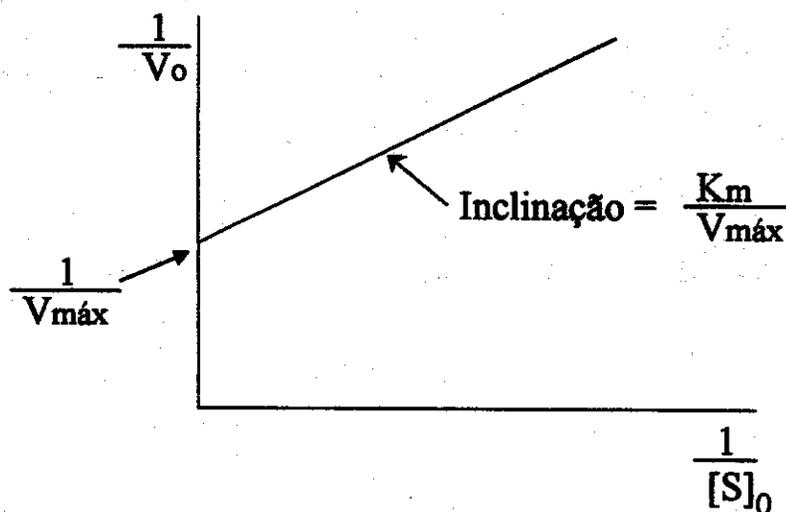
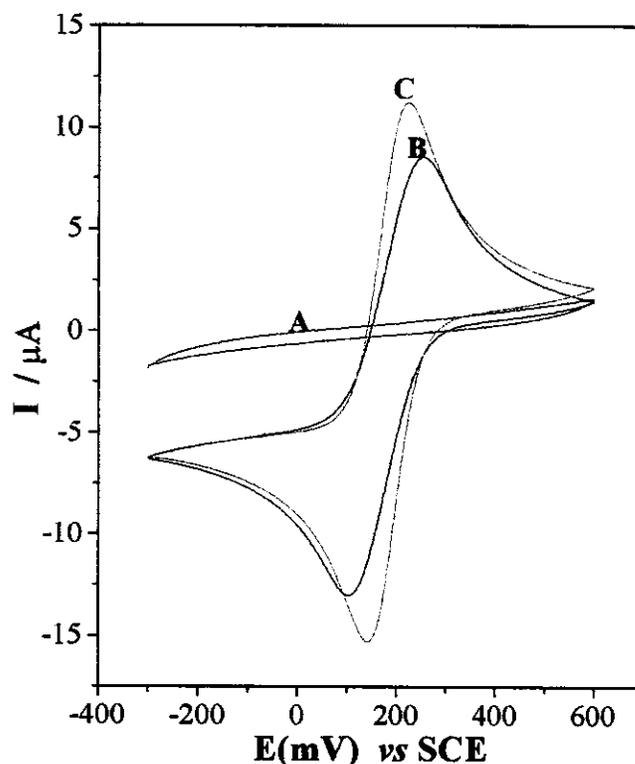


Fig. V.4. Gráfico de Lineweaver Burk para a determinação de  $K_m$  e  $V_{\text{máx}}$ .

## ***VI. RESULTADOS E DISCUSSÕES.***

### ***VI.1. Limpeza do Eletrodo de Trabalho.***

As varreduras cíclicas do tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  a pH 5 seguida da varredura cíclica da solução de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$   $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  realizadas para verificar a limpeza do eletrodo encontram-se na Fig. VI.1. Como pode-se observar as correntes de pico para o ferricianeto de potássio são maiores e mais reversíveis quando a superfície do eletrodo encontra-se limpa (voltamograma C) com uma diferença de potencial de pico catódico e anódico de 78,50 mV, e quando esta não se encontra limpa (voltamograma B), as corrente de pico são menores, apresentando uma diferença de potencial de pico de 152,50 mV. Isto também é importante porque melhora a sensibilidade do eletrodo.

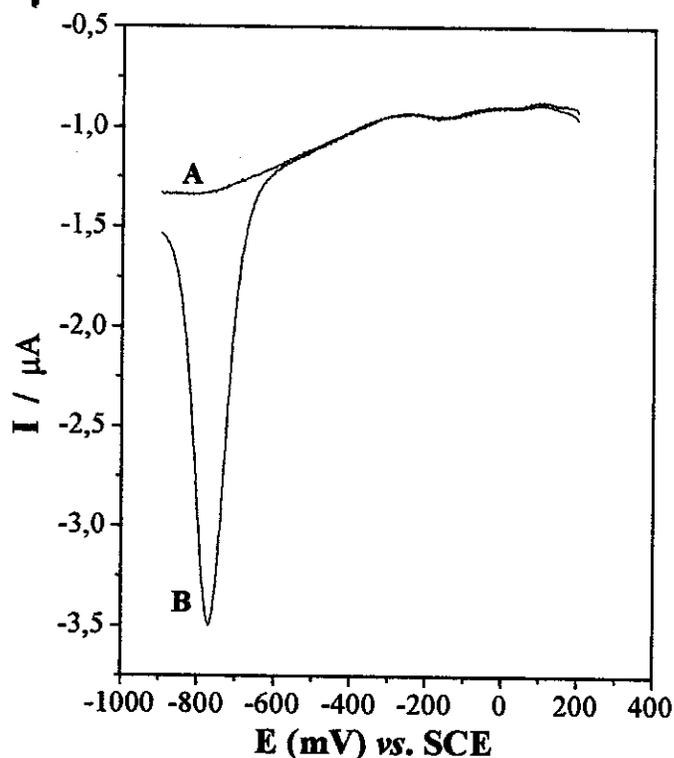


**Fig. VI.1.** Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de carbono vítreo em (A) solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5, (B) solução contendo  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$   $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e (C) solução de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  após a limpeza do eletrodo.  $V = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .

### *VI.2. Comportamento Eletroquímico do p-nitrofenol.*

Na redução do composto pNF monitorado com o eletrodo de carbono vítreo por voltametria de pulso diferencial, foi observado que em potenciais positivos maiores a  $0,2 \text{ V}$  ocorre oxidação do grupo hidroxila, cuja corrente de oxidação são menores que corrente de redução do grupo nitro. Na faixa de potencial negativo maiores que  $-0,9 \text{ V}$  ocorre descarga devido a oxidação de hidrogênio. A Fig. VI.2 mostra que o potencial de pico de redução do grupo nitro na faixa de  $0,2$  a  $-0,9 \text{ V vs. SCE}$  se dá em  $-0,770 \text{ V}$ , este valor é maior que o do eletrodo de mercúrio[35] que é de  $-0,68 \text{ V vs. SCE}$ .

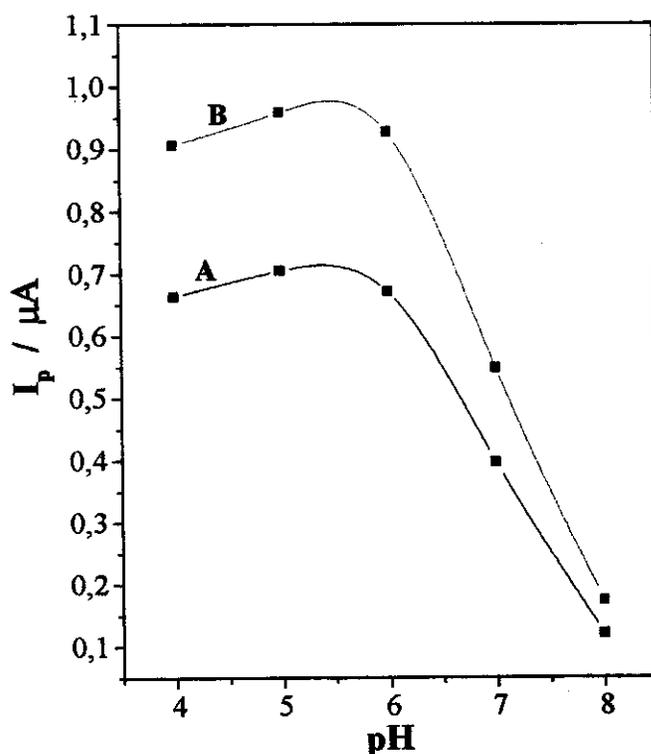
A velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  e amplitude de pulso de  $25 \text{ mV}$  foram escolhidas como as condições ótimas de trabalho, já que a velocidade de  $5 \text{ mV s}^{-1}$  mostrou uma menor resposta e as velocidades de  $20$  e  $50 \text{ mV s}^{-1}$  mostraram um aumento no ruído e distorção da sinal.



**Fig. VI.2.** Voltamogramas de pulso diferencial para o eletrodo de carbono vítreo (sem modificação) obtidos em (A) tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7; (B) em (A) +  $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  pNF, velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  e amplitude de pulso de  $25 \text{ mV}$ .

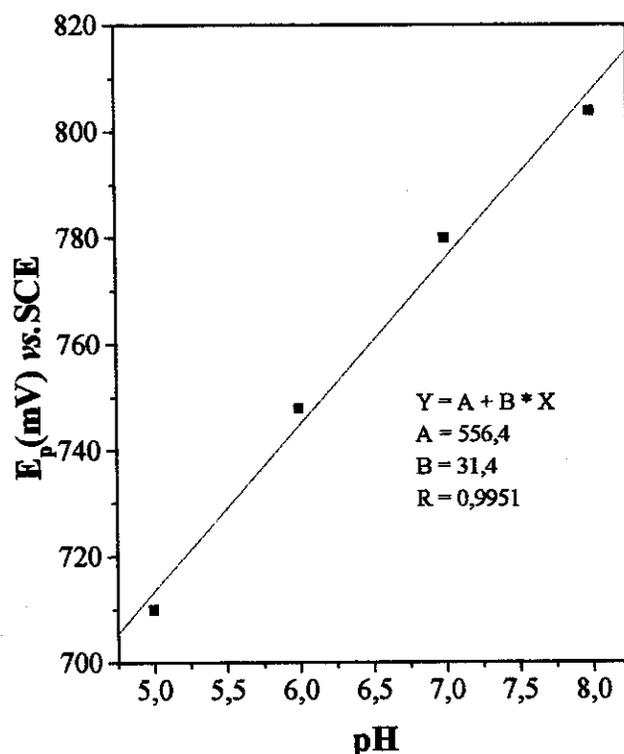
### VI. 3. Estudo do efeito do pH.

A influência do pH da solução tampão fosfato na resposta eletroquímica do pNF é apresentada na Fig. VI.3. Pode-se observar que para valores de pH maiores que 6 a resposta eletroquímica diminui, por causa da deficiência de prótons para formar a espécie pré protonada a ser reduzida. Na faixa de pH entre 4 e 6 obtiveram-se as maiores respostas com uma pequena variação na intensidade de corrente.



**Fig. VI.3.** Influência do pH sobre a intensidade de corrente de pico da redução de pNF em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . (A)  $7,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , (B)  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .  $V = 10 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude de pulso de  $25 \text{ mV}$  sobre eletrodo de carbono vítreo.

