

SENSORES E BIOSENSORES (SB)

Índice

SB01..... 1105

DETERMINAÇÃO DIRETA E SIMULTÂNEA DE CÁDMIO E CHUMBO EM BIODIESEL POR VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA NO MODO PULSO DIFERENCIAL USANDO ELETRODO DE FILME DE BISMUTO

Myrna B. Guimarães, Edmar P. Marques, Ricardo Aucélio Aldaléa L. B. Marques

SB02..... 1108

DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE RANITIDINA UTILIZANDO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM ÓXIDO DE RUTÊNIO (III) HEXACIANOFERRATO

William Reis de Araujo e Thiago Regis Longo, Cesar da Paixão

SB04..... 1111

ELETRODO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO E FILME DE COBALTO PARA DETECÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Cleylton Bezerra Lopes, Francisco de Assis dos Santos Silva,, Phabyanno Rodrigues Lima,, Marília Oliveira Fonseca Goulart,² e Lauro Tatso Kubota²

- SB05..... 1114**
ELETRODO ÍON-SELETIVO DE PASTA DE CARBONO PARA DETERMINAÇÃO DE COBRE BASEADO EM UM NOVO *LARIAT*-ÉTER COROA
Rômulo A. L. de Campos (PG), Priscilla M. da Rocha Santos(IC), Sherlan G. Lemos (PQ), Valberes B. do Nascimento(PQ) e Mônica F. Belian(PQ)
- SB06..... 1117**
CARACTERIZAÇÃO DO ELETRODO MODIFICADO COM O FILME $\text{SiIPy}^+\text{Cl}^-/\text{NiTsPc}^4$ E APLICAÇÃO NA QUANTIFICAÇÃO ELETROANALÍTICA DE NITRITOS E SULFITOS
Rodolfo T. Ferreira, Cleveson Siqueira Santos, Sérgio T. Fujiwara, Karen Wohnrath, Jarem R. Garcia, Christiana Andrade Pessoa
- SB07..... 1120**
DEPOSIÇÃO ELETROFORÉTICA DE FILMES LACASE/AMIDO EMPREGADOS NA QUANTIFICAÇÃO DE DOPAMINA
José Luiz Bott Neto , Luiz Henrique Dall'Antonia
- SB08..... 1123**
SENSOR PARA ÓXIDO NÍTRICO OBTIDO PELA MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE OURO COM MESO-METALOPORFIRINA DE COBRE DERIVADA DO LÍQUIDO DA CASTANHA DO CAJU
Vanessa N. dos Santos, Janaína L. Leitinho, Naiara H. Falcão, Túlio I. S. Oliveira, Adriana N. Correia, Selma E. Mazzetto, Pedro de Lima-Neto
- SB10..... 1126**
NOVO SENSOR COM ESPÉCIE SUPRAMOLECULAR PARA A DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DO PARACETAMOL
Monize Martins da Silva, Alzir Azevedo Batista, Andre Luiz Bogado² e Luis Rogério Dinelli²
- SB12..... 1129**
DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DE H_2O_2 UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE Pt PELA TÉCNICA LbL
Dhésmon Lima, Clíciane Guadalupe de Jesus, Monalisa dos Santos, Vagner dos Santos, Karen Wohnrath, Christiana Andrade Pessoa
- SB13..... 1132**
BIOSSENSOR À BASE DE NANOTUBOS DE HALOISITA, LÍQUIDO IÔNICO E NANOPARTÍCULAS DE PLATINA
Daniela Brondani, Iolanda C. Vieira, Jairton Dupont² e Carla W. Scheeren

- SB14..... 1135**
SENSOR BIOINSPIRADO NA GLUTATIONA PEROXIDASE PARA DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
Eduardo Zapp, Iolanda Cruz Vieira, Vanessa Nascimento, Daniel Dambrowski e Antonio Luis Braga
- SB15..... 1138**
ESTUDO ELETROQUÍMICO DA INTERAÇÃO DO CITOCROMO C EM COMPÓSITOS COM LÍQUIDO IÔNICO E FELTROS COM NANOTUBOS DE CARBONO
Leonardo T. Silveira, Elaine Y. Matsubara, José Maurício Rosolen, Roberto M. Torresi, Susana I. Córdoba de Torresi
- SB16..... 1141**
ELETRODOS IMPRESSOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PLATINA PARA A DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE DAPSONA
Fabio R. Caetano, Ava Gevaerd, Aldo J.G. Zarbin, Márcio F. Bergamini¹ e Luiz H. Marcolino-Jr
- SB17..... 1144**
DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS MODIFICADOS COM FILMES *LbL* DE FTALOCIANINA TETRASSULFONADA DE NÍQUEL E POLIELETRÓLITO SILSESQUIOXANO
Cleverson S. Santos, Rodolfo T. Ferreira, João Paulo Winiarski, Vagner dos Santos, Sergio T. Fujiwara, Karen Wohnrath, Christiana A. Pessoa
- SB18..... 1147**
CINÉTICA DE TRANSFERÊNCIA ELETRÔNICA DIRETA E MEDIADA DA ENZIMA HRP SOBRE DIFERENTES MATERIAIS NANOESTRUTURADOS
Saimom Moraes Silva, Delton Martins Pimentel, Rita de Cássia Silva Luz,, Wallans Torres Pio dos Santos¹ (PQ) Lauro Tatsuo Kubota,, Flávio Santos Damos
- SB19..... 1150**
ÁCIDO FERÚLICO: UM NOVO MEDIADOR REDOX PARA OXIDAÇÃO ELETROCATALÍTICA DE NADH
Wilson C. Silva, Phabyanno R. Lima,, Francisco A. S. Silva,, Cleylton B. Lopes,, Erivaldo O. Costa, Lauro T. Kubota, Marília O. F. Goulart,

- SB20..... 1153**
APLICAÇÃO DA RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE (SPR) NO ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA CHAGASI* SOBRE MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS
Dênio E. P. Souto, Jussara V. Silva, Helen R. Martins, Alexandre B. Reis, Rita C. S. Luz,, Lauro T. Kubota, Flávio S. Damos
- SB21 1156**
ANÁLISE VOLTAMÉTRICA DE CAPTOPRIL UTILIZANDO ELETRODO DE PLATINA MODIFICADO COM HEXACIANO FERRATO II DE FERRO III
Izabel C. Eleotério, Marco A. Balbino, Matheus M. T. de Menezes, Marcelo F. de Oliveira
- SB22..... 1159**
ELETRODOS MODIFICADOS COM COMPÓSITO ARGILA/NÍQUEL COLOIDAL COMO SENSOR DE URÉIA
Cícero V. Nunes Junior (PG), Marins Danczuk(PG), Hélcio Marcos Vileski(PG), Fauze J. Anaissi (PQ)
- SB23..... 1162**
ELETRODOS MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS
Paulo Roberto de Oliveira (PG), Marcela M. Oliveira (PQ), Aldo J. G. Zarbin (PQ), Luiz H. Marcolino Jr. (PQ), Marcio F. Bergamini (PQ)
- SB24..... 1165**
ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DE FILMES LbL CONTENDO POLIELETRÓLITOS INORGÂNICOS E GOMA NATURAL DO CAJUEIRO
Rolf de Campos Intema, Carla Eiras, Karen Wohnrath, Christiana A. Pessoa
- SB25..... 1168**
CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DE ELETRODOS MODIFICADOS COM DIFERENTES MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA
Rosana Mossanha, Christiana Andrade Pessoa
- SB26..... 1171**
DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO UTILIZANDO SENSORES DE PASTA DE NANOTUBOS DE CARBONO E AZUL DA PRÚSSIA – ESTUDO DE EFEITO DE INTERFERENTES E ESTABILIDADE EM DIFERENTES pHs
Samantha Husmann, Aldo J. G. Zarbin

- SB27..... 1174**
DETERMINAÇÃO DE BUTILHIDROXIANISOL (BHA) EM ALIMENTOS POR SWV UTILIZANDO UM ELETRODO COMPÓSITO DE CARBONO MODIFICADO COM $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$
Heloizy G. Freitas, Orlando Fatibello-Filho
- SB28..... 1177**
OXIDACIÓN ELECTROQUÍMICA DE SULFITO EN DISOLUCIÓN ACUOSA MEDIADA POR ELECTRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO CON POLI- TETRATIENIL PORFIRINA Co(II) .
 Jorge H. Vélez, María Jesús Aguirre, María Angélica del Valle
- SB29..... 1180**
BIOSSENSOR A BASE DE LACASE IMOBILIZADA SOBRE NANOTUBO DE CARBONO OXIDADO MODIFICADO COM AZUL DE MELDOLA PARA A DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
Arnaldo César Pereira, (PQ), Cesar Ricardo Teixeira Tarley, Nelson Durán (PQ) e Lauro Tatsuo Kubota (PQ)
- SB30..... 1183**
BIOSSENSOR UTILIZANDO FILMES LbL COM NANOPARTÍCULAS DE PLATINA PARA DETECÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
Monalisa dos Santos, Vagner dos Santos, Andressa Galli, Sergio T. Fujiwara, Jarem Raul Garcia, Cliciane G. de Jesus, Valtecir Zucolotto, Christiana A. Pessoa, Karen Wohnrath¹
- SB31..... 1186**
FILMES LbL COM NANOPARTÍCULAS DE PLATINA UTILIZADOS NA DETECÇÃO DE DOPAMINA EM MEIO À INTERFERENTES
Vagner dos Santos, Monalisa dos Santos, Andressa Galli, Sergio T. Fujiwara, Jarem Raul Garcia, Cleverson S. Santos, Valtecir Zucolotto, Christiana A. Pessoa, Karen Wohnrath¹
- SB32..... 1189**
INFLUÊNCIA DO SOLVENTE NA ETAPA DE ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO COMPLEXO Ni(II) -EMHBM
Yuri A. Oliveira (IC), Cibely S. Martin (PG), Marcos F. S. Teixeira (PQ)
- SB33..... 1192**
ELETRODEPOSIÇÃO DO HÍBRIDO POLIPIRROL-NANOTUBOS DE CARBONO NA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE E SUA APLICAÇÃO COMO BIOSSENSOR PARA CATECOLAMINAS
Heloisa V. Galesco, Ivana Cesarino, Fernando C. Moraes, Sergio A.S. Machado