Esse comportamento é similar ao observado na literatura com o eletrodo de mercúrio [34], segundo a qual em soluções de pH menor que 6 predominam as espécies protonadas (ocorrendo primeiro uma protonação de 4 prótons na etapa determinante, a qual foi obtida mediante a equação  $\Delta E / \Delta \text{pH} = 0,059 P / n$ , onde o valor da inclinação do gráfico  $E_p$  vs. pH é de 31,4, e sendo o valor de n o numero de elétrons aparente de 8), dando um aumento do  $E_p$  em relação ao pH, devido a redução do grupo nitro na forma não protonada a pH maiores que 6, como se mostra na Fig. VI.4.

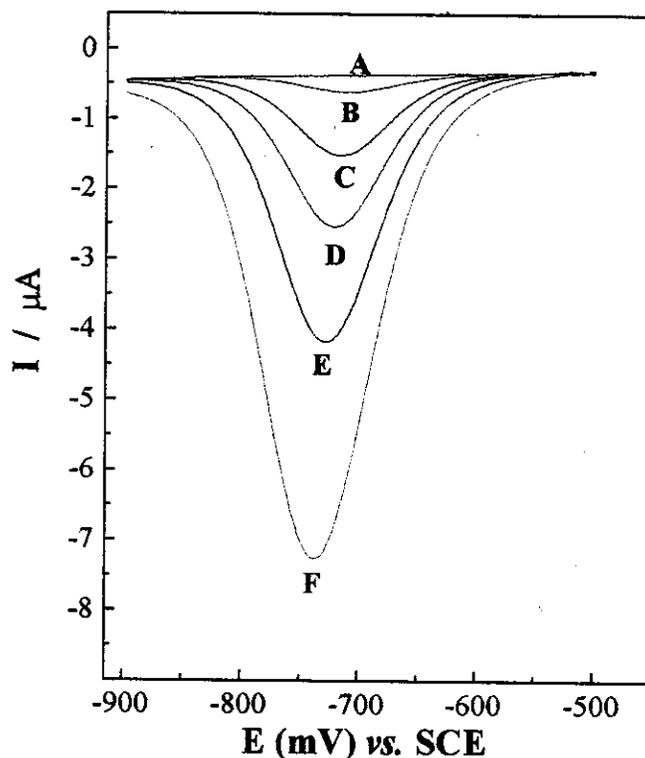


**Fig. VI.4.** Influência da variação de pH sobre os valores de potencial de pico ( $E_p$ ) de  $7,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de pNF em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com o eletrodo de carbono vítreo.

Em virtude da resposta eletroquímica ser constante e apresentar valores maiores no intervalo de  $4 < \text{pH} < 6$ , escolheu-se pH 5 para estudos posteriores.

#### *VI. 4. Obtenção da Curva Analítica.*

Para obtenção da curva analítica para o pNF, foram registrados voltamogramas de pulso diferencial com o eletrodo de carbono vítreo, em soluções tampão fosfato e após adições sucessivas de pNF variando-se a sua concentração entre  $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  a  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , na faixa de potencial de -0,5 a -0,9 V vs. SCE., observando-se um aumento na corrente catódica do sistema a medida que a concentração de pNF é aumentada como mostrado na Fig. VI.5.



**Fig. VI.5.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para redução de pNF em A = tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5; B = A +  $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  pNF; C = A +  $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  pNF; D = A +  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  pNF; E = A +  $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  pNF; F = A +  $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  pNF sobre eletrodo de carbono vítreo.

Construindo-se uma curva de corrente de pico em função da concentração de pNF, Fig. VI.6 (a), observa-se que para concentrações maiores que  $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  ocorre saturação do eletrodo como é verificado pelo desvio na linearidade da resposta.

A Fig. VI.6 (b) mostra a faixa linear de resposta que foi de  $2,0 \cdot 10^{-5}$  a  $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , com uma boa correlação linear ( $r = 0,998$ ) ajustada pela equação (5):

$$I_p = 0,22 (\pm 0,04) + 0,0185 (\pm 0,0003) [\text{pNF}] \quad (5)$$

onde  $I_p$  = corrente de pico ( $\mu\text{A}$ ) e  $[\text{pNF}]$  = concentração de p-nitrofenol ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

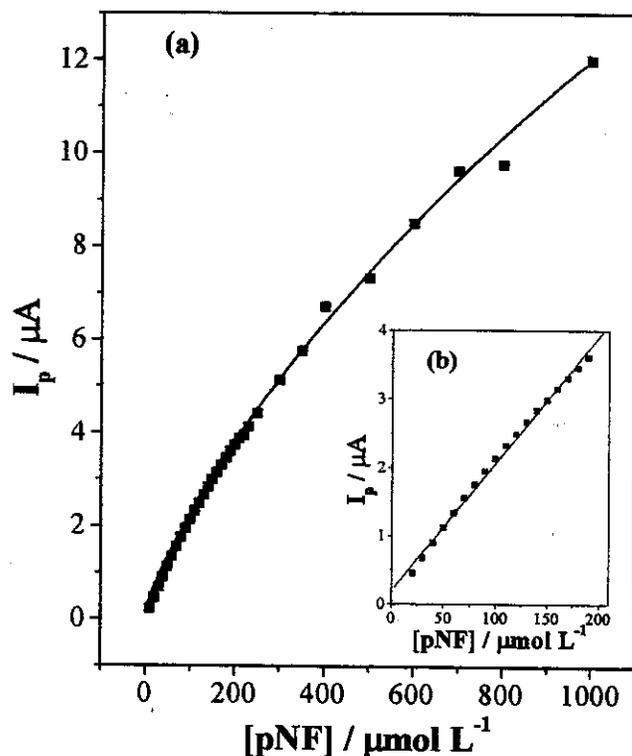


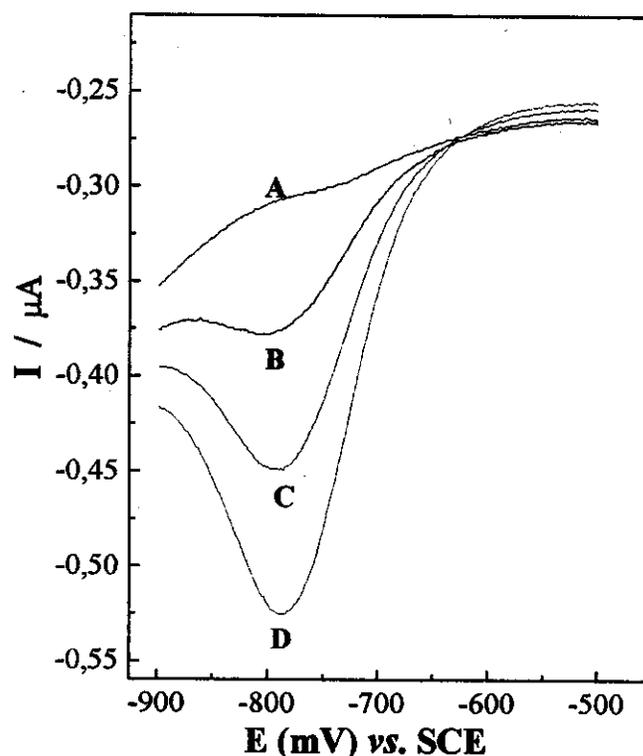
Fig. VI.6. (a) Curva de corrente de pico em função da concentração de pNF com eletrodo de carbono vítreo. (b) Curva analítica para determinação de pNF.

O limite de detecção foi de  $14,86 \mu mol L^{-1}$ , o qual foi determinado como três vezes o valor da estimativa do desvio padrão da corrente obtidas na equação (5).

#### VI.5. Estudo da Interferência do pNFF.

Como o objetivo final do trabalho era determinar a atividade da fosfatase monitorando o pNF gerado enzimaticamente na presença do pNFF, que é o substrato da enzima, fez-se necessário avaliar o comportamento eletroquímico deste frente a superfície do eletrodo de carbono vítreo, em virtude da semelhança das estruturas e do fato do pNFF ser um interferente potencial na resposta do pNF.

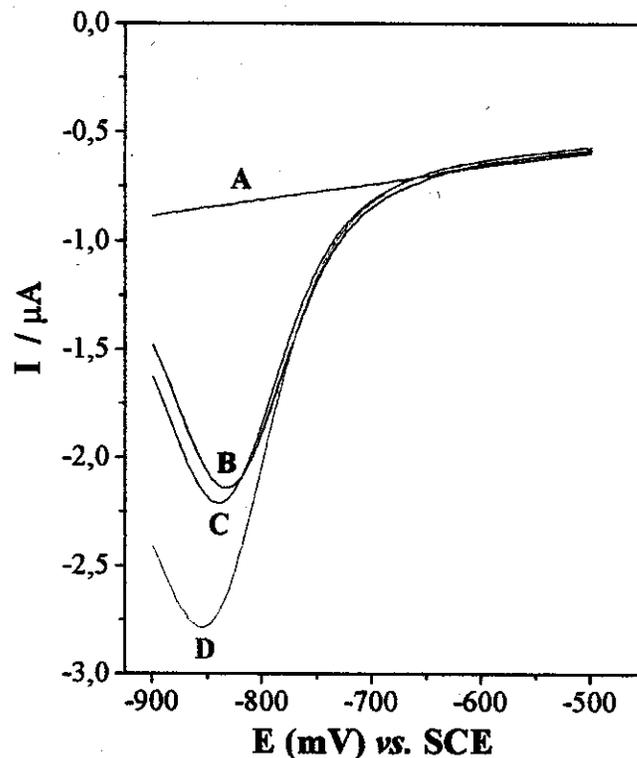
Foram realizados ensaios de voltametria de pulso diferencial na faixa de -0,5 a -0,9 V, para concentrações de  $1,0 \cdot 10^{-5}$  a  $3,0 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de pNFF em tampão fosfato, pH 5, Fig. VI.7. Analisando esta figura observa-se que o potencial de pico de redução do grupo nitro foi de -0,780 V vs. SCE, sendo este muito próximo ao do pNF, que apresenta potencial de pico de -0,770 V vs. SCE, aumentando a corrente em função do aumento de sua concentração.



**Fig. VI.7.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para redução de pNFF em A = Tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5; B = A +  $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  pNFF; C = A +  $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  pNFF; D = A +  $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  pNFF sobre eletrodo de carbono vítreo.

A Fig. VI.8 mostra a influência de adições sucessivas do pNFF na resposta eletroquímica do pNF em solução tampão contendo uma concentração fixa deste.

último de  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Observou-se um aumento da corrente do pico a medida que foram adicionadas maiores quantidades de pNFF, mostrando que o pNFF interfere significativamente na determinação do pNF com o eletrodo de carbono vítreo, principalmente quando a sua concentração excede a de pNF.