- SB34..... 1195**
EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS DE NÍQUEL NA CONSTRUÇÃO DE UM SENSOR AMPEROMÉTRICO PARA PERÓXIDO EM MEIO ALCALINO
Amábile de C. Muller, Eduardo G. C. Neiva, Aldo J. G. Zarbin, Marcio F. Bergamini, Luiz H. Marcolino Jr
- SB35..... 1198**
CONSTRUÇÃO DE UM SENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE HIDRAZINA EM BAIXO POTENCIAL DE OXIDAÇÃO A BASE DE NANOTUBOS DE CARBONO E FTALOCIANINA DE COLBALTO
Ana Beatriz Ferreira Vitoreti, Flávio Santos Damos, Rita de Cássia Luz
- SB36..... 1201**
APLICAÇÃO DE ELETRODO COMPÓSITO À BASE DE NANOTUBOS DE CARBONO E BORRACHA DE SILICONE NA DETERMINAÇÃO DE HIDROCLOROTIAZIDA
Sidney Xavier dos Santos (PG), Priscila Cervini (PQ), Éder Tadeu Gomes Cavalheiro (PQ)
- SB37..... 1204**
APLICAÇÃO DE UM ELETRODO COMPÓSITO IMPRESSO À BASE DE GRAFITE E POLIURETANA NA DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL
Thalita Rocha Saciloto (PG), Priscila Cervini (PQ), Éder Tadeu Gomes Cavalheiro(PQ)
- SB38..... 1207**
OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS GEOMÉTRICOS EM ELETRODOS COMPÓSITOS IMPRESSOS DESCARTÁVEIS À BASE DE GRAFITE E POLIURETANA
Fellipy Ferreira (IC), Thalita Rocha Saciloto (PG), Priscila Cervini (PQ), Éder Tadeu Gomes Cavalheiro (PQ)
- SB39..... 1210**
DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA EMPREGANDO BIOSSENSOR ENZIMÁTICO BASEADO EM NANOTUBO DE CARBONO MULTI PAREDE E EXTRATO BRUTO DE ABOBRINHA
Fabíola Araújo S. Ribeiro, Arnaldo César Pereira(PQ)
- SB40..... 1213**
SENSOR PARA DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE H₂O₂ BASEADO EM FILMES LbL DE POLIETRÓLITO SILSESQUIOXANO
Cliciane G. de Jesus, Sérgio T. Fujiwara, Valtencir Zucolotto, Karen Wonhrath¹ e Christiana A. Pessoa

- SB41..... 1216**
ELETRODO MODIFICADO COM COMPÓSITO LAPONITA/CoO(OH)
UTILIZADO NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO
Joslaine Jacumazo (IC), Marins Danczuk (PG), Fauze J. Anaissi (PQ).
- SB42..... 1219**
MODIFICAÇÃO DE ELETRODO DE OURO COM SÍLICA GEL
E NANOPARTÍCULAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE
IMUNOSSENSOR NANOESTRUTURADO
Joseane Aparecida Carvalho, Marlene de Barros Coelho e Valdir Souza Ferreira
- SB43..... 1222**
APLICAÇÃO DO MATERIAL HÍBRIDO SiO₂/SiDIEN IMPRESSO
IONICAMENTE NA DETERMINAÇÃO DE ÍONS CU(II)
Paulo Cesar Mendes Villis, Jose Roberto Barion Filho, Gustavo Silveira, Andréia de Moraes, Ariadne Missono Brondi, Pedro Orival Luccas, Fábio Luiz Pissetti, Alzira Maria Serpa Lucho, Yoshitaka Gushikem
- SB44..... 1225**
O EFEITO DO pH NA ELETROOXIDAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS USANDO ELETRODOS DE DNDB
Adriana F. Azevedo*, Fernando A. Souza, Neidenêi G. Ferreira
- SB45..... 1228**
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE Cu(II) UTILIZANDO ELETRODO DE OURO
MODIFICADO COM PEPTÍDEO DA PROTEÍNA PRÍON
Jonatas G. da Silva, Thiago V. de Freitas, Luciano P. Silva, Jurandir R. de Souza, Marcelo P. Bemquerer e Clarissa S. Pires de Castro
- SB46..... 1231**
DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO
PARA DETECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS β-LACTÂMICOS, VISANDO
APLICAÇÃO EM LEITE DE VACA CRÚ
Thiago Martiniano do Prado (PG) e Maria D.P.T. Sotomayor (PQ).
- SB47..... 1234**
DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA GLICOSE BASEADO EM
FILMES ELETRODEPOSITADOS DE POLIPIRROL
Dafne Pires Pinto, Robson Pacheco Pereira e Ana Maria Rocco

- SB48..... 1237**
CONSTRUÇÃO DE UMA PLATAFORMA FUNCIONAL PARA COMPLEXAÇÃO DE ÍONS COBRE VISANDO À DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE CISTEÍNA
Cecília de Carvalho Castro e Silva, Murilo Santhiago, Cátia Crispilho Corrêa, Márcia Cristina Breitzkreitz, Ronei Jesus Poppi e Lauro Tatsuo Kubota
- SB49..... 1240**
ESTUDO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA DA ACETILCOLINESTERASE EM SOLUÇÃO E AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBIDOR POR CARBARIL E PARATION
Livia Flório Sgobbi e Sergio Antonio Spinola Machado
- SB50..... 1243**
DESENVOLVIMENTO DE SENSOR BIOMIMÉTICO PARA DETECÇÃO DO HERBICIDA ,4-D
Ademar Wong (PG) e Maria Del Pilar Taboada Sotomayor (PQ)
- SB51..... 1246**
EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO EM SENSOR BIOMIMÉTICO PARA DETERMINAÇÃO DO HERBICIDA ,4-D
Ademar Wong^{1*}, Rosa Fireman Dutra² e Maria Del Pilar Taboada Sotomayor¹
- SB52..... 1249**
DETERMINAÇÃO DE ÍONS COBRE EM CACHAÇA UTILIZANDO ELETRODO CARBONO CERÂMICO AMINOFUNCIONALIZADO
Alzira Maria Serpa Lucho, Aline Evangelista Aguiar, Karina Lopes Dornelas, Fábio Luiz Pissetti, Ariadne Missono Brondi, Andréia de Moraes, Camila Maroneze e Yoshitaka Gushikem
- SB53..... 1252**
BIOSSENSOR DE TERCEIRA GERAÇÃO BASEADO EM UM ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO E TIROSINASE
Bruno C. Janegitz, Roberta A. Medeiros, Romeu C. Rocha-Filho e Orlando Fatibello-Filho
- SB54..... 1255**
SEPARAÇÃO E DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DOPAMINA EM DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO À BASE DE PAPEL
Murilo Santhiago, Leandro Y. Shiroma, Wilney J. R. Santos, Angelo L. Gobbi, Lauro T. Kubota

SB55..... 1258

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS BASEADA NO
DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS
EMPREGANDO MATERIAIS DE CARBONO NANOESTRUTURADOS**

Mayara Brezolini Rocha, Arnaldo César Pereira

SB57..... 1261

**MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS BINÁRIAS: UMA NOVA
ESTRATÉGIA PARA AUMENTAR SENSIBILIDADE EM BIOSSENSORES
AMPEROMÉTRICOS**

Cancino, J., Razzino, C., Zucolotto, V. e Machado, S.A.S

SB58..... 1264

**AVALIAÇÃO DO ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO
MODIFICADO COM PbO₂ PELO MÉTODO SOL-GEL NA ANÁLISE DE
CARBARIL**

Milena Elias Teixeira, Ivana Cesarino, Sergio A.S. Machado

SB59..... 1267

**EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS DE RUTÊNIO NA MODIFICAÇÃO
DE ELETRODOS IMPRESSOS PARA A DETERMINAÇÃO DE
DOPAMINA**

Viviane Gomes Bonifacio, Eduardo H. Bindewald, Eduardo C. Neiva, Aldo J. G. Zarbin, Márcio F. Bergamini, Luiz H. Marcolino-Junior e Orlando-Fatibello-Filho

SB60..... 1270

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO À BASE DE
EXTRATO DO LICOR DE ACAÍ (*EUTERPE OLERACEAE* MART.) PARA
DETECÇÃO DE COMPOSTOS FENOLICOS**

Maricely J.U. Toro (PG) e Maria D.P.T. Sotomayor (PQ)

SB61..... 1273

**DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR POTENCIOMÉTRICO À BASE
DE NANOTUBOS DE CARBONO MODIFICADOS COM H₂TSP PARA A
DETERMINAÇÃO DE COBRE**

Saimon Moraes Silva, Dilton Martins Pimentel, Fernando Roberto Figueirêdo Leite, Lauro Tatsuo Kubota, Flávio Santos Damos e Rita de Cássia Silva Luz

SB62..... 1276

**DEGRADAÇÃO ELETROQUÍMICA DO DESREGULADOR ENDÓCRINO
METIL PARABENO EM ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM
BORO**

Juliana R. Steter, Dawany Dionísio, Robson S. Rocha, Douglas W. Miwa, Marcos R.V. Lanza e Artur J. Motheo

SB63..... 1279

IMPEDIMETRIC BIOSENSOR BASED GOLD NANOPARTICLES AND CRAMOLL LECTIN FOR BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE

Maria D.L. Oliveira^{1*}, Cesar A.S. Andrade, Maria T.S. Correia, Luana C.B.B. Coelho, Pankaj R. Singh, Xiangqun Zeng

SB64..... 1282

AN IMPEDIMETRIC BIOSENSOR FOR DETECTION OF DENGUE SEROTYPE AT PICOMOLAR CONCENTRATION BASED ON GOLD NANOPARTICLES-POLYANILINE HYBRID COMPOSITES

Maria D.L. Oliveira, Helena P.O. Nascimento, Celso P. de Melo, Gilcelia J.L. Silva, Marli T. Cordeiro, Cesar A.S. Andrade

SB65..... 1286

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR BIENZIMÁTICO IMOBILIZADO SOBRE MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES EM ALIMENTOS