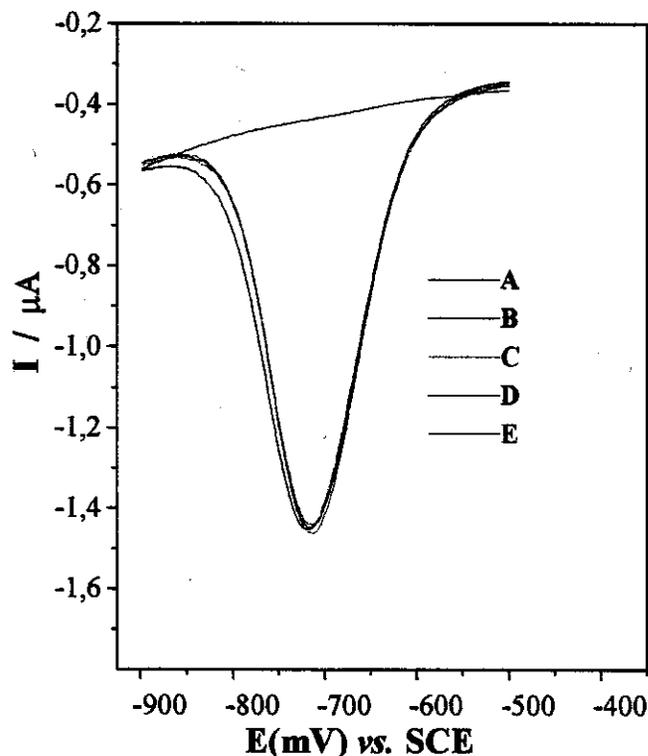
**Fig. VI.8.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para redução de pNF na presença de pNFF em A = Tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5; B = A +  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  pNF; C = B +  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  pNFF; D = B +  $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  pNFF, sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo.

Para solucionar o problema deste interferente, procedeu-se a utilização da membrana de Nafion.

### ***VI.6 Preparação do Eletrodo de Carbono Vítreo com Membrana de Nafion.***

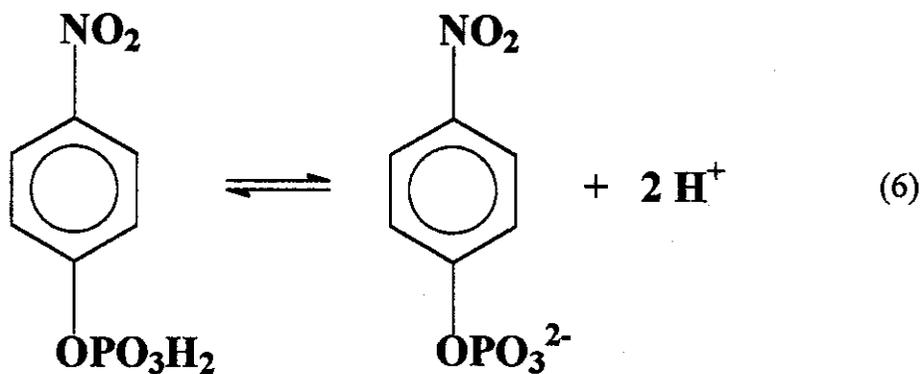
Para a preparação do eletrodo de carbono vítreo recoberto com Nafion procedeu-se um estudo utilizando diferentes volumes (10, 15, 20, 25 e 30  $\mu\text{L}$ ) e concentrações da solução de Nafion (2%, 4%, 4,5% e 5% (m/v)).

Os volumes de 10, 15 e 20  $\mu\text{L}$  em concentrações de 2%, 4% e 4,5% (m/v) respectivamente da solução de Nafion mostraram não eliminar completamente o interferente na faixa de  $1,0 \cdot 10^{-5}$  a  $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  pNFF o que foi observado durante o experimento. Volumes de 25 e 30  $\mu\text{L}$  da solução de Nafion e 5% (m/v) permitiram eliminar a interferência do pNFF, sendo assim, neste caso as adições sucessivas de solução de pNFF numa faixa de  $1,0 \cdot 10^{-5}$  a  $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  não altera a resposta do pNF presente numa concentração fixa de  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Deste modo foi escolhido um volume de 25  $\mu\text{L}$  e 5% (m/v) como as melhores condições na eliminação do interferente como pode-se observar nos voltamogramas apresentados na Fig. VI.9.



**Fig. VI.9.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em. A = Tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 5; B = A + 1,0 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> pNFF; C = B + 1,0 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> pNFF; D = C + 5,0 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> pNFF; E = D + 1,0 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> pNFF, sobre o eletrodo de carbono vítreo recoberto com 25 μL da solução de Nafion ao 5% (m/v).

Os ésteres de fosfato apresentam dois valores de pK<sub>a</sub> (cerca de 2 e 6)[21], assim eles em pH 5 encontram-se na forma dissociada, apresentando-se carregado negativamente como mostra a equação (6). Deste modo o mecanismo provável da eliminação do interferente é devido à repulsão eletrostática entre os grupos sulfônicos do Nafion carregado negativamente na superfície do eletrodo e o grupo fosfato do pNFF também carregado negativamente, ou pela possibilidade de eliminação devido ao tamanho da molécula do pNFF ser maior que os canais estreitos da membrana de Nafion.



A Fig. VI.10 representa o esquema da repulsão eletrostática na superfície do eletrodo com a membrana de Nafion, o qual possibilitou eliminar a interferência do pNFF na resposta do pNF.

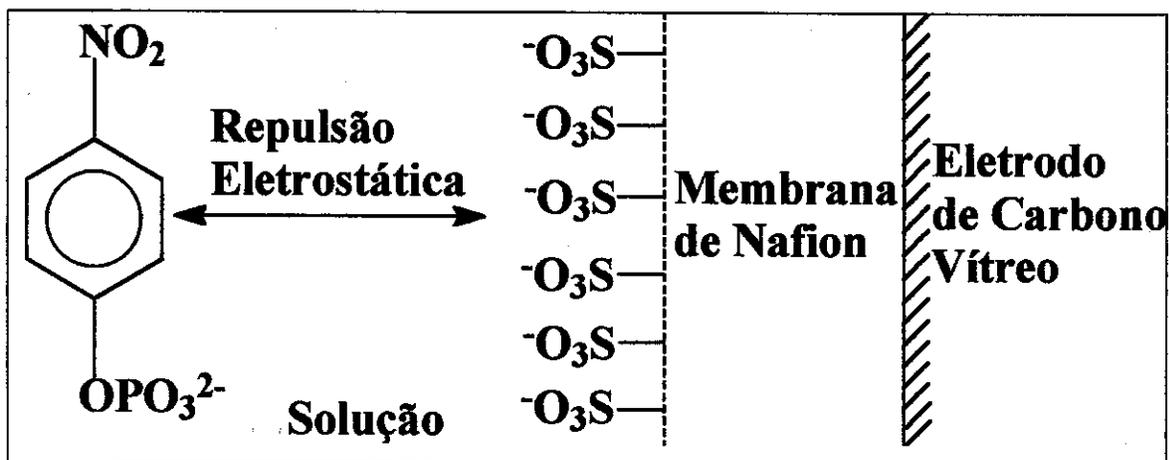


Fig. VI.10. Efeito da repulsão do grupo sulfônico carregado negativamente sobre o grupo fosfato.

Uma nova curva analítica para o eletrodo de carbono vítreo recoberto com membrana de Nafion foi obtida para avaliar o efeito da membrana na sensibilidade, faixa linear e limite de detecção na determinação do pNF.

A Fig. VI.11 mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para pNF em intervalo de concentração entre  $1,0 \cdot 10^{-5}$  a  $2,0 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, sobre o eletrodo de carbono vítreo modificado com Nafion, observando-se um aumento da corrente de pico em função do aumento da concentração do analito.

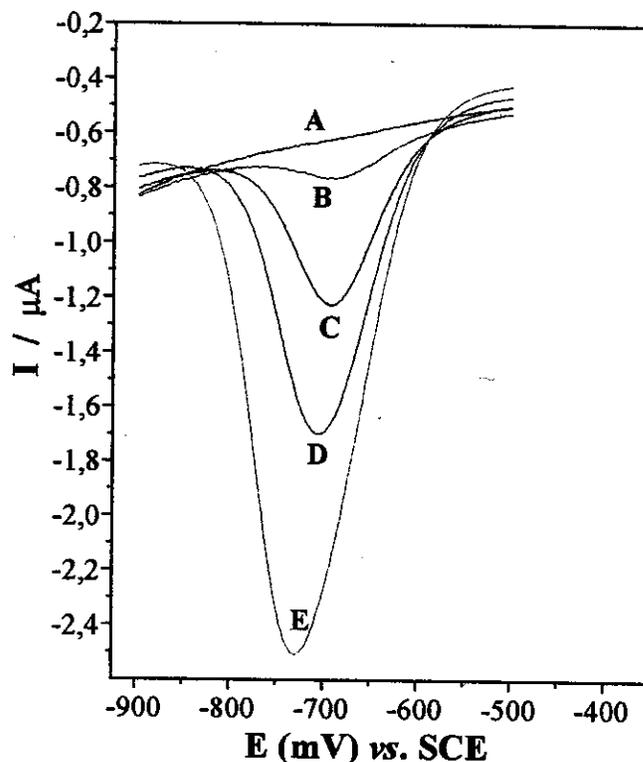


Fig. VI.11. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para redução de pNF em A = Tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5; B = A +  $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  pNF; C = A +  $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  pNF; D = A +  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  pNF; E = A +  $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  pNF sobre o eletrodo de carbono vítreo com membrana de Nafion

O respectivo gráfico dos valores de corrente de pico ( $\mu\text{A}$ ) em função da concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) de pNF, para o intervalo de concentração estudada é apresentada na Fig. VI.12 (a). Da mesma forma como ocorre com o eletrodo sem

membrana, para concentrações maiores que  $2,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  observa-se saturação do eletrodo como é verificado pelo desvio na linearidade da resposta.

A Fig. VI.12 (b) mostra a curva analítica na faixa linear de resposta que foi de  $2,0 \cdot 10^{-5}$  a  $2,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , sendo esta ligeiramente maior que a encontrada com o eletrodo sem membrana, entretanto o limite de detecção foi maior,  $17,08 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ .

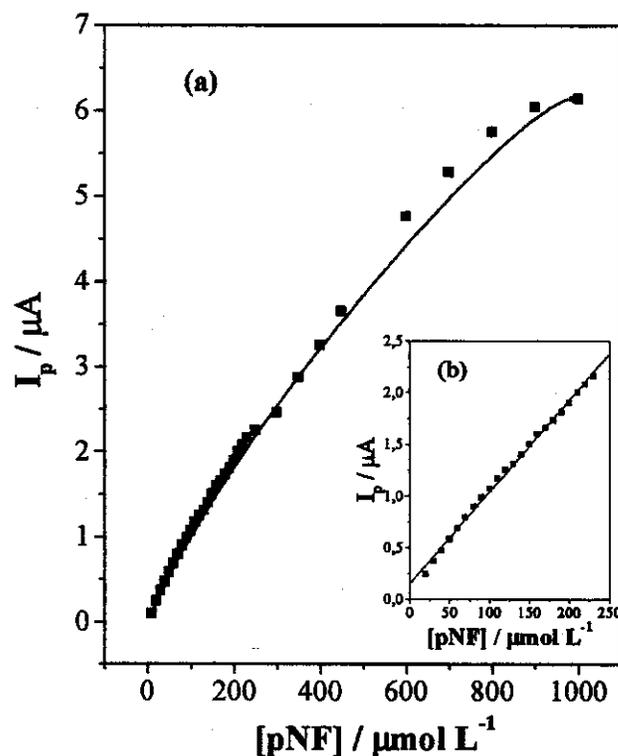


Fig. VI.12. (a) Dependência da resposta do eletrodo de carbono vítreo com Nafion em função da concentração de pNF. (b) Curva analítica para determinação de pNF.