Andressa Galli e Sergio Antonio Spinola Machado

SB66..... 1289

BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO A BASE DE DNA SOBRE NANOTUBO DE CARBONO PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACO PSICOTRÓPICO (ANTIPSIÓTICO E ANTIDEPRESSIVO)

João Paulo Marco, Arnaldo César Pereira

SB67..... 1292

SENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETECÇÕES DE DOENÇAS INFECCIOSAS, UTILIZANDO SONDAS DE DNA SOBRE MATRIZ POLIMÉRICA DE POLI(3-AMINOFENOL)

Luciano Pereira Rodrigues, Diego Leoni Franco, Ana Graci Brito-Madurro, João Marcos Madurro

SB68..... 1295

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO SOBRE ELETRODO DE GRAFITE PIROLÍTICO MODIFICADO COM CoPc

Ana Paula Mota Ferreira (PG), Ana Caroline F. Santos (IC), Gláucia Tinoco Corrêa (IC), Sônia Maria Carvalho Neiva Tanaka (PQ), Lauro Tatsuo Kubota (PQ), Auro Atsushi Tanaka (PQ)

- SB69..... 1298**
AVALIAÇÃO DE UM ELETRODO MODIFICADO COM FILME DE POLI-1-AMINONAFTALENO PARA A DETERMINAÇÃO DE NORADRENALINA EM AMOSTRA FARMACÊUTICA
 Ronaldo C. Faria, Sônia Maria C. N. Tanaka, Auro A. Tanaka, Estela P. Troiane, Gláucia Tinoco Corrêa (IC) e Quésia Guedes da Silva
- SB70..... 1301**
BIOELETRODO BASEADO EM MATRIZ FTO/POLI(3-AMINOFENOL) PARA DETECÇÃO DE LESÃO CARDÍACA
Luciano P. Rodrigues, Lucas F. de Paula, Lucas F. Ferreira, Adamo F. G. do Monte, Ana G. B. Madurro, João M. Madurro
- SB71 1304**
BASE DE CARBONO CERÂMICO MODIFICADO COM FTALOCIANINA DE NÍQUEL
 Márcio Luiz Módolo (PG), Gabriel Kozahoski de Toledo (IC), Eryza Guimarães Castro (PQ) Cristiane Andrade Pessoa (PQ), Sérgio Toshio Fujiwara (PQ)
- SB72..... 1307**
DETECTING HYDROGEN PEROXIDE RELEASE FROM MACROPHAGES USING MICROPATTERNED ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS
 Jun Yan,¹ Valber A. Pedrosa, Aleksandr L. Simonian and Alexander Revzin
- SB73..... 1310**
POLYPYRROLE/PHTYASE AMPEROMETRIC BIOSENSORS FOR THE DETERMINATION OF PHYTIC ACID IN STANDARD SOLUTIONS
 Valquíria da Cruz Rodrigues, Marli Leite de Moraes, André Briosolari, Juliana Coatrini Soares, Marystela Ferreira, Débora Gonçalves
- SB74..... 1313**
NANOTUBOS DE CARBONO MODIFICADO COM FILME DE RuOHCF PARA A DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
Roselyn C. Peña e Mauro Bertotti
- SB75..... 1316**
PREPARAÇÃO E APLICAÇÃO DA P-BENZOQUINONA IMOBILIZADA EM UM ELETRODO MODIFICADO CA/TiO₂/Sb₂O₅ PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO
Andrea Anilda Hoffmann da Rocha, Silvio Luis Pereira Dias, Jacqueline Arguello e Elisângela Pires Bueno e Lauro Tatsuo Kubota

- SB76..... 1319**
SENSOR BIOMIMÉTICO DESCARTÁVEL PARA DETERMINAÇÃO SELETIVA DE HIDROQUINONA
Thayz Cristina Boni (PG) e Maria Del Pilar T. Sotomayor (PQ)
- SB77..... 1322**
ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF DOPAMINE BASED ON SELF-ASSEMBLED PEPTIDE NANOSTRUCTURE
Iorquirene de Oliveira Matos, Wendel Andrade Alves
- SB79..... 1325**
DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA POR ONDA QUADRADA (SWV) DE PROPRANOLOL UTILIZANDO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM PAH/MWCNTs
Geiser Gabriel de Oliveira, Elen Romão Sartori, Orlando Fatibello-Filho
- SB81..... 1328**
COMPÓSITO FC/PAni: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO COMO SENSOR DE GÁS
Carla Polo Fonseca, Dalva A. L. Almeida, Maurico Baldan e Neidenei Ferreira
- SB83..... 1331**
CARACTERIZAÇÃO DE ELETRÓLITO SÓLIDO PARA APLICAÇÃO EM DISPOSITIVOS ELETROCRÔMICOS
Silvio C. de Oliveira, Dante A. A. de Mello, Márcio R. S. Oliveira, Lincoln C. S. de Oliveira
- SB84..... 1334**
ELECTROCHEMICAL SENSOR BASED ON IMPRINTED SOL-GEL AND NANOMATERIALS FOR SENSITIVE DETERMINATION OF CAFFEINE
Wilney de J. R. Santos, Murilo Santhiago, Inez V. P. Yoshida e Lauro T. Kubota
- SB85..... 1337**
SINERGISMO ENTRE POLI(5-AMINO 1-NAFTOL) E AZUL DA PRÚSSIA NA ELABORAÇÃO DE SENSORES PARA H₂O₂
Elaine Pavini Cintra, Denis Gabriel Blanco Limachi, Vinicius Romero Gonzalez e Susana Inês Córdoba de Torresi
- SB86..... 1340**
DETERMINAÇÃO DE L-GLUTATIONA EM ERITRÓCITOS HUMANOS EMPREGANDO UM ELETRODO MODIFICADO COM O COMPLEXO CoTsPc/FeT4MPyP SOB NANOTUBOS DE CARBONO
Ananda X. Oliveira, Fernando R. F. Leite, Jussara V. Silva, Lauro T. Kubota, Wallans T. P. dos Santos, Flávio S. Damos, Rita C. S. Luz

SB87..... 1343

**AVALIAÇÃO DE UM ELETRODO COMPÓSITO PARA
DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS**

Francielle Calegari (IC), Lismery Pereira de Souza (IC), Ronilson Vasconcelos Barbosa (PQ),
Luiz Humberto Marcolino Júnior (PQ), Marcio Fernando Bergamini (PQ)

SB88..... 1346

**DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO À BASE DE PAPEL COM
DETECÇÃO ELETROQUÍMICA SEQUENCIAL DE PARACETAMOL E
4-AMINOFENOL**

Leandro Y. Shiroma, Murilo Santhiago, Ângelo Luiz Gobbi,
Lauro T. Kubota

SB89..... 1349

**DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR SELETIVO E CATALÍTICO
PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE DOPAMINA E NADH
EMPREGANDO SAMs MISTAS.**

Ana Luísa A. Lage (IC), Danielle D. Justino (IC), Rita de Cássia S. Luz, (PQ),
Lauro T. Kubota, (PQ) e Flavio S. Damos, (PQ)

SB91..... 1352

**DETERMINAÇÃO DE GLICEROL EM BIODIESEL UTILIZANDO
MICROELETRODOS DE COBRE**

Luiza M.F. Dantas, Pollyana S. Castro, Ana P.R. de Souza, Thiago R.L.C. Paixão¹ e Mauro
Bertotti

SB93..... 1355

**NANOESTRUTURAS PEPTÍDICAS FUNCIONALIZADAS COM ÁCIDO
1-PIRENO BUTÍRICO VISANDO POTENCIAL APLICAÇÃO EM
BIOSENSORES**

Camila Pinheiro Sousa, Wendel Andrade Alves

SB96..... 1358

**DESENVOLVIMENTO SENSOR BIOMIMÉTICO PARA ANÁLISE
DE „6-TRICLORO-2-PIRIDINOL O PRINCIPAL METABOLITO DO
CLORPIRIFÓS**

André Luiz dos Santos (PG). Eduardo Carneiro Figueira (PG) e Maria Del Pilar Taboada
Sotomayor (PQ)

SB98..... 1361

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR AMPEROMÉTRICO À BASE DE
PASTA DE CARBONO MODIFICADA COM FTALOCIANINA METÁLICA
PARA DETERMINAÇÃO DE METRIBUZIM**

Eduardo C. Figueira (PG) e Maria D.P.T. Sotomayor (PQ)

SB99..... 1364

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA POR ONDA QUADRADA DE
METOTREXATO EM FÁRMACOS UTILIZANDO ELETRODO DE
DIAMANTE DOPADO COM BORO**

Déborah Christine Azzi, Geiser Gabriel de Oliveira, Romeu C. Rocha-Filho e Orlando Fatibello-Filho

DETERMINAÇÃO DIRETA E SIMULTÂNEA DE CÁDMIO E CHUMBO EM BIODIESEL POR VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA NO MODO PULSO DIFERENCIAL USANDO ELETRODO DE FILME DE BISMUTO

Myrna B. Guimarães¹, Edmar P. Marques¹, Ricardo Aucélio² Aldaléa L. B. Marques¹

¹Universidade Federal do Maranhão - UFMA, São Luís - MA - Brasil; ²Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ), myrna_qi@yahoo.com.br, aldalea.ufma@hotmail.com

RESUMO: Este trabalho apresenta um procedimento simples envolvendo a DPASV com BiFE, para determinar metais em Biodiesel sem tratamento prévio. As amostras foram diluídas em uma solução de tampão acetato-etanol. Após experimentos voltamétricos, obteve-se as condições ideais para a determinação simultânea de cádmio e chumbo: $E_{dep} = -1,4 V$; $t_{pré} = 180 s$; $v = 25 mV.s^{-1}$; $Amp = 50 mV$. Os voltamogramas e suas curvas de adição-padrão indicaram que o procedimento é sensível para a determinação de metais-traço em Biodiesel, proporcionando uma resposta linear da corrente de pico com a concentração dos metais. Obteve-se bons limites de detecção para Cd^{2+} ($1,71 \times 10^{-8} mol.L^{-1}$) e Pb^{2+} ($1,92 \times 10^{-9} mol.L^{-1}$). A exatidão foi avaliada através do teste de recuperação (recuperações de 87,3% a 107,9%). A precisão, foi menor que 7% para Cd^{2+} e menor que 12% para Pb^{2+} . O método foi aplicado para quatro tipos de amostras de biodiesel e analisadas em triplicata.

Palavras-chave: Biodiesel, BiFE, metais-traço, determinação simultânea, voltametria de redissolução.

INTRODUÇÃO

A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível (ANP) é responsável pelo monitoramento da qualidade dos combustíveis no Brasil através do Programa PMQC (Programa de Monitoramento da Qualidade de Combustíveis). Dentro deste programa, além dos derivados de petróleo, são analisados, regularmente, os biocombustíveis, etanol e biodiesel [1].

Mesmo não fazendo parte das especificações do Biodiesel, a presença de metais pesados, e a sua determinação a nível de traços, já é bastante reconhecido como sendo um aspecto importante para avaliar a qualidade dos biocombustíveis. A presença destes elementos pode afetar a qualidade do biodiesel promovendo, principalmente, sua oxidação [2,3], corrosão e entupimento em motores, além de causar riscos à saúde humana e ao meio ambiente.

A presença de metais em biodiesel é devido à absorção destes contaminantes do solo pela própria planta (matéria-prima), e/ou podem ser incorporados durante o processo de produção, estocagem ou armazenamento, a partir dos materiais dos tanques e containers. Assim, a determinação de elementos metálicos é muito importante no controle da qualidade do biodiesel.

Um outro aspecto importante a ser considerado na determinação de elementos a nível de traços é o tratamento requerido para amostras complexas [3,4]. Geralmente, amostras como os biocombustíveis requerem um pré-tratamento oxidativo, para destruição da parte orgânica do material, cujo etapa deste processo pode introduzir erros, através da contaminação de brancos. No presente trabalho, um procedimento voltamétrico é proposto para determinação simultânea dos íons Cd^{2+} e Pb^{2+} em Biodiesel usando um eletrodo de filme de Bi, sendo as amostras simplesmente diluídas em meio alcóolico. O procedimento foi otimizado e aplicado em amostras reais de biodiesel.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Um analisador voltamétrico Autolab (Metrohm) modelo PGSTAT 302 foi usado em todos os experimentos voltamétricos. As medidas foram realizadas em célula de vidro pirex contendo três eletrodos: um eletrodo de carbono vítreo (eletrodo de trabalho), um fio de platina (eletrodo auxiliar) e um eletrodo de $Ag/AgCl$ (eletrodo de referência).

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico e procedência Merck, a água utilizada foi destilada e posteriormente deionizada a uma resistividade de $18,2 M\Omega.cm^{-1}$ em um sistema Nanopure Thermo Scientific, modelo D11901 (Barnstead, NH, EUA). Soluções estoque contendo $1000 mg.L^{-1}$ de Cd^{2+} e Pb^{2+} , foram preparadas pela diluição de ampolas de Titrisol de procedência Merck (Darmstad, Alemanha). Para obtenção do eletrodo de filme de bismuto, usou-se solução de nitrato de bismuto ($Bi(NO_3)_3$, $1000 mg.L^{-1}$). Outros reagentes usado, como álcool etílico, ácido acético e acetato de sódio foram de procedência Merck.

A desaeração (retirada de oxigênio) das soluções, para as medidas voltamétricas foi realizada empregando-se gás nitrogênio super seco de procedência White Martins, durante 20 minutos.

Para a preparação do filme de bismuto no modo *ex situ*, primeiramente obteve-se uma superfície limpa do eletrodo de carbono vítreo (GCE), através de polimento manual (*alumina* $0,3 \mu m$). Em seguida, o eletrodo foi lavado com água deionizada e submetido a um banho ultrassônico por 10 min, para a remoção de possíveis partículas alumina na

superfície do eletrodo. A deposição eletroquímica do BiFE foi realizada pela adição de 60 μL da solução padrão de Bi^{3+} 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ diluída a um volume final de 10 mL de solução tampão acetato 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 4,5), aplicando-se um potencial de deposição de -1,2 V, e utilizando-se agitação mecânica.

A aplicação do procedimento em amostras reais foi feita em amostra de biodiesel de babaçu, disponibilizada pelo Núcleo de Biodiesel da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Essas amostras foram procedentes de processos que utilizaram catálise alcalina. A preparação dessa amostra foi feita em uma composição álcool/tampão de 80/20%, preparada pela mistura de tampão acetato 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e álcool etílico e adição de 60 μL de biodiesel. Após a agitação, obteve-se uma solução clara e transparente. As proporções 50/50%, 60/40%, 70/30% álcool/tampão também foram testadas, mas observou-se que estas soluções apresentaram um aspecto turvo, indicando que não houve a solubilização do biodiesel. O pH desta solução foi ajustado para 2,0, utilizando-se ácido clorídrico 1,0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de obter resposta voltamétrica adequada e melhores condições experimentais, a influência de vários parâmetros foi avaliada [potencial de deposição (E_{dep}), tempo de pré-concentração ($t_{\text{pré}}$), velocidade de varredura (v), amplitude de pulso (Amp) e pH] para a determinação simultânea de Cd^{2+} e Pb^{2+} , usando BiFE preparado no modo *ex situ*. Este estudo foi realizado na mistura eletrolítica contendo 8,0 mL de álcool etílico em 2,0 mL tampão acetato 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (branco).

O estudo de otimização foi realizado no branco, variando-se um parâmetro de cada vez, e mantendo-se os demais constantes (otimização univariada). A Tabela 1 apresenta as melhores condições experimentais para a determinação simultânea de Cd^{2+} e Pb^{2+} (concentração final de $1,5 \times 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $5,0 \times 10^{-8}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente), através da técnica DPASV.

Tabela 1: Condições experimentais otimizadas para a determinação simultânea de Cd^{2+} e Pb^{2+} através da técnica DPASV.

Parâmetros	Especificações
pH	~2
Tempo de pré-concentração	180 s
Potencial inicial e final	-1,4 V e -0,2 V
Potencial de deposição	-1,4 V
Velocidade de varredura	25 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$
Amplitude de pulso	50 mV

Após otimização, os parâmetros escolhidos foram aplicados em amostras reais de Biodiesel. Para se certificar que os picos encontrados nas medidas voltamétricas eram dos metais, adicionou-se sucessivas alíquotas de padrão metálico, correspondentes a $1,5 \times 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cd^{2+} e $5,0 \times 10^{-8}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Pb^{2+} , proporcionando um aumento linear entre a corrente do pico e a concentração dos metais. Todas as medidas foram feitas em triplicatas, onde eram calculadas as médias das correntes, as quais eram plotadas versus as concentrações dos metais, nas curvas analíticas de adição padrão.

A Figura 1A mostra dois picos em potenciais em torno de -0.85 e -0.62 V na amostra de biodiesel, atribuída ao Cd^{2+} e Pb^{2+} , respectivamente. À medida que se adicionava alíquotas dos metais, o pico aumentava, obtendo-se, assim, curvas analíticas correspondentes (Figura 1B e 1C).

Através das curvas analíticas de adição padrão mostradas, pode-se ver que a resposta analítica é bastante satisfatória para os metais, principalmente considerando-se a linearidade observada entre a corrente de pico e a concentração dos metais, na faixa de concentração estudada, conforme apresentado na Tabela 2.

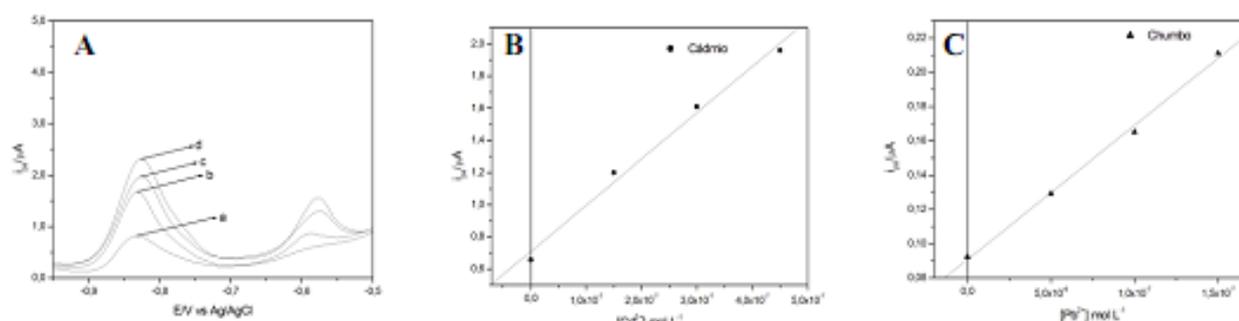


Figura 1: (A) Resposta voltamétrica na determinação simultânea dos metais Cd^{2+} e Pb^{2+} , utilizando DPASV em amostras de biodiesel. Condições experimentais: Eletrolito suporte: 2,0 mL tampão acetato 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 8,0 mL álcool etílico; pH = 2,0. [Metais]: (a) amostra; (b) $1,5 \times 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cd^{2+} e $5,0 \times 10^{-8}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Pb^{2+} ; (c) $3,0 \times 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

de Cd^{2+} e $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de Pb^{2+} e (d) $4,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de Cd^{2+} e $1,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de Pb^{2+} . $E_{\text{dep}} = -1,4 \text{ V}$; $t_{\text{pré}} = 180 \text{ s}$; $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$; $\text{Amp} = 50 \text{ mV}$. (B) Curva analítica referente ao metal Cd^{2+} . (C) Curva analítica referente ao metal Pb^{2+} .

Tabela 2: Avaliação estatísticas dos parâmetros de mérito, para a determinação simultânea de Cd^{2+} e Pb^{2+} através da técnica DPASV.