A Tabela 1, mostra os valores do limite de detecção e sensibilidade para o eletrodo sem e com membrana de Nafion, podendo-se observar que a presença da membrana de Nafion provocou uma diminuição na sensibilidade de  $18,5 \text{ } \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L}$  para o eletrodo sem membrana de Nafion para  $8,9 \text{ } \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L}$ .

quando o eletrodo encontra-se com membrana. Igualmente há um aumento no limite de detecção de  $14,86 \mu\text{mol L}^{-1}$  para  $17,08 \mu\text{mol L}^{-1}$  para o eletrodo sem e com membrana de Nafion, respectivamente. Por isso, um estudo cinético é uma ferramenta útil para entender melhor o efeito da membrana de Nafion sobre o comportamento eletroquímico do pNF sobre eletrodo de carbono vítreo.

**Tabela 1.** Valores do limite de detecção e sensibilidade com eletrodo de carbono vítreo sem e com membrana de Nafion.

	Eletrodo de Carbono Vítreo	Eletrodo de Carbono Vítreo com Nafion
Limite de detecção ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	14,86	17,08
Sensibilidade ( $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{L}$ )	18,5	8,9

Mesmo com menor sensibilidade o eletrodo de carbono vítreo recoberto com Nafion permite a avaliação e determinação de pNF, com a vantagem de não ter a interferência do pNFF.

### *VI.7. Estudo Cinético.*

Experimentos de voltametria de varredura linear foram realizados empregando-se o eletrodo de disco rotatório de carbono vítreo (com e sem membrana de Nafion) com o objetivo de determinar a constante cinética ( $k_f$ ) para obter maiores informações sobre o processo do eletrodo e poder explicar o efeito da membrana de Nafion na sensibilidade e limite de detecção na determinação do pNF. Neste estudo provoca-se a convecção do sistema, as varreduras são feitas a baixa

velocidade (estado estacionário) para que as leituras sejam reflexo da interação da espécie eletroativa com o eletrodo.

### *VI.7.1. Estudo cinético do eletrodo sem membrana de Nafion.*

Em experimentos de estado estacionário, as correntes são limitadas pela etapa mais lenta da reação. A corrente de redução de pNF em eletrodo de disco rotatório de carbono vítreo pode ser limitada pelo transporte de massa ( $I_l$ ) de pNF para a superfície de eletrodo e/ou pela cinética da reação de transferência ( $I_k$ ) (equação 7). A corrente de redução medida é uma combinação das correntes  $I_l$  e  $I_k$  :

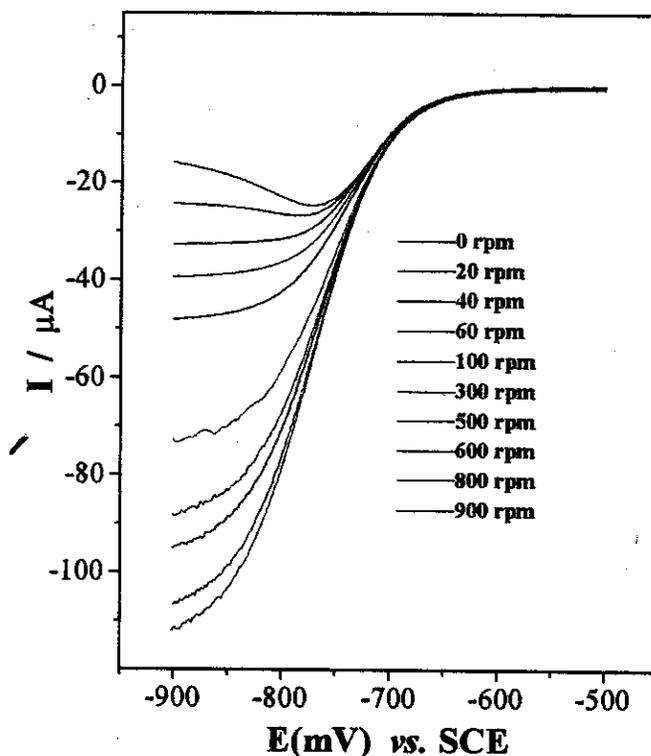
$$1/I = 1/I_l + 1/I_k \quad (7)$$

A corrente limitada por transporte de massa para um sistema reversível depende da velocidade de rotação do eletrodo e da concentração de pNF, e é determinada pela equação (8) de Levich[110]:

$$I_l = 0,620nFAC_0^*D_0^{2/3}\nu^{-1/6}\omega^{1/2} \quad (8)$$

onde  $n$  é o número de elétrons transferidos durante a reação,  $C_0^*$  concentração de pNF,  $F$  é a constante de Faraday,  $A$  é área geométrica do eletrodo,  $D_0$  é o coeficiente de Difusão,  $\nu$  é a viscosidade cinemática e  $\omega$  a velocidade de rotação.

Os voltamogramas de varredura linear foram obtidos em soluções de pNF de concentração de  $3,0 \cdot 10^{-4}$  a  $9,0 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> em diferentes velocidades de rotação do eletrodo. A Fig. VI.13, mostra o perfil obtido destes voltamogramas registrados para  $3,0 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de pNF Onde se observa um aumento da corrente limite ( $I_l$ ) em função da velocidade de rotação do eletrodo demonstrando a dependência da difusão no processo de redução.



**Fig. VI.13.** Voltamogramas lineares obtidos com eletrodo de carbono vítreo para  $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de pNF e diferentes velocidade de rotação do eletrodo.

Um gráfico de  $I_l$  vs.  $\omega^{1/2}$ , **Fig. VI.14**, foi construído para cada concentração de pNF, obtendo-se uma relação linear para velocidades de rotação entre 20 a 200 rpm, sendo que para velocidades maiores observa-se um desvio da linearidade. Este comportamento e o fato da reta não passar pela origem sugere alguma etapa cinética envolvida na reação de transferência de elétrons.

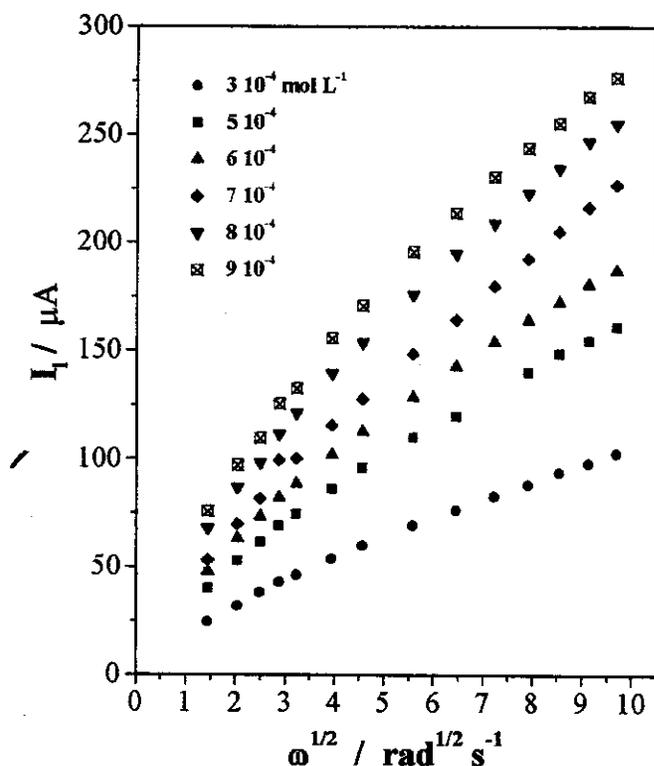


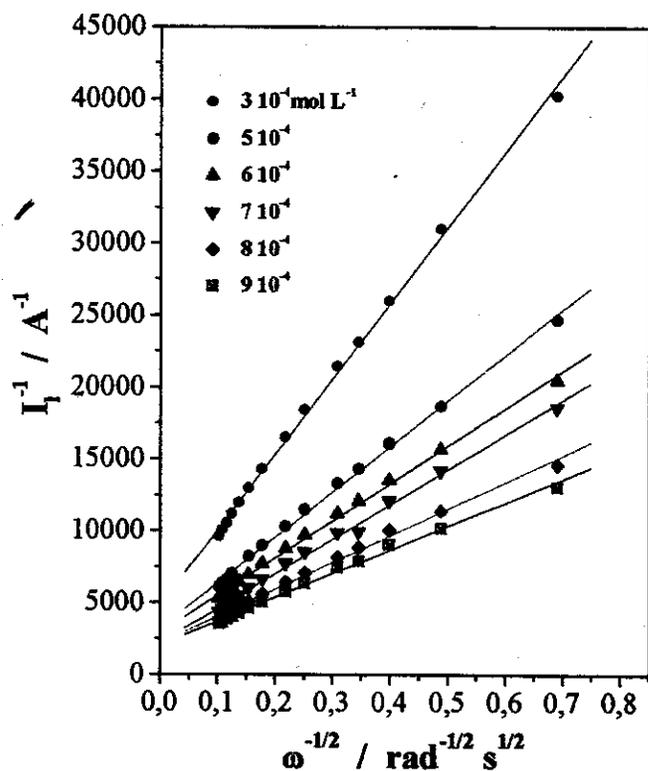
Fig. VI.14. Gráfico de Levich para varias concentrações de pNF em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5.

Para avaliar as etapas limitantes da performance do eletrodo de disco rotatório, as correntes medidas em diferentes velocidades de rotação são usualmente plotadas em coordenadas de Koutecky-Levich[110] ( $I_1^{-1}$  vs.  $\omega^{-1/2}$ ) dada pela equação (9):

$$1/I = 1/I_k + 1/(0,620nFAC_0^*D_0^{2/3}v^{-1/6}\omega^{1/2}) \quad (9)$$

As correntes de redução de pNF obtidas com eletrodo de carbono vítreo em diferentes concentrações de pNF e velocidades de rotação são apresentados como o gráfico de Koutecky-Levich na Fig. VI.15. Nota-se que a corrente do eletrodo

depende da velocidade de rotação no intervalo inteiro de concentrações de pNF estudadas.



**Fig. VI.15.** Gráfico de Koutecky-Levich da redução de pNF em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5, sobre o eletrodo de carbono vítreo para várias concentrações de pNF.

A partir do intercepto do gráfico de Koutecky-Levich foram obtidos os valores de  $1/I_k$  e  $I_k$  para cada concentração de pNF que estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores de  $1/I_k$  obtidos do intercepto no eixo das ordenadas da Fig. VI.15.

$[pNF] / \text{mmol L}^{-1}$	$1/I_k / \text{A}^{-1}$	$I_k / \text{mA}$
0,3	4816	0,2076
0,5	3268	0,3059
0,6	2933	0,3409
0,7	2197	0,4552
0,8	2236	0,4472
0,9	2104	0,4753

Tendo-se o valor de  $I_k$  para cada concentração obteve-se a Fig. VI.16, a partir da qual é determinado o valor de  $k_f$  obtido a partir do valor da inclinação na equação (10), onde o valor de  $n = 6$  elétrons,  $F = 96500 \text{ A s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ,  $A = 0,1963 \text{ cm}^2$ .

$$I_k = nFAk_fC_0^* \quad (10)$$

Sendo o valor da inclinação de  $454,48 \text{ mA mmol}^{-1} \text{ cm}^3$ , o valor encontrado de  $k_f$  foi de  $3,99 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ .

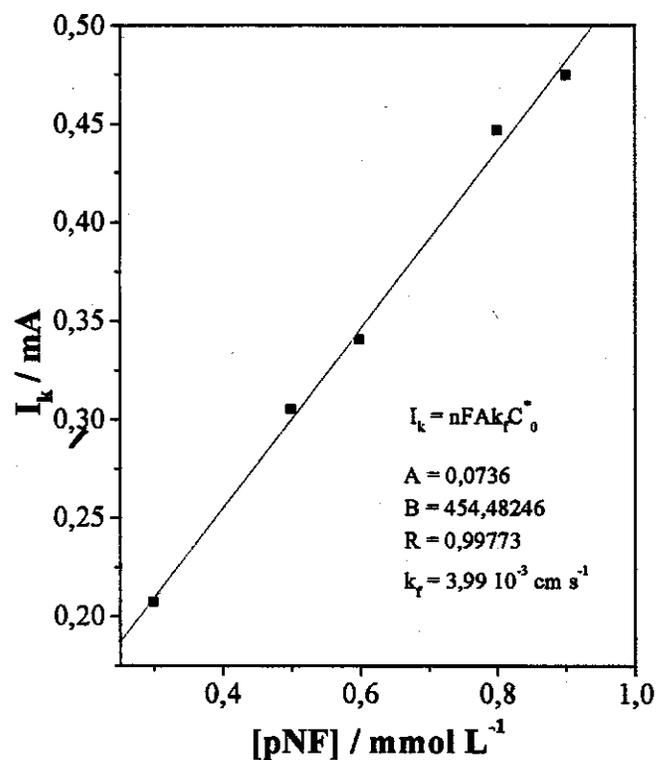
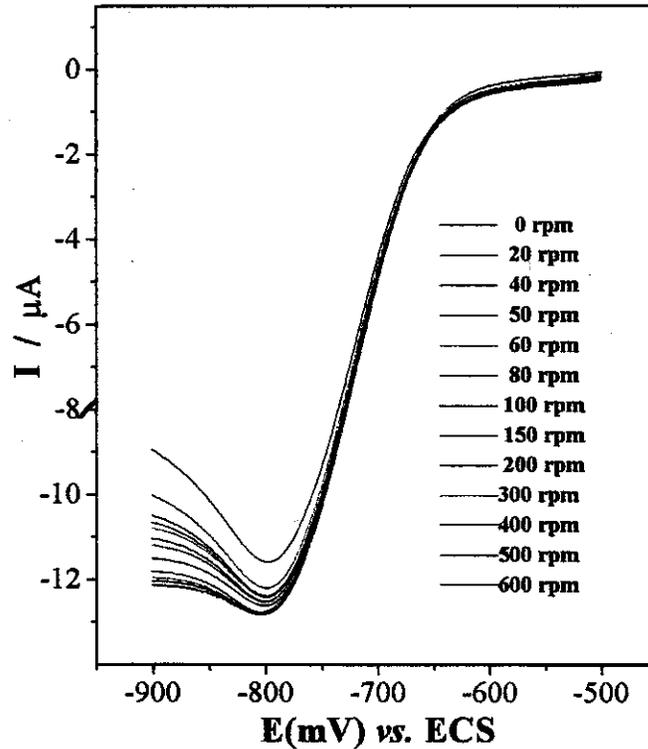


Fig. VI.16.  $I_k$  em função da concentração de pNF em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5, para a obtenção de  $k_f$ .

#### VI.7.2. Estudo cinético do eletrodo de carbono vítreo com membrana de Nafion.

Para o eletrodo de carbono vítreo recoberto com Nafion, também foram obtidos os voltamogramas de varredura linear para diferentes concentrações de pNF e diferentes velocidades de rotação. A Fig. VI.17 mostra que a corrente de redução praticamente não varia com aumento da velocidade de rotação.



**Fig. VI.17.** Voltamogramas lineares obtidos com eletrodo de carbono vítreo recoberto com Nafion para  $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de pNF.

Construindo-se um gráfico da corrente em função da velocidade de rotação ( $I_l$  vs.  $\omega^{1/2}$ ) para cada concentração obtém-se o chamado gráfico de Levich, **Fig. VI.18**, no qual efetivamente não há aumento da corrente, o que indica que o processo é independente da difusão. Este comportamento sugere alguma etapa cinética envolvida na reação de transferência de elétrons cuja equação que a governa é:

$$I_k = nFAk_f C_0^* \quad (10)$$

Onde os valores de  $I_k$  para cada concentração foram obtidos diretamente do gráfico, Fig. VI.18, a partir do intercepto com a ordenada, e são apresentados na Tabela 3.

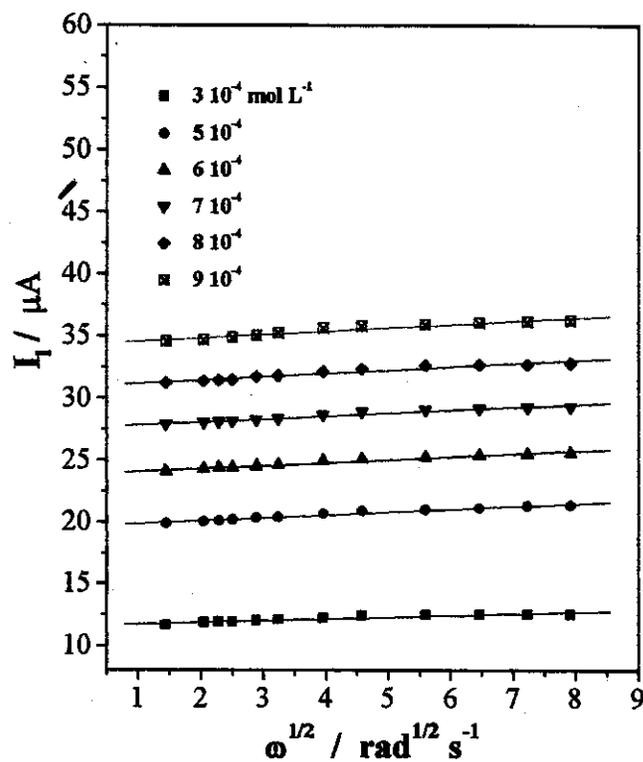


Fig. VI.18. Gráfico de Levich para pNF em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5.

Tabela 3. Valores de  $I_k$  obtidos do intercepto com a ordenada da Fig. VI.18.

[pNF] / mmol L <sup>-1</sup>	$I_k$ / mA
0,3	11,66
0,5	19,70
0,6	23,90
0,7	27,65
0,8	30,97
0,9	34,35

A Fig. VI.19, mostra um gráfico dos valores de  $I_k$  em função da concentração a partir do qual se determina o valor de  $k_f$  considerando o valor da inclinação na equação (10).

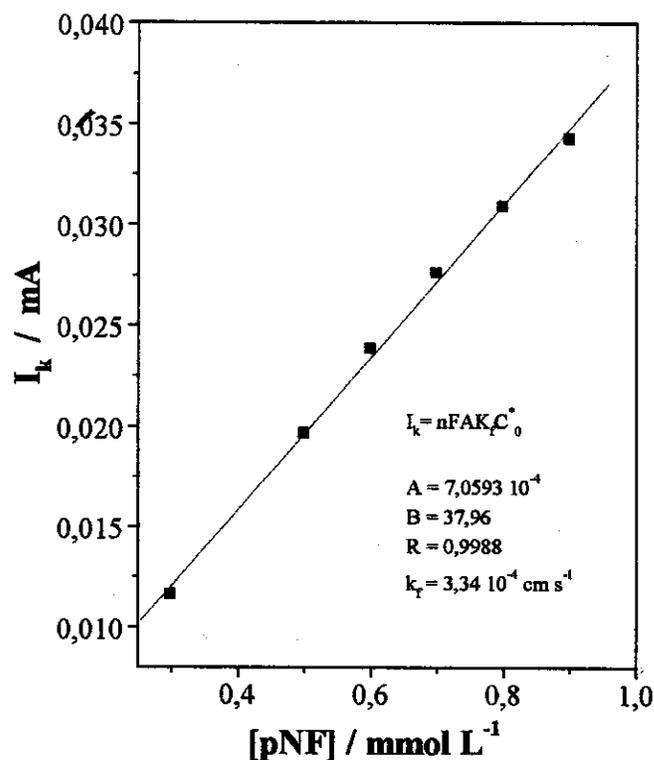


Fig. VI.19.  $I_k$  em função da concentração de pNF em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5, para a obtenção de  $k_f$ .

Os valores de  $k_f$  obtidos para o eletrodo de carbono vítreo sem membrana ( $k_f = 3,99 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ ) são maiores do que para o eletrodo com membrana ( $k_f = 3,34 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ ) o que mostra que, efetivamente, a membrana exerce certa resistência ao processo de transferência de elétrons e em consequência há uma diminuição na sensibilidade e aumento no limite de detecção.

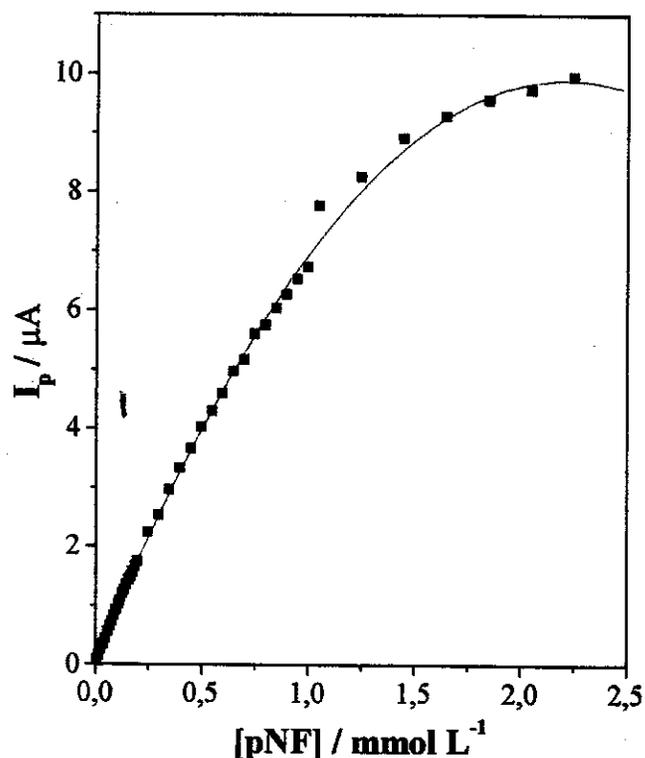
### ***VI.8. Aplicação do eletrodo recoberto com membrana de Nafion na determinação da Atividade da Fosfatase ácida da mamona.***

Devido ao fato de que a fosfatase ácida é inibida pelo tampão fosfato[111], foi realizado um estudo do comportamento eletroquímico de pNF em tampão acetato de sódio numa faixa de pH de 4 a 6, que são os valores próximos do pH ótimo da enzima fosfatase ácida, e posteriormente foi obtido uma curva analítica numa célula de 2 mL para determinar as constantes  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ .

#### ***Estudo do efeito da solução tampão acetato de sódio.***

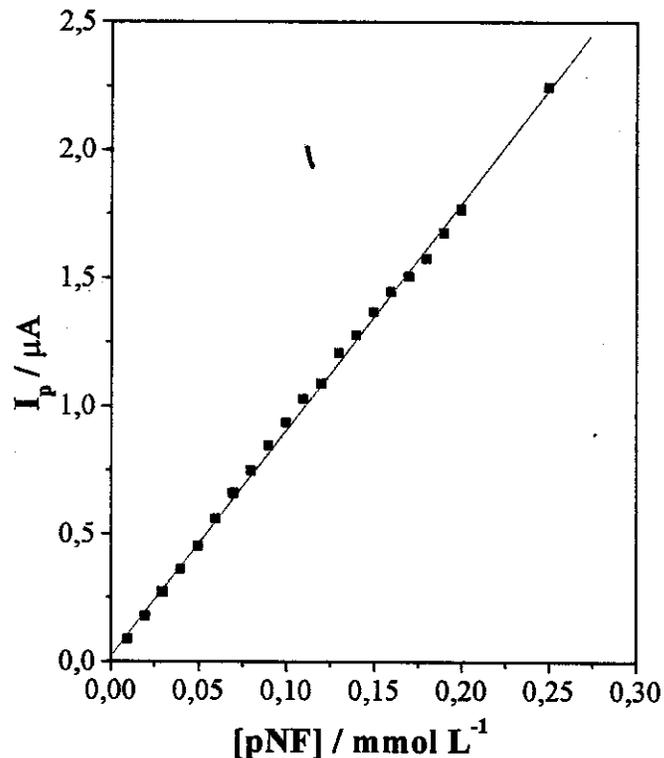
Estudos realizados a diferentes valores de pH (4 a 6) da solução tampão acetato mostrou que a resposta eletroquímica do pNF não tem muita variação nessa faixa de pH, e o fato da enzima fosfatase ácida apresentar uma maior atividade em pH 5, contribuíram para escolher solução tampão acetato pH 5 como meio de trabalho para a determinação da atividade da fosfatase ácida de semente de mamona.

Uma curva analítica para o pNF em tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 5 foi obtida com o eletrodo de carbono vítreo recoberto com Nafion para um volume de 2 mL, o qual será empregado para avaliar a atividade enzimática da fosfatase. Como pode-se observar na Fig. VI. 20, para concentrações maiores que  $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$  ocorre saturação do eletrodo, o que é verificado pelo desvio na linearidade da resposta.



**Fig.VI.20.** Dependência da resposta do eletrodo de carbono vítreo com membrana de Nafion em função da concentração de pNF, utilizando-se uma célula com 2 mL de volume total e tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5, velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup> e amplitude de pulso de 25 mV.

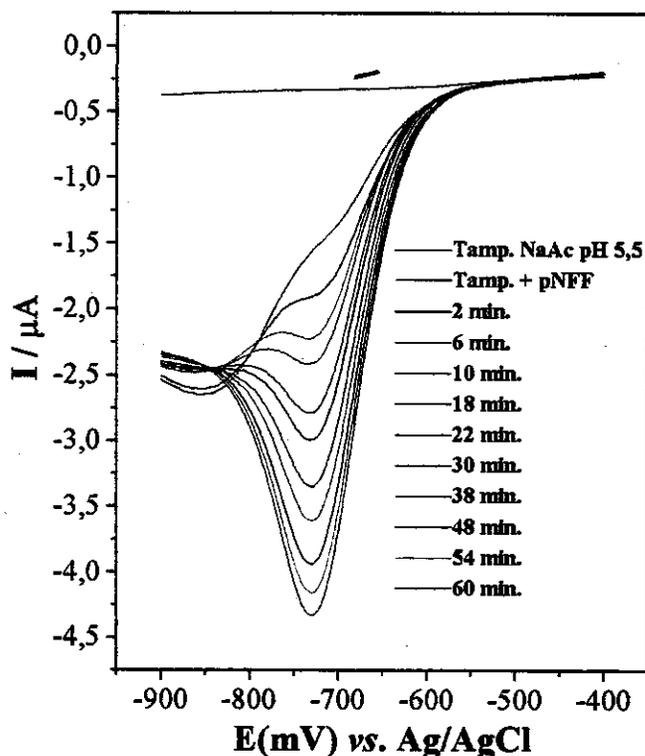
A Fig. VI. 21 mostra a curva analítica na faixa de resposta linear de 0,01 a 0,25 mmol L<sup>-1</sup> para o pNF, ajustada pela equação  $I_p = 0,025(\pm 0,010) + 8,861(\pm 0,078) [\text{pNF}]$ , para  $N = 21$ , com um coeficiente de correlação linear de 0,9993 onde  $I_p$  está dado em  $\mu\text{A}$  e  $[\text{pNF}]$  em  $\text{mmol L}^{-1}$ .



**Fig. VI. 21.** Curva analítica para determinação de pNF obtida com o eletrodo de carbono vítreo com membrana de Nafion, utilizando-se uma célula com 2 mL de volume total e tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5, velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup> e amplitude de pulso de 25 mV.

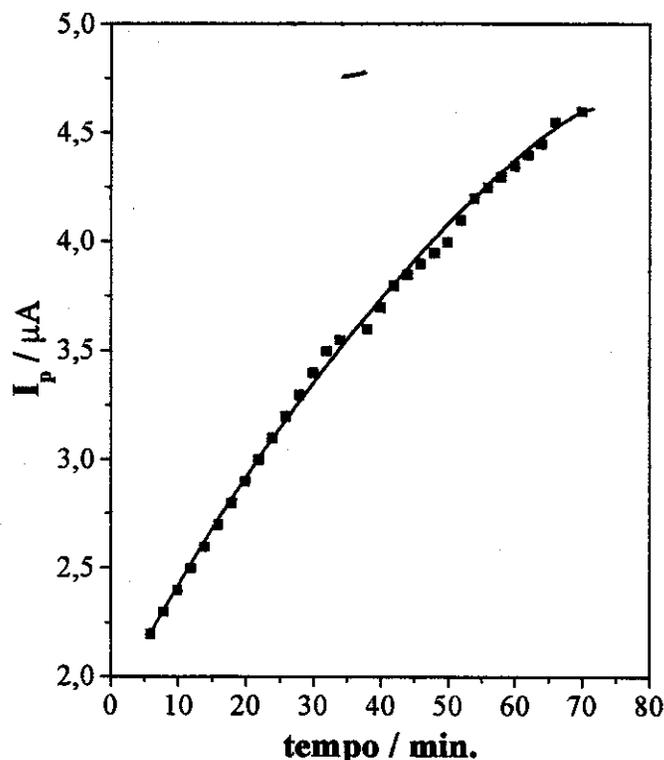
#### **VI.8.1. Efeito do tempo de incubação.**

O efeito do tempo de incubação na atividade da enzima foi estudado usando 5 mmol L<sup>-1</sup> de pNFF e 1 μg da enzima em tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5. O pNF, gerado pela reação enzimática, foi determinado por voltametria de pulso diferencial, após intervalos de 2 minutos de incubação, sem paralisar a reação durante um tempo de 60 minutos. Os voltamogramas da Fig. VI.22 mostram um aumento na corrente de pico devido ao pNF gerado a medida em que o tempo de incubação aumenta.



**Fig. VI. 22.** Aumento da corrente de pico devido à liberação de pNF da reação enzimática em função do tempo de incubação. Volume da célula de 2 mL, tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,  $1 \mu\text{g}$  de fosfatase ácida, velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  e amplitude de pulso de 25 mV.

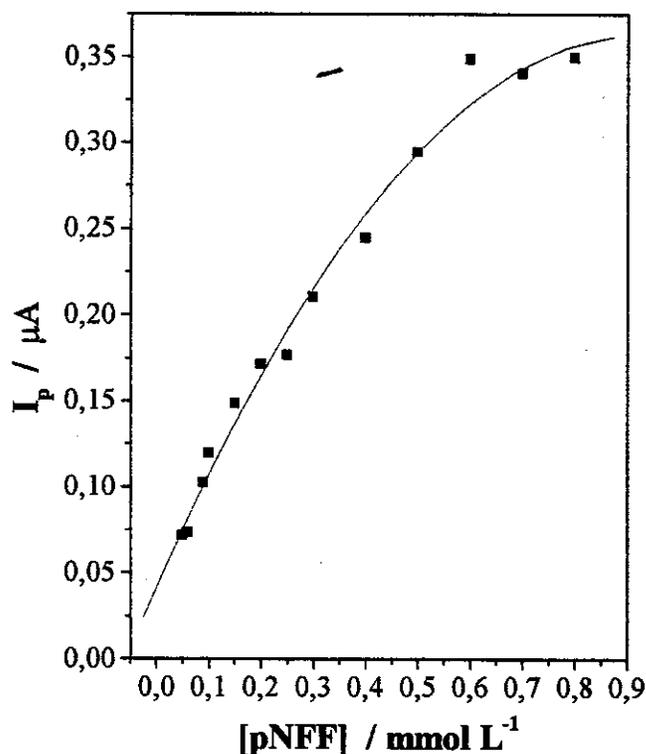
Plotando os valores de corrente de pico em função do tempo de reação obtém-se a Fig. VI. 23, onde se pode observar que a reação é linear até 34 minutos. Este resultado torna-se importante, pois mostra que a enzima mantém sua atividade proporcional numa ampla faixa de tempo de incubação o que é importante já que o tempo de incubação pode ser selecionado nessa faixa permitindo trabalhar na determinação de outros parâmetros.



**Fig. VI. 23.** Relação entre a corrente de pico em função do tempo de incubação. Volume da célula de 2 mL, tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,  $1 \mu\text{g}$  de fosfatase ácida velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  e amplitude de pulso de 25 mV.

#### **VI.8.2. Determinação de $K_m$ , $V_{m\acute{a}x}$ e Atividade Enzimática.**

Para a determinação de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  da reação enzimática foram realizados experimentos de voltametria de pulso diferencial utilizando concentração de pNFF de  $0,05$  a  $3,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $0,25 \mu\text{g}$  de enzima por ensaio e um tempo de incubação de 10 minutos. A Fig. VI. 24, mostra um gráfico da corrente de pico em função da concentração de substrato, apresentando uma curva típica compatível com a de Michaelis-Menten.



**Fig. VI. 24.** Gráfico da corrente de pico de redução do pNF gerado pela reação enzimática da fosfatase ácida em função da concentração do substrato pNFF. Volume da célula de 2 mL, tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5, 0,25 μg de fosfatase ácida, tempo de incubação de 10 min, velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup> e amplitude de pulso de 25 mV.

A Fig. VI. 25 mostra um gráfico duplo recíproco da corrente versus concentração de pNFF conhecido como o gráfico de Lineweaver–Burk, a partir do qual foi possível obter os valores de  $K_m = 0,31 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $V_{m\acute{a}x} = 0,45 \text{ μA}$  através da equação (11):

$$1/I_p = 1/V_{m\acute{a}x} + K_m/V_{m\acute{a}x} [S] \quad (11)$$

O valor de  $K_m$  obtido é da mesma ordem de grandeza ao encontrado pelo método espectrofotométrico reportado na literatura cujo valor foi de  $0,52 \text{ mmol L}^{-1}$  [111]. Como uma unidade enzimática (UE) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 micromol de pNF por minuto e a atividade enzimática (AE) é definida como UE por mg de proteína, expressando o valor de  $V_{\text{máx}}$  em termos de concentração de pNF gerado por minuto a partir da equação da curva analítica  $I_p = 0,025(\pm 0,010) + 8,861(\pm 0,078) [\text{pNF}]$ , para  $N = 21$ , com um coeficiente de correlação linear de 0,9993, isto é para uma corrente de  $0,45 \mu\text{A}$  gerada pela formação de pNF, a quantidade de pNF é  $0,0048 \text{ mmol L}^{-1}$ , em UE é igual a  $0,0260 \text{ mg}$  de enzima, e a atividade enzimática é  $38,46 \text{ UE/mg}$ .