Amostra de Biodiesel	Cd^{2+}	Pb^{2+}
X, média	$2,28 \times 10^{-7}$	$7,56 \times 10^{-9}$
SD	$1,57 \times 10^{-8}$	$8,75 \times 10^{-10}$
CV (%)	6,88	11,58
R	0,9949	0,9983
μ (95%)	$2,28 \times 10^{-7} \pm 3,90 \times 10^{-8}$	$7,56 \times 10^{-9} \pm 2,17 \times 10^{-9}$

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados considerando-se o desvio padrão e o coeficiente angular da curva analítica do branco. Foram encontrados valores para o LD de $1,71 \times 10^{-8}$ e $1,92 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e valores para o LQ de $5,70 \times 10^{-8}$ e $6,39 \times 10^{-9}$, para Cd^{2+} e Pb^{2+} , respectivamente, os quais conferem uma boa sensibilidade para o procedimento proposto. A precisão foi avaliada através da repetibilidade, apresentando valores de coeficiente de variação de 6,88% e 11,58%, respectivamente, para os dois metais, Cd^{2+} e Pb^{2+} . Para avaliar a exatidão, foi adotado o teste de recuperação obtendo-se valores de 100,7% e 87,3%, para Cd^{2+} e Pb^{2+} , respectivamente.

CONCLUSÕES

Um procedimento simples, de determinação direta e simultânea dos ions Cd^{2+} e Pb^{2+} em amostras de biodiesel (B100) é proposto, com base na simples diluição da amostra em meio etanólico, usando eletrodo de filme de bismuto. O procedimento voltamétrico (DPASV) foi otimizado e os resultados obtidos apresentaram valores satisfatórios de exatidão e precisão, com limites de detecção de $1,71 \times 10^{-8}$ e $1,92 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ para Cd^{2+} e Pb^{2+} , respectivamente.

AGRADECIMENTOS:

CNPq (Projeto Casadinho, Processo 620089/2008-3) e CAPES (Projeto 211/2007-PROCAD)

REFERÊNCIAS

- [1] ANP - Agência Nacional do Petróleo (www.anp.gov.br, access: 12/12/2010)
- [2] M.R. Monteiro, A.R.P. Ambrozini, L.M. Lião, A.G. Ferreira. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. *Talanta*. 77: 593–605, 2008.
- [3] G. Knothe. Biodiesel and renewable diesel: A comparison *Progress in Energy and Combustion*. Science. 36: 364–373, 2010.
- [4] R.Q. Aucélio, A. Doyle, B.S. Pizzorno, M.L.B. Tristão, R.C. Campos. Electrothermal atomic absorption spectrometric method for the determination of vanadium in diesel and asphaltene prepared as detergentless microemulsions. *Microchemical Journal*. 78: 21–26, 2004.

DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE RANITIDINA UTILIZANDO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM ÓXIDO DE RUTÊNIO (III) HEXACIANOFERRATO

William Reis de Araujo¹ e Thiago Regis Longo, Cesar da Paixão^{1,2}

¹ Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André, SP, Brasil;

² Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

william_reis_araujo@hotmail.com

RESUMO: Um método em fluxo para a determinação quantitativa de ranitidina foi desenvolvido com base na oxidação electrocatalítica de ranitidina sobre superfície de carbono vítreo modificado pela deposição electroquímica de óxido de rutênio (III) hexacianoferrato. Sob as melhores condições experimentais, a corrente de pico aumentou linearmente com a concentração de ranitidina na faixa de 1,25-7,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O limite de detecção do método proposto foi estimado em 25 nmol L^{-1} ($S/N = 3$). O método analítico desenvolvido melhorou os parâmetros analíticos (como por exemplo, potencial de trabalho e limite de detecção) obtidos por outros métodos electroanalíticos para a quantificação da ranitidina. Adicionalmente, e visando avaliar a exatidão do método proposto, avaliou-se o teor de ranitidina em três amostras comerciais e os valores obtidos pelo método desenvolvido foram concordantes com os obtidos pelo método padrão (95 % de confiança, teste t de Student).

Palavras-chave: Ranitidina, eletrodos modificados, rutênio, análise por injeção em fluxo.

INTRODUÇÃO

Ranitidina ($\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$) é um fármaco antagonista dos receptores histamínicos H_2 e foi introduzida no mercado farmacêutico em 1981. A ranitidina tem sido amplamente utilizada no tratamento da úlcera duodenal, úlcera gástrica benigna, esofagite péptica e outras desordens gástricas, agindo como um anti-ácido gástrico e reduzindo a produção de pepsina. A prescrição deste medicamento, na maioria dos casos, é considerada segura. No entanto, existem alguns casos na literatura associando o uso de ranitidina com grave hepatotoxicidade [1]. Recentemente, alguns autores também descreveram um caso de hepatite induzida pelo uso de ranitidina [2]. Considerando que estes efeitos colaterais podem ser causados principalmente por altas doses, métodos analíticos para quantificação desse princípio ativo são necessários. Na literatura, existem diferentes métodos para quantificação de ranitidina utilizando diferentes técnicas: espectrofotometria, fluorimetria, quimioluminescência, espectrometria e electroquímica. A maioria dos métodos reportados na literatura requerem uma etapa preliminar de preparação da amostra ou derivatização do analito, o que resulta em um maior tempo de análise. Com relação aos métodos electroquímicos para a quantificação de ranitidina, esses estão baseados em técnicas potenciométricas, voltamétricas e amperométricas. Para estas duas últimas técnicas, o eletrodo de trabalho mais utilizado apresenta Hg em sua composição (filmes ou eletrodo gotejante de mercúrio). Outros trabalhos relatam a utilização de superfícies electródicas não modificadas para quantificação de ranitidina, por exemplo, carbono vítreo. No entanto, a ranitidina apresenta um elevado potencial de oxidação nessa superfície, que dependendo da complexidade da amostra, pode resultar em resultados inexatos. Assim, um interessante campo de pesquisa seria avaliar a possibilidade de utilização de eletrodos modificados visando à quantificação de ranitidina em potenciais inferiores aos reportados pelas superfícies electródicas não modificadas. Com isso, o presente trabalho apresenta um método analítico alternativo, rápido, preciso e exato para a quantificação de ranitidina em formulações farmacêuticas usando um eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de rutênio (III) hexacianoferrato (RuOHCF) como detector amperométrico em sistema de análise por injeção em fluxo (FIA).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Materiais e Soluções. Todos os reagentes sólidos foram de grau analítico e foram utilizados sem purificação prévia, sendo que os mesmos foram oriundos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A ranitidina foi adquirida da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As soluções foram preparadas pela dissolução dos reagentes em água desionizada, que foi processada através de um sistema de purificação de água (Direct-Q 5 Ultrapure Water Systems, Millipore, EUA). As formulações farmacêuticas de ranitidina foram compradas em farmácias locais (Cloridrato de Ranitidina (Medley, Lote 100814458), Cloridrato de Ranitidina (Teuto, Lote 0074077) e Cloridrato de Ranitidina (EMS, lote 320893)). O único pré-tratamento das amostras foi a dissolução em solução contendo 0,5 mol L^{-1} de NaNO_3 + 0,05 mol L^{-1} de HCl.

Eletrodos e Instrumentação. Para as medidas electroquímicas utilizou-se um potenciostato $\mu\text{Autolab}$ (Eco Chemie, Holanda) com software de aquisição de dados disponibilizado pelo fabricante (GPES versão 4.9.007). Um sistema de três eletrodos: Ag / AgCl (KCl saturado), fio de platina e carbono vítreo foram utilizados como eletrodos de referência, auxiliar e trabalho, respectivamente. A superfície do eletrodo de trabalho foi polida com suspensão de alumina (0,3 μm , Alfa Aesar, Massachusetts, EUA) e lavada cuidadosamente com água desionizada antes das medições electroquímicas. As análises por injeção em fluxo foram realizadas utilizando uma bomba peristáltica e uma célula de acrílico montada em uma configuração "wall-jet" [3]. O eletrodo auxiliar utilizado nas medidas em fluxo foi um tubo de aço inoxidável.

Modificação da superfície do eletrodo. A eletrodeposição do filme de RuOHCF sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi realizada por repetidas varreduras nos limites de potenciais de -0,5 a 1,3 V e com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} em uma solução contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 + $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl + 1 mmol L^{-1} de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ + 1 mmol L^{-1} de RuCl_3 . A estabilidade do eletrodo modificado foi verificada por meio de varreduras voltamétricas sucessivas (15 ciclos) com o eletrodo modificado em solução de eletrólito suporte contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 + $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl nos mesmos limites de potencial utilizados no processo de modificação da superfície do eletrodo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra os voltamogramas cíclicos registrados na presença e ausência de ranitidina utilizando eletrodo de carbono vítreo sem (Figura 1A) e com a modificação da superfície eletrônica com RuOHCF (Figura 1B). Pode-se observar que com a superfície eletrônica modificada ocorreu a antecipação do processo de oxidação da ranitidina (aproximadamente $0,5 \text{ V}$), além do aumento da corrente de oxidação para a mesma concentração de ranitidina adicionada à célula eletroquímica quando comparado com o resultado obtido com o eletrodo de carbono vítreo sem modificação.

Verificada a potencialidade de se utilizar o eletrodo modificado, pensou-se em utilizar o mesmo como detector amperométrico em FIA. Com o intuito de obter as melhores características analíticas, estudos foram realizados para determinar os melhores parâmetros para a quantificação em fluxo. Os parâmetros avaliados foram o potencial aplicado ao eletrodo, a quantidade de material imobilizado na superfície do eletrodo, volume da amostra utilizado e a vazão da solução transportadora.

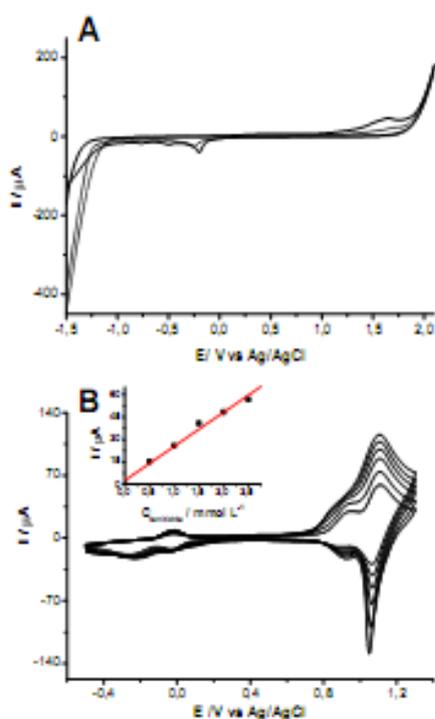


Figura 1 - Voltamogramas cíclicos registrados na presença (—) e ausência (---) de ranitidina com concentração final igual a 1 mmol L^{-1} utilizando eletrodo de carbono vítreo (A) e eletrodo de carbono vítreo modificado com RuOHCF (B). Para o eletrodo modificado adições sucessivas de $50 \mu\text{L}$ de ranitidina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram realizadas à célula eletroquímica com o intuito de avaliar a linearidade dos sinais de corrente de pico em função da concentração (quadro Figura 1B, $E = 1,1 \text{ V}$). Eletrolito de suporte: $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ NaNO_3 + $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ HCl e velocidade de varredura igual a 100 mV s^{-1} .

A oxidação da ranitidina no sistema em fluxo atingiu um máximo de corrente anódica em $1,1 \text{ V vs Ag /AgCl}$ e, sendo assim, este valor foi escolhido como o potencial de trabalho. O número de voltamogramas cíclicos utilizados na etapa de modificação foi otimizado em 50 ciclos, pois os sinais de corrente do processo de oxidação da ranitidina no sistema em fluxo diminuíram ao se utilizar mais do que 50 ciclos na etapa de modificação. Esse comportamento pode ser atribuído à dificuldade da ranitidina atingir os sítios catalíticos do filme de RuOHCF com o aumento da espessura do filme de RuOHCF.

Com relação à dependência da vazão da solução transportadora com o sinal de corrente para o processo de oxidação da ranitidina no eletrodo modificado, notou-se um aumento no valor da corrente de pico na faixa de vazão estudada ($1,11$ - $2,96 \text{ ml min}^{-1}$). Para nenhum dos valores estudados notou-se uma diminuição no sinal de corrente obtido, confirmando que o transporte de massa exerce um controle sobre o processo de transferência eletrônica e a reação heterogênea entre Ru (IV) e ranitidina é rápida. Por esta razão, a decisão para o valor de vazão da solução transportadora foi feita levando em consideração a vazão que resultou no maior sinal analítico dentro da faixa estudada ($2,96 \text{ mL min}^{-1}$). O efeito do volume de amostra também foi estudado. Um aumento no valor da altura do pico de corrente foi obtido com o aumento do volume

de amostra injetada (50-200 μL). Esse fato pode estar relacionado ao maior tempo de contato entre a zona de amostra e os sítios catalíticos do eletrodo modificado. Dessa forma, um volume de 200 μL foi escolhido devido ao aumento dos sinais analíticos. Nessas condições experimentais ótimas a frequência analítica obtida foi de 150 amostras por hora.

A repetibilidade do método foi investigada injetando-se 15 alíquotas de solução de ranitidina 3,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$, obtendo-se um desvio padrão relativo de 3,0 %. Com todos os parâmetros analíticos otimizados, uma curva analítica foi obtida pela injeção de diferentes concentrações de solução padrão de ranitidina (Figura 2).

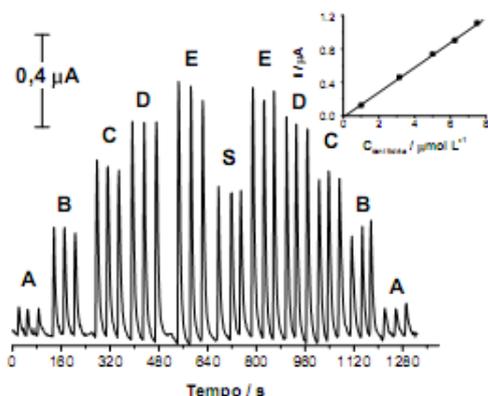


Figura 2. Sinais de corrente para injeções de soluções padrão de ranitidina (1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (A), 3,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (B), 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (C), 6,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (D) e 7,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E)) e uma amostra de formulação farmacêutica (S) obtidas em fluxo para as condições otimizadas. Solução transportadora: 0,5 mol L^{-1} de NaNO_3 + 0,05 mol L^{-1} de HCl , $E = 1,1 \text{ V}$.

Na Figura 2 nota-se a falta de efeito memória do sistema, que pode estar relacionado ao pequeno volume da amostra utilizado na configuração da célula eletroquímica. A curva de calibração gerada possui a seguinte regressão linear: $(I / \mu\text{A}) = 1,7 \times 10^{-8} + 0,1495 (C_{\text{ranitidina}} / \mu\text{mol L}^{-1})$ e R^2 igual a 0,99896. O limite de detecção (3SD) e quantificação (10SD) foram estimados como sendo de 25 e 83 nmol L^{-1} , respectivamente.

A estabilidade operacional do eletrodo modificado RuOHCF sob condições de fluxo foi investigada durante 4 dias. A cada dia, quatro injeções consecutivas de solução padrão de ranitidina 3,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram feitas na célula eletroquímica em fluxo. Entre as medidas o eletrodo era armazenado em local seco e a temperatura ambiente. Durante este estudo, o sinal de corrente de pico apresentou um desvio padrão relativo de 6,0%, confirmando a sua estabilidade a longo prazo. Avaliados os parâmetros analíticos e a estabilidade do sensor, o eletrodo modificado foi aplicado para a análise de três diferentes formulações farmacêuticas comerciais. Os resultados estão resumidos na Tabela 1. Todos os resultados encontrados utilizando o método proposto estão em boa concordância (para um nível de confiança de 95% de acordo com o teste t de Student) com os valores obtidos pelo método padrão reportado na literatura [4].

Tabela 1. Quantidade de ranitidina rotulada e valores encontrados pelo método proposto e pelo método reportado na literatura [4] para diferentes formulações farmacêuticas comerciais.

Amostra	Quantidade de ranitidina (mg /comprimido)		
	Rotulado	Método Proposto*	Método Padrão*
Medley	150	(151 \pm 6)	(148 \pm 5)
Teuto	150	(148 \pm 8)	(147 \pm 6)
EMS	150	(147 \pm 7)	(148 \pm 4)

*Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

CONCLUSÃO

A oxidação da ranitidina demonstrou ser facilitada após a modificação da superfície eletródica do carbono vítreo com RuOHCF. Com isso, a utilização de eletrodo modificado como detector amperométrico em sistema FIA alcançou parâmetros analíticos interessantes e propiciou a diminuição do limite de detecção para a quantificação da ranitidina quando comparado com outros métodos eletroquímicos. Adicionalmente utilizou-se o método proposto para a determinação de ranitidina em formulações farmacêuticas obtendo-se resultados concordantes com o método padrão.

AGRADECIMENTOS: FAPESP (2009/07859-1), CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] MARCOLINO-JÚNIOR L.H., HUMBERTO L., “Eletrodos voltamétricos e amperométricos para a determinação de espécies de interesse farmacêutico”, São Carlos:UFSCar, 2007. 138f.
- [2] LEE T.H., VEGA K. J., EL KHOURY J. G., “Ranitidine induced hepatitis” *J. Gastrointest. Liver Dis.*, 19: 337-338, 2010.
- [3] PAIXÃO T.R.L.C., GARCIA C.C.M., MEDEIROS M.H.G., BERTOTTI M., “Flow injection amperometric detection of 2'-deoxyguanosine at a ruthenium oxide hexacyanoferrate modified electrode”, *Anal. Chem.* 79: 5392-5398, 2007.
- [4] HASSAN E.M., BELAL F., “Kinetic spectrophotometric determination of nizatidine and ranitidine in pharmaceutical preparations”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27: 31-38, 2002.

ELETRODO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO E FILME DE COBALTO PARA DETECÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Cleyton Bezerra Lopes^{1,2}, Francisco de Assis dos Santos Silva^{1,2}, Phabyanno Rodrigues Lima^{1,2}, Marília Oliveira Fonseca Goulart^{1,2} e Lauro Tatso Kubota²

¹ Instituto de Química e Biotecnologia – UFAL, Maceió - AL - Brasil;

²INCT – Bioanalítica, Campinas – SP - Brasil.

cleyton_7@hotmail.com

Este trabalho relata o desenvolvimento, caracterização eletroquímica e utilização de um eletrodo modificado com nanotubos de carbono e filme de cobalto para determinação de peróxido de hidrogênio. A formação do filme de óxido de cobalto foi estudada por voltametria cíclica. A cinética de transferência de elétrons foi determinada utilizando as equações de Laviron, o valor de k_s foi determinado como sendo $8,2 \text{ s}^{-1}$. Os parâmetros analíticos foram determinados por amperometria, aplicando o potencial de $0,18 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl . O sensor apresentou uma faixa linear de resposta de $0,005$ a 11 mmol L^{-1} , sensibilidade de $3,1 \mu\text{A} / \text{mmol L}^{-1}$. Os limites de detecção e quantificação foram $0,005 \text{ mmol L}^{-1}$ e $0,016 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave: Nanotubos de carbono, peróxido de hidrogênio e filme de óxido de cobalto.

INTRODUÇÃO

Diferentes tipos de materiais nanoestruturados, incluindo metais nobres, nanotubos de carbono, óxidos e compósitos têm sido utilizados em eletroquímica, em eletrocatalise, em células combustíveis e para outras funções [1]. Entre eles, encontram-se nanoestruturas de óxidos metálicos tais como de Co, Fe, Ni e Cu. Materiais a base de cobalto, em particular, têm sido amplamente usados para o sistema de armazenamento de energia, filmes eletrocromicos e catalise heterogênea, principalmente devido a sua excelente atividade eletrocatalítica [2].

A presença de nanoestruturas de carbono pode melhorar esta atividade, devido ao aumento da área superficial, assim como da cinética de transferência de elétrons.

Eletrodos quimicamente modificados são preparados principalmente por deposição eletroquímica porque apresentam filmes uniformes e com alto grau de aderência. Além disso, as características do filme podem ser facilmente modificadas por meio dos parâmetros que afetam o processo de eletrodeposição, tais como: concentração de metais, o número de varreduras de potencial, o solvente e o eletrólito de suporte [3].

Os filmes de óxido de cobalto foram utilizados para detectar diferentes moléculas como glicose, cisteína, propilamina, hidroquinona e metanol [2].