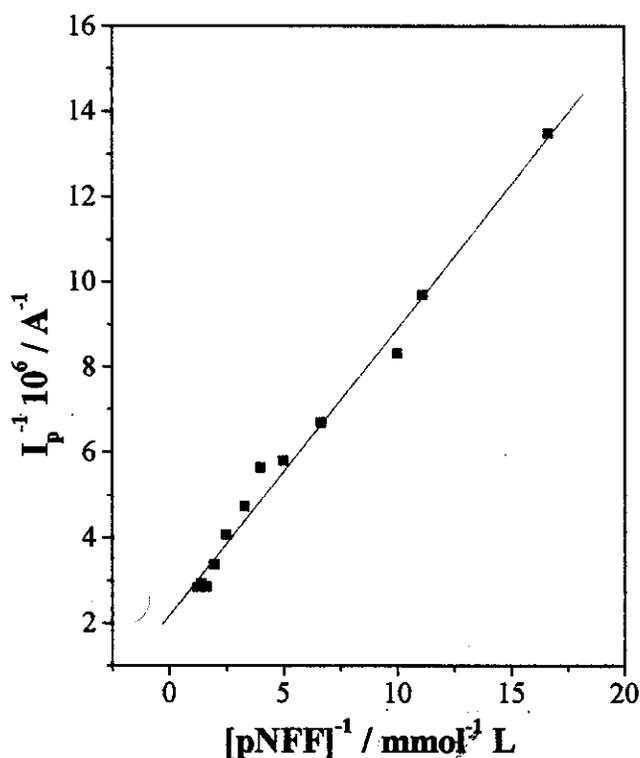


Fig. VI.25. Gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk para a determinação dos parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{\text{máx}}$ .

---

A metodologia proposta para a determinação da atividade da fosfatase ácida utilizando um eletrodo de carbono vítreo com membrana de Nafion apresenta algumas vantagens em relação ao método espectrofotométrico uma vez que não é necessário paralisar a reação para determinar o pNF gerado enzimaticamente. Isso representa uma facilidade operacional além de utilizar menor quantidade de enzima otimizando mais rapidamente as condições para o ensaio e, evitando a adição de outros reagentes. Com base no valor de  $K_m$  obtido pelo método eletroquímico em comparação com o fornecido pelo método espectrofotométrico pode-se dizer que o método proposto se aplica muito bem na determinação da atividade de fosfatase ácida, pois possibilita monitorar o pNF gerado sem interferência do substrato pNFF.

## VII. CONCLUSÕES.

O sensor construído baseado no recobrimento do eletrodo de carbono vítreo com membrana de Nafion permitiu determinar a atividade enzimática mediante o monitoramento de pNF liberado da reação entre a fosfatase ácida e o pNFF sem a interferência deste último. A metodologia desenvolvida apresenta uma grande vantagem, já que permite o monitoramento da reação enzimática sem ter que paralisá-la em intervalos de tempo, enquanto que no método espectrofotométrico isto é necessário, além disso em cada ensaio exige nova quantidade de enzima. Portanto, o método desenvolvido utiliza uma quantidade muito menor de enzima e reagente, baixando o custo e o tempo de análise.

Em comparação a outras técnicas eletroanalíticas, a polarografia de pulso diferencial apresenta uma faixa de trabalho abrangendo concentrações menores do que as obtidas no presente estudo. Entretanto o método polarográfico tem a desvantagem de utilizar substância tóxica e além disso não seria possível a eliminação do interferente.

A sensibilidade do eletrodo com membrana diminuiu e o limite de detecção aumentou em relação ao eletrodo de carbono vítreo sem modificação, já a faixa de resposta linear manteve-se inalterada num valor de  $2,0 \cdot 10^{-5}$  a  $2,3 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. A constante cinética de transferência de elétrons é menor para o eletrodo com membrana o que significa que esta confere certa resistência à transferência de elétrons.

A atividade enzimática foi 38,46 UE/mg para a enzima fosfatase ácida extraída da semente de mamona com Km de 0,31 mmol L<sup>-1</sup>, sendo este valor da mesma ordem de grandeza ao obtido pelo método espectrofotométrico que foi de 0,52 mmol L<sup>-1</sup>.

**VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**

1. Moses, P. R.; Wier, P.; Murray, R. W. *Anal. Chem.* 1975, (47), 1882.
2. Lane, R. F.; Hubbard, A. T. *J. Phys. Chem.* 1973, (77), 1401.
3. Watkins, B. F.; Behling, J. R.; Kariv, E.; Miller, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1975, (97), 3549.
4. Gold, V.; Loening, K. L.; McNaught, A. D.; Sehmi, P. *Compendium of Chemical Terminology, IUPAC recommendations*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1998.
5. Cass, A. E. G.; Davis, G.; Francis, G. D.; Hill, H. A. O.; Aston, W. J.; Higgins, J.; Plotkin, E. J.; Scott, L. D. L.; Turner, A. P. F. *Anal. Chem.*, 1984, (56), 667.
6. Sprules, S. D.; Hart, J. P.; Wring, S. A.; Pittson R. *Analyst*, 1994, (119), 253.
7. Stoytcheva, M.; Nankov, N.; Sharkova, V. *Anal. Chim. Acta*, 1995, (315), 101.
8. Onnerfjorf, P.; Emneus, J.; Marko-Varga, G.; Gorton, L.; Ortega, F.; Dominiguez, E. *Biosens. Bioelectron.* 1995, (10), 607.
9. Sousa, M. F. B. *Quím. Nova*, 1977, (20; 2), 191.
10. Aleixo, L. M.; Sousa, M. F. B.; Godinho, O. E. S.; Oliveira Neto, G.; Gushikem, Y.; Moreira, J. C. *Anal. Chim. Acta*, 1993, (271), 143.
11. Cai, X.; Ogorevec, B.; Tavcar, G.; Kalcher, K. *Electroanalysis* 1995, (7), 639.
12. Riley, P. J.; Wallace, G. G. *Electroanalysis*, 1991, (3), 191.
13. Price, J.; Baldwin, R. P. *Anal. Chem.* 1980, (52), 1940.
14. Nagy, G.; Gerhardt, G. A.; Oke, A. F.; Rice, M. E.; Adams, R. N.; Moore, R. B.; Szentirmay, M. N.; Martin, C. R. *J. Electroanal. Chem.*, 1985, (188), 85.
15. Hoyer, B.; Florence, T. M. *Anal. Chem.*, 1987, (59), 2839.

16. Downey, T. M.; Nieman, T. A. *Anal. Chem.*, 1992, (64), 261.
17. Espenscheid, M. W.; Chatak Roy, A. R.; Moore III, R. B.; Penner, R. M.; Szentirmay, M. N.; Martin, C. R. *J. Chem. Soc. Faraday Trans I.* 1986, (82), 1051.
18. Whiteley, L. D.; Martin, C. R. *Anal. Chem.*, 1987, (59), 1746.
19. Limoges, B.; Degrand, C.; Brossier, P.; Blankespoor, R. L. *Anal. Chem.*, 1993, (65), 1054.
20. Tudos, A. J.; Ozinga, W. J. J.; Poppe, H.; Kok, W. T. *Anal. Chem.* 1990, (62), 367.
21. Bindra, D. S.; Wilson, G. S. *Anal. Chem.*, 1989 (61) 2566.
22. Le. Gal La Salle, A.; Limoges, B.; Degrand, Ch. *J. Electroanal. Chem.* 1993, (379), 281.
23. Hsu, W. Y.; Gierke, T. D. *J. Membr. Sci.*, 1983, (13), 307.
24. Rodriguez, I. N.; Zamora; M. B. *Mikrochim. Acta*, 1997, (126), 87.
25. Malinski, T.; Taha, Z. *Nature (London)*, 1992, (358), 676.
26. Moussy, F.; Harrison, D. J.; Rajotte, R. V. *Int. J. Artif. Organs*, 1994, (2), 88.
27. Wang, J.; Tuzhi, P.; Golden, T. *Anal. Chim; Acta*, 1987, (194), 129.
28. Dray, D. N.; Keyes, M. H.; Watson, B. *Anal. Chem.*, 1977, (49), 1067A.
29. Colton, C. K.; Smith, K. A.; Merril, E. W.; Farrell, P. C. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1971, (5), 459.
30. Amine, A.; Kauffmann, J. M.; Patriarche, G. J.; Christian, G. D. *Talanta*, 1993, (40), 1157.
31. Gilmartin, M. A. T.; Hart, J. P. *Analyst*, 1994, (119), 2431.
32. Murray R. W. "Chemically Modified Eletrodes", *Electroanalytical Chemistry*, Vol. 13, A. J. Bard, ed., Marcel Dekker Inc., 1984.
33. Inzelt G. "Mechanism of Charge Transport in Polymer-Modified Eletrodes" in *Eletroanalytical Chemistry*, Vol. 18, A. J. Bard, ed., Marcel Dekker Inc., NY, 1984.

34. Jirí Barek; Hana Ebertová; Víctor Messtrik; Jirí Zima. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1994, (59), 1761.
35. Smyth, M. R.; Osteryoung, J. G. *Anal. Chim. Acta*, 1978, (96), 335.
36. Granjeiro, P. A. (1997) Purificação e Caracterização de Fosfatase ácida da semente de Mamona, *Tese de mestrado*, Instituto de Biologia. UNICAMP.
37. Taga, E. M. (1979) Fosfatase ácida de Fígado de Cobaia- purificação estudos eletroforéticos e algumas propriedades. *Tese de Doutorado*, Instituto de Química. USP.
38. Thompson, R. Q.; Barone III, G. C.; Halsall; H. B.; Heineman, W. R. *Anal Biochem.*, 1991, (192), 90.
39. Realini, P. A. *J. Chromatogr. Sci.* 1981, (19), 124.
40. U.S. Environmental Protection Agency, Quality Assurance and Quality Control for Screening and Verification of Industrial Effluents for Priority Pollutants, Environmental Monitoring and support Laboratories, Cincinnati, 1979, 45268.
41. U.S. Environmental Protection Agency, Fed Regist. 1973, 38, 125.
42. Daldrup, T.; Susaoto, F.; Michalke, P. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 1981, (308), 413.
43. Lee, H. K.; Li, S. R. Y.; Toy, J. H. *J. Liq. Chromatogr.* 1981, (4), 1065.
44. Borys, A. *J Chromatogr.* 1981, (216), 361.
45. Farran, A.; Cortina, I. Y.; de Pablo, I.; Barcelo, D. *Anal. Chim. Acta* 1990, (213), 119.
46. Gumprech, D. L. *J. Chromatogr.* 1965, (18), 336.
47. Kopecin, M. M.; Tarana, M. V.; Cupic, S. D.; Comor, S. J. *J Chromatogr.* 1989, (462), 392.
48. Zietek, M. *Mikrochim. Acta* 1975, (II), 463.
49. Burgschat, H.; Netter, K. J. *J. Pharm. Sci.* 1977, (66), 60.
50. Matsue, T.; Fujihira, M.; Osa, T. *Anal. Chem.* 1981, (53), 722.

51. Saedd, A.; Tremori, E.; Manao, G.; Camici, G.; Cappugi, G.; Ramponi, G. "Bovine brain Low M<sub>r</sub> acid phosphatase: Purification and properties", *Physiol. Chem. Phys. Me. NMR*, 1990, (22), 81.
52. Roche, M. J. "Sur les phosphatases du sang", *Bull. Soc. Chem. Biol.* 1931, (13), 841.
53. Neuman, H. "Substrat selectivity in the actino of alkaline and acid phosphatase", *J. Biol. Chem.* 1968, (243), 4671.
54. Reid, T. W.; Wilson, I. B. E. "Coli alkaline phosphatase", *In the Enzymes*, 1971, 2<sup>o</sup> edition, IV: 375-415, edited by Boyer, P. D. Academic Press., N. Y.
55. Lura, H. E. "Investigations of the salivary phosphates and phosphatases", *Ann. Hum. Gen.* 1947, (26), 203.
56. Andrews, A. T. "Bovine Milk Acid phosphatase. I. Some kinetics studies and other properties using a partially purified preparation", *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, (321), 197.
57. Vaishwanar, B. S.; Abhyankar, H. N. "Acid phosphatase and pH in human semen", *Indian J. Exp. Biol.*, 1971, 261.
58. Horn, P.; Walther, G.; Leithoff, H. "Disc electrophosys diferentation of various acid phosphatases", *Z. Recho Medizin*, 1971, (68), 129.
59. Kilsheimer, G. S.; Axelrod, B. "Inhibition of prostatic Acid Phosphatase by Alpha-Hydroxycarboxylic Acids", *J. Biol. Chem.*, 1957, (227), 879.
60. Di Pietro, D. L. "Purification and propertie of human placental acid phosphatase", *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, (235), 458.
61. Tapani, V. P. "New type of acid phosphatase from rat testis", *Experientia*, 1971, (27), 42.
62. Chaimovich, H.; Nome, F. "Purification and properties of na Acid phosphatase from bovine brain", *Arch. Biochem. Biophys.* 1970, (139), 9.
63. Shibko, S.; Tappel, A. L. "Acid phosphatase of the lysosomal and soluble fraction of rat liver", *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, (73), 76.

64. Remy, L.; Michel, B. M.; Athonel, H.; Anne, M. "Critical study of extra-lysosomal acid phosphatase localizations in thyroid follicular cells by Gomore reaction", *Histochem.* 1975, (43), 131.
65. Maggi, V. "Acid phosphatases in rat heart", *J. Biochem.* 1969, (115), 51P.
66. Ericson, J. L.; Trump, B. F. "Electron microscopic studies of the epithelium of the proximal tubule of the rate kidney. I. The intracellular localization of acid phosphase", *Lab. Invest.* 1964, (13), 1427.
67. Chersi, A.; Bernardi, A.; Bernardi, G. "Acid hydrolases. VI Isolation and characterization of spleen acid phosphomonoesterase B.", *Biochechim. Biophys. Acta*, 1971, (246), 51.
68. Kromman, J. H. "Hamster salivary gland sexual dimorphism. II. A histochemical study of acid phosphatase", *J. Dent. Res.* 1963, (42), 825.
69. Gothlin, G.; Ericsson, J. L. E. "Fine structural localization of acid phosphomono esterase in the brush border region of osteo clasts", *Histochem.* 1971, (28), 337.
70. Freilich, L. S. "Ultrastructure and acid phosphatase cytochemistry of odontoblast. Effects of parathyroid extract", *J. Dent. Res.*, 1971, (50), 1047.
71. Ciecziura, L.; Jedrzejewa, T.; Cieslak, M.; Ziemnowicz-Giowacka, W.; Szymaniak, E. "Histochemical and biochemical investigations of patterns of acid phosphatase activity in periodontopathies before and after surgical treatment", *CZAS. Stomato.l*, 1970, (23), 1245.
72. Itoiz, M. E.; Carranza, F. A.; Cabrini, R. L. "Histotopografic distribution of alkaline and acid phosphatase in periodontal tisúes of laboratory animais", *J. Periodont.*, 1964, (35), 470.
73. Dastur, D. K.; Dabholbar, A. S. "Histochemistry of leprous nerves and skin lesions: acid phosphatase", *J. Pathol.*, 1974, (113), 69.
74. Bowen, J. D. "Golgi associated and phosphatase in muscle and nerve cells from arion ater", *Protoplasma*, 1970, (71), 409.

75. Robinson, H. "Electrophoretic and biochemical analysis of acid phosphatase in the tail of *Xenopus laevis* during development and metamorphosis", *J. Exp. Zool.*, 1972, (180), 127.
76. Yang, T. T.; Sinai, P.; Karin, S. R. *Anal. Biochem.* 1996, (241), 103.
77. Boroughs, H. "Studies on the acid phosphatases of green leaves", *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, (49), 30.
78. Roberts, D.W.A "The wheat leaf phosphatases. II Pathways of hydrolysis of some nucleotides at pH 5,5", *J. Biol. Chem.*, 1956, (222), 259.
79. Shaw, J.G. "Acid phosphatase from tobacco leaves", *Arch. Biochem. Biophys.*, 1966, (117), 1.
80. Slack, C. R.; Hatch, M. D.; Goochild, D. J. "Distribution of enzymes in mesophyll and parenchyma – sheath chloroplasts of maize leaves in relation to C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis", *Biochem. J.*, 1969, (114), 489.
81. Uehara, K.; Fujimomoto, S.; Taniguchi, T. "Studies on violet-colored acid phosphatase pf sweet potato: Purification and some physical properties", *J. Biochem.*, 1974, (75), 627.
82. Jacob, J. L.; Sontag, N. "Purification et étude de la phosphatase acide lutoïdique du latex d'*Hevea brasiliensis*", *Biochimie*, 1974, (56), 1315.
83. Rengasamy, A.; Selvam, R.; Gnanam, A. "Isolation and properties of an acid phosphatase from thylakoid membranes of *Sorghum vulgare*", *Arch. Biochem. Biophys.*, 1981, (209), 230.
84. Rossi, A.; Palma, M.S.; Leone, F. A.; Briigliador, M. A. "Properties of acid phosphatase from scutella of germinating maize seeds", *Phytochem.* 1981, (20), 1823.
85. Strother, S.; Singh, M.; Beresford, G.; Knox R. B. "Phosphatases from pollen of *Brassica campestris* and *Lilium regale*", *Phytochem.* 1985, (24), 1447.

86. Yamagata, H.; Tanaka, K.; Kasai, Z. "Purification and characterization of acid phosphatase in aleurone particles of rice grains", *Plant. & Cell Physiol.*, 1980, (21), 1449.
87. Gabard, K.A.; Jones, R. L. "Localization of phytase and acid phosphatase isoenzymes in aleurone layers of barley", *Physiol. Plant.*, 1986, (67), 182.
88. Basha, S. M. "Purification and characterization of an acid phosphatase from peanut (*Arachis hypogaea*) seed", *Can. J. Bot.*, 1984, (62), 385.
89. Park, H. S. C.; van Etten, R. L. "Purification and Characterization of homogeneous sunflower seed acid phosphatase", *Phytochem.*, 1986, (25; 2), 351.
90. Bhargava, R.; Sachar, R. C. "Induction of acid phosphatase in cotton seedlings enzyme purification, subunit structure and kinetic properties", *Phytochem.* 1987, (26), 1293.
91. Ullarh, A. H. J.; Gibson, D. M. "Purification and characterization of acid phosphatase from cotyledons of germinating soybean seeds", *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, (260), 514.
92. Pasqualini, S.; Panara, F.; Bracardi, P.; Antonielli, M. "High molecular weight acid phosphatase from barley coleoptiles", *Phytochem.*, 1992, (31), 3703.
93. Miernyk J. A. "Purification and characterization of the major acid phosphatase isozyme by maize endosperm cultures", *Phytochem.*, 1992, (31), 2613.
94. Fishman, W. H. "The phosphohydrolases: their biology, biochemistry and clinical enzymology", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1969, (166), 745.
95. Police, P.; D'Alise, L. "Acid and alkaline phosphatase activity in saliva of humans with cancerous lesions of the mouth", *Arch. Estomatol.* (Napoles), 1961, (2), 407.
96. Kumar, M.; Gupta, R. K. "Evaluation of serum acid phosphatase activity in kidney diseases". *J. Indian Med. Assoc.*, 1971, (56), 89.

97. Collins, A. J.; Lewis, D. A. "Lysosomal enzyme levels in the blood of arthritic rats". *Biochem. Pharmacol.*, 1971, (20), 251.
98. Beckman, G.; Beckman, L.; Lemperg, R. "Acid phosphatase activity in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and other joint disorders", *Acta Rheumatol., Scand.*, 1971, (17), 47.
99. Veprinskaya, S. I.; Bondarev, L. S. "Activity of acid phosphatase in leukocytes in infectious hepatitis", *Klin. Med.*, (Moscow), 1971, (49), 102.
100. Delarbre, C.; Hitier, Y.; Terroine, T.; Houdt, A. M. "Effects of excess dietary ascorbic acid on the level of testicular acid phosphatase activity in guinea pig", *Arch. Sci. Physiol.*, 1971, (25), 533.
101. Wyen, N. V.; Udvardy, J.; Farkas, G. L. "Changes in the level of acid phosphatase in Avena leaves in responses to cellular injury", *Phytochem.* 1971, (10), 765.
102. Hundson, P. B.; Tsuboi, K. K.; Mittelman, A. "Prostatic cancer: extremely elevated serum acid phosphatase associated with altered liver function", *Amer. J. Med.*, 1955, (19), 895.
103. Carevic, O.; Sverbo, V.; Boranic, N. "Acid phosphatase activity in the liver of mice with transplanted leukaemia", *Europ. J. Cancer*, 1973, (9), 549.
104. Zeller, J. "Cytochemie der lysosomen in der rattennier unter normailen und experimentellen bedingunger". *Histochem.*, 1973, (35), 235.
105. Den Tandt, W. R.; Giesberts, N. A. "Deficiency of lisosomal enzymes in storage diseases", *Biochem. Med.* 1973, (7), 441.
106. Narasimhan, T. R.; Nair, S. G. "Efecct of CCL<sub>4</sub> poisoning on the activity of a few encimes and lipid phosphorus content in the plasma of ducks and chicken", *Indian J. Med. Res.*, 1974, (62), 65.
107. Rosenblit, P. D.; Metzger, R. P.; Wick, A. N. "Effect of streptozotocim diabetes on acid phosphatase and selected glycosidase activities of serum and various rat organs", *Proc. Soc. Biol. Med.*, 1974, (145), 244.

108. Livni, N.; Yafee, H. "Hystochemistry of normal and ethionine treated rat tetis", *Histochemistry*, 1974, (40), 329.
109. Zhiwei Zhu; Nan-Qiang Li, *Electroanalysis* 1998, (9), 10.
110. Allen J. Bard; Larry R. Faulkner. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, New York, 1980, p. 280-296.
111. Granjeiro, P. A.; Ferreira, C. V; Granjeiro, J. M.; Taga, E. M.; Aoyama H. *Physiol. Plant*. 1999, (107), 151.