O peróxido de hidrogênio é um dos oxidantes mais versáteis que existe. Está presente em inúmeras reações biológicas como produto de várias oxidases, e sua quantificação constitui um parâmetro importante na análise destes bioprocessos. O peróxido de hidrogênio é também importante nas áreas de alimentos, medicamentos, monitoramento de processos, dentre outros [4-5]. Vários métodos analíticos têm sido utilizados para detectar peróxido de hidrogênio, incluindo volumetria, espectrofotometria, fluorimetria, quimiluminescência, cromatografia e métodos eletroquímicos. Os sensores eletroquímicos surgem como uma alternativa a estes métodos, por apresentarem baixos limites de detecção e grande sensibilidade e seletividade [5].

O presente trabalho relata a construção de um filme de óxido de cobalto eletrodepositado sobre uma superfície de carbono vítreo modificada com nanotubos de carbono para a detecção de peróxido de hidrogênio, utilizando a voltametria cíclica. Os parâmetros de formação do filme foram estudados, bem como os parâmetros cinéticos do eletrodo modificado. Foi construída uma curva amperométrica para a detecção de H_2O_2 e os parâmetros analíticos foram determinados.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato, modelo PGSTAT30 Eco Chemie da AUTOLAB (Utrecht, Netherlands), conectado um computador (software: GPES 4.9). Uma célula eletroquímica foi utilizada, Ag/AgCl (KCL saturado) como eletrodo de referência, um fio de platina como eletrodo auxiliar e carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e óxido de cobalto (ECV/MWCNT/Co) como eletrodo de trabalho.

O ECV foi modificado com uma suspensão de nanotubos de carbono. A formação do filme foi realizada eletroquimicamente por voltametria cíclica numa solução de CoSO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ + Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Eletrodos modificados a base de óxido de cobalto apresentam comportamento eletroquímico complexo, com várias estruturas cristalográficas possíveis, além da formação de diferentes espécies como Co_3O_4 , CoO , Co_2O_3 , CoOOH e CoO_2 [1]. A figura 1 mostra voltamogramas em eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e filme de óxido de cobalto (ECV/MWCNT/Co). Na faixa de potencial estudada de 0,0 V a +0,5 V é possível observar um par redox reversível com potencial formal $[E^0 = (E_{pa} + E_{pc})/2]$ de +0,175 V. Um pico é observado em 0,19 V, durante a varredura anódica. Este pico é atribuído à reação de oxidação de $\text{Co(II)}/\text{Co}_3\text{O}_4$. Durante a varredura catódica é observado um pico em 0,16 V, correspondente à redução do óxido de cobalto, como sugerido pelo mecanismo abaixo, equações 1 e 2 [2]:

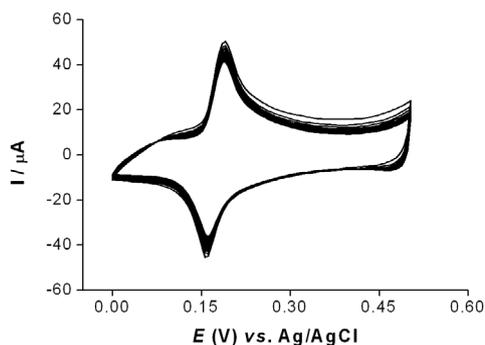
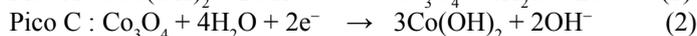
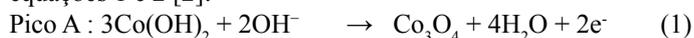


Figura 1: Voltamogramas cíclicos em ECV/MWCNT/Co, em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. $E_{\text{inicial}} = 0,0 \text{ V}$ e $E_{\lambda} = 0,5 \text{ V}$, varredura no sentido anódico.

Os voltamogramas cíclicos obtidos para o ECV/MWCNT/Co são mostrados na Figura 2A para várias velocidades de varredura de potencial (0,005 - 0,050 V s⁻¹). A observação de picos voltamétricos persistentes e bem definidos indica que o processo redox exibe características de espécies confinadas na superfície do eletrodo.

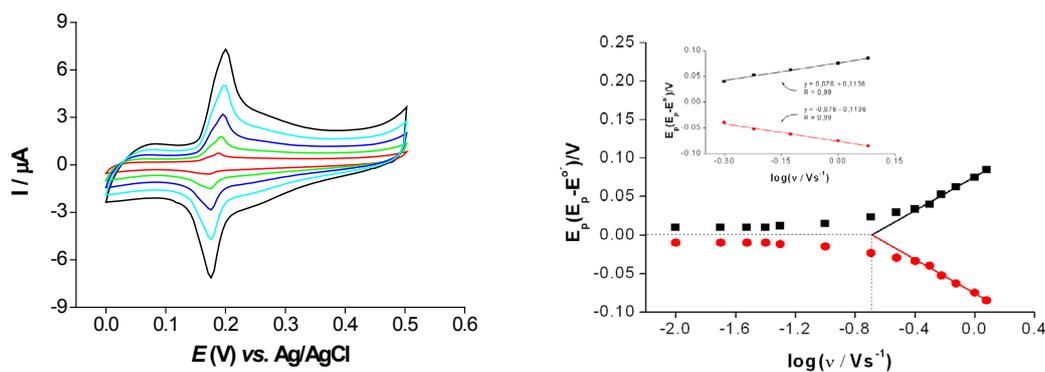


Figura 2: (A) Voltamogramas cíclicos em ECV/MWCNT/Co, em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, $\nu = (0,010-0,050 \text{ V s}^{-1})$; Inset: Dependência da corrente de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}) em função da velocidade de varredura. (B) Gráfico de Laviron, E_{pa} e E_{pc} vs. $\log \nu$. Condições empregadas: solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹.

No inset da figura 2A, é possível observar uma relação linear direta entre as correntes de pico anódico e catódico e a velocidade de varredura. Além disso, a diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico e o potencial formal ($E_p - E^0$) é independente da velocidade de varredura de potencial, indicando que ocorre uma rápida transferência de carga, na faixa de velocidade de varredura estudada. Utilizando a teoria de Laviron, equação 3, e o gráfico da figura 2B, foi possível determinar a constante cinética de transferência de elétrons (ks):

$$\log ks = \alpha \log(1-\alpha) + (1-\alpha) \log \alpha - \frac{\alpha RT}{nFv} - \frac{\alpha(1-\alpha)nFE}{2,303RT} \quad (3)$$

Admitindo que sejam dois elétrons envolvidos no processo redox [2], e que α seja igual a 0,5. O valor calculado para k_s foi de $8,2 \text{ s}^{-1}$, maior que $1,62 \text{ s}^{-1}$ [6]. Assim, pode-se concluir que o processo redox do ECV/MWCNT/Co não é um limitante na aplicação do sensor.

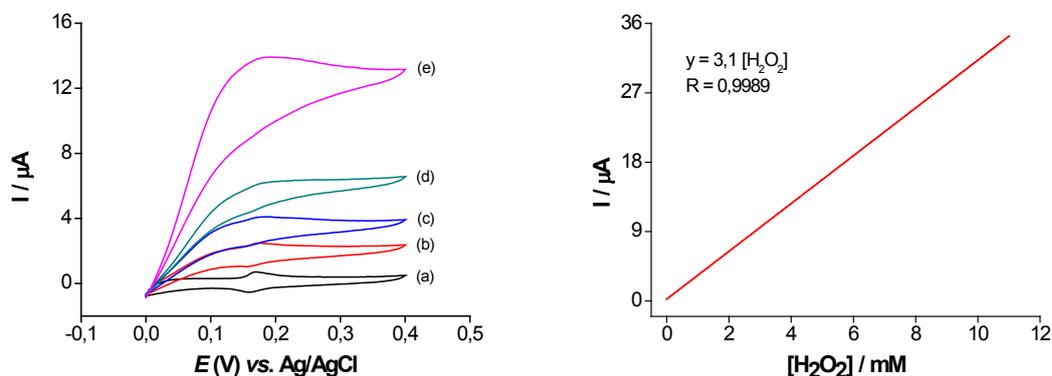


Figura 3: (A) Voltamogramas cíclicos para o ECV/MWCNT/Co, em diferentes concentrações de H_2O_2 (a) 0,0 mM; (b) 1,0 mM; (c) 2,0 mM; (d) 4,0 mM e (e) 10,0 mM. Velocidade de varredura (v) = $0,005 \text{ V s}^{-1}$. Estudos realizados em solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Na figura 3A são mostrados voltamogramas para diferentes concentrações de H_2O_2 em solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. É possível observar que ocorre um aumento na corrente de pico anódico proporcional à concentração de H_2O_2 , e que a corrente de pico catódica desaparece totalmente, comportamentos típicos de processos catalíticos.

Para se obter uma curva analítica, figura 3B, amperogramas foram realizados em diferentes concentrações de H_2O_2 , aplicando um potencial de $0,18 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Assim, o ECV/MWCNT/Co apresentou uma faixa linear de resposta de $0,005$ a 11 mmol L^{-1} com coeficiente de correlação de $0,9989$, semelhante à ($0,005\text{--}12 \text{ mmol L}^{-1}$) [5]. Apresentou também uma sensibilidade de $3,1 \mu\text{A} / \text{mmol L}^{-1}$ próximo à $7,39 \mu\text{A} / \text{mmol L}^{-1}$ [5]. Limites de detecção de $0,005 \text{ mmol L}^{-1}$ e de quantificação de $0,016 \text{ mmol L}^{-1}$ foram obtidos.

CONCLUSÕES

O sensor desenvolvido se apresenta como uma alternativa simples para uso na determinação de peróxido de hidrogênio. Destaca-se ainda a simplicidade de modificação do eletrodo e sua reprodutibilidade, além de sua ampla faixa linear de resposta, o que se reflete numa maior aplicabilidade e confiança nas medidas.

AGRADECIMENTOS: CAPES/PROCAD-NF, CNPQ E INCT-BIO.

REFERÊNCIAS

- [1] RAZMI, Habib e HABIBI, Esmail. “Amperometric detection of acetaminophen by an electrochemical sensor based on cobalt oxide nanoparticles in a flow injection system”. *Electrochimica Acta* 55, 8731-8737, 2010.
- [2] TIAN, Li *et al.*. “Electrochemical study on cobalt film modified glassy carbon electrode and its application”. *Electrochimica Acta* (55): 3083-3088, 2010.
- [3] ARVINTE, Adina *et al.*. “Electrocatalytic oxidation and determination of insulin at CNT-nickel-cobalt oxide modified electrode”. *Sensors and Actuators B* (150): 756–763, 2010.
- [4] LI, Yali *et al.*. “Gold nanoparticles mediate the assembly of manganese dioxide nanoparticles for H_2O_2 amperometric sensing”. *Electrochimica Acta* (55): 5123–5128, 2010.
- [5] QIN, Xia *et al.*. “Synthesis of dendritic silver nanostructures and their application in hydrogen peroxide electroreduction”. *Electrochimica Acta* (56): 3170–3174, 2011.
- [6] YANG, Zhousheng *et al.*. “Amperometric sensors based on Ni/Al and Co/Al layered double hydroxides modified electrode and their application for hydrogen peroxide detection”. *Biosensors and Bioelectronics* (26): 1970–1974, 2011.

ELETRODO ÍON-SELETIVO DE PASTA DE CARBONO PARA DETERMINAÇÃO DE COBRE BASEADO EM UM NOVO *LARIAT*-ÉTER COROA

Rômulo A. L. de Campos (PG)¹, Priscilla M. da Rocha Santos(IC)¹, Sherlan G. Lemos (PQ)², Valberes B. do Nascimento(PQ)¹ e Mônica F. Belian(PQ)¹

¹ Departamento de Química - UFRPE, Recife - PE - Brasil; ² Departamento de Química - UFPB, João Pessoa - PB - Brasil. romuloalc@ibest.com.br

RESUMO: A síntese do 3-(2-etoxi-1,3,6,9,12-pentaoxa-2-silaciclotetradecan-2-il)propano-1-amino (SIL15NH) pela reação do 3-aminopropiltrióxido de silano com tetraetilenoglicol catalisada por *t*-butóxido de potássio é descrita. Uma pasta de carbono modificada com SIL15NH como ionóforo e tetrakis(*p*-clorofenil)borato de potássio como aditivo foi utilizada como eletrodo íon-seletivo para Cu²⁺. O eletrodo apresentou resposta super-nernstiana de 35,8 mV/década de atividade de Cu²⁺ sobre uma faixa linear de 9,90x10⁻⁶ mol.L⁻¹ a 9,62x10⁻³ mol.L⁻¹, com limite de detecção de 8,45 x 10⁻⁶ mol.L⁻¹ tendo como eletrólito suporte uma solução tampão de biftalato de potássio/HCl pH = 3,0. O eletrodo mostrou-se fortemente influenciado pela variação de pH na faixa de 3,0 a 6,3. O eletrodo não apresentou resposta potenciométrica para os íons Co²⁺, Ni²⁺ e Zn²⁺.

Palavras-chave: *lariat*-éter coroa, eletrodo de íon-seletivo, íons cobre(II).

INTRODUÇÃO

O cobre, para a saúde humana, consiste em nutriente essencial para o funcionamento adequado de vários sistemas enzimáticos, entretanto, a presença de elevadas concentrações de cobre em alimentos é indesejável, uma vez que pode apresentar riscos à saúde humana, bem como seu desequilíbrio no metabolismo está associado a graves problemas de saúde tais como catarata, doenças de *Wilson*, *Menkes* e *Alzheimer* [1-2]. Em vista desses efeitos tóxicos do cobre, a sua determinação clínica e ambiental torna-se de grande importância. Uma série de métodos, tais como: espectrometria de absorção atômica, voltametria de redissolução anódica, cromatografia e técnicas gravimétricas são utilizados para fornecer resultados precisos em baixa concentração. Porém estas técnicas citadas apresentam problemas como: alto custo operacional, frequência analítica baixa e pré-tratamento das amostras.

Diante deste contexto, o desenvolvimento de eletrodos íon-seletivos torna-se uma alternativa viável. Os eletrodos íon-seletivos de membrana polimérica e os eletrodos quimicamente modificados de pasta de carbono (EQMPC) possibilitam: (i) menores tempos de resposta, (ii) mínimo pré-tratamento das amostras e (iii) uso de aparelhos portáteis, os quais podem viabilizar análises em campo. Comparado com os eletrodos íon-seletivos de membrana polimérica, os EQMPC possuem algumas vantagens quanto à preparação, regeneração da superfície e velocidade de resposta, além de baixa resistência ôhmica, sendo esta última devido à formação de uma película formada pela cola líquida que reveste as partículas de pó de carbono [3].

Os EQMPC fornecem métodos simples de detecção para avaliar a sensibilidade de um ligante diante de uma resposta potenciométrica ao íon desejado, pois é possível selecionar vários ionóforos de acordo com a carga e tamanho do íon de interesse nos ensaios clínicos e ambientais. Com base nos recentes avanços da química de coordenação, eletrodos de pasta de carbono para diversos íons têm sido desenvolvidos com o uso de moléculas macrocíclicas como éteres coroa, bem como ligantes acíclicos [4]. A adição de um aditivo permite ao EQMPC manter sempre uma resposta nernstiana, garantindo a exclusão de íons com carga oposta ao do íon analisado, mantendo a concentração desse constante na pasta de carbono [5].

Este trabalho visa estudar a resposta potenciométrica de um novo *Lariat*-éter coroa recentemente sintetizado por nosso grupo de pesquisa, a fim de investigar suas potencialidades como ionóforo na confecção de um eletrodo íon-seletivo de pasta de carbono para íons Cu²⁺.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Síntese do *Lariat*-éter Coroa: Em um balão de duas bocas foram adicionados 36,7 mL (15,6 mmol) de 3-aminopropil trióxido de silano e 19 mL (11 mmol) de tetraetilenoglicol em 20 mL de dioxano. Após agitação por cerca de 10 minutos, foram adicionados 22 mmol de *t*-butóxido de potássio. A reação é mantida sob agitação e aquecimento (120°C) durante 4 horas. Após isso, a amostra era filtrada, lavada com dioxano 03 vezes e todo o solvente era então rota-evaporado.

Preparação do Eletrodo: A pasta de carbono foi preparada, pesando-se os componentes da mistura e efetuando-se uma homogeneização por cerca de 30 minutos com auxílio de um bastão de vidro. A mistura era então prensada na extremidade do suporte do eletrodo e a superfície era polida com papel manteiga. A Tabela 1 mostra as composições estudadas no processo de otimização da pasta de carbono na confecção do sensor, baseadas num planejamento de mistura que fixou em 70% a massa do grafite em pó [6].

Tabela 1. Planejamento da composição da pasta de carbono modificada com SIL15NH.

Ensaio	Nujol (%m/m)	SIL15NH (%m/m)	Aditivo (%m/m)
01	25	5	0
02	20	10	0
03	20	5	5
04	22,5	5	2,5
05	22,5	7,5	0
06	20	7,5	2,5
07	21,66	6,67	1,67

Resposta Potenciométrica: O comportamento eletroquímico dos EQMPC como sensor potenciométrico para íons Cu^{2+} foi avaliado à temperatura ambiente empregando-se uma célula eletroquímica contendo 10 mL do eletrólito de suporte (solução tampão de biftalato de potássio/HCl pH = 3,0) de acordo com cada ensaio mostrado na Tabela 1. A resposta potenciométrica foi monitorada em relação a um eletrodo de referência de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3 \text{ mol.L}^{-1}$, Metrohm) empregando-se um pHmetro ANALION modelo PM 608. As figuras de mérito e o desempenho analítico do sensor foram estudados utilizando-se ampla faixa de concentração de íons Cu^{2+} (10^{-8} a $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O lariat-éter coroa sintetizado se apresentou na forma de um óleo viscoso de coloração amarelo pálido. O rendimento (m/m) da reação foi 84%. O SIL15NH foi caracterizado utilizando-se RMN, IR e análise elementar. Apesar da baixa solubilidade apresentada pelo SIL15NH, foram obtidas medidas de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C . RMN: ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 1,7 (4 H, NH_2); 2,8 (4 H, CH_2N); 1,5 (4 H, $\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}$); 0,8 (4 H, $\text{Si}-\text{CH}_2-\text{C}$); 3,7-4,2 (32 H, $\text{OCH}_2-\text{CH}_2\text{O}$). RMN ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) 45,437 (2 C, CH_2N); 27,603 (2 C, $\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}$); 7,926 (2 C, SiCH_3); 62,484 (4 C, SiOCH_2); 67,311; 70,984; 72,653 (12 C, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$). Também foram obtidos dados de infra-vermelho (KBr): 1077 (v, $\text{Si}-\text{O}-\text{C}$); 1100 (v, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$); 947 e 790 (v, $\text{Si}-\text{O}$); 1290 (v, $\text{Si}-\text{C}$); 3350 (v, $\text{N}-\text{H}$); 2923 e 2870 (v, CH_2); 1070 (v, $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$). A análise elementar para $\text{C}_{22}\text{H}_{48}\text{Si}_2\text{O}_{11}\text{N}_2$ (572) resultou: Teórico - C 46,15; H 8,39; N 4,89 e experimental - C 46,61; H 8,83; N 4,95.

Os resultados para a otimização da pasta de carbono são apresentados na Tabela 2. A Figura 1 apresenta as respostas potenciométricas para os ensaios realizados na Tabela 2. Verifica-se que o Ensaio 03 teve a melhor composição para obtenção de uma resposta próxima da nernstiana esperada para cátions bivalentes (29,0 mV/década), com uma sensibilidade de 35,8 mV/década e um coeficiente de correlação $R^2 = 0,9987$. Respostas super-nernstianas são reportadas na literatura como resultante da capacidade da pasta de carbono em extrair íons Cu^{2+} de uma solução [7].

Tabela 2. Resultados do planejamento experimental, cuja massa fixada de pó de grafite foi 70%.

Ensaio	Sensibilidade (mV/década)		LD (mol.L ⁻¹)		Faixa linear (mol.L ⁻¹)	
01	42,4	43,9	$3,95 \times 10^{-5}$	$3,83 \times 10^{-5}$	$1,03 \times 10^{-4}$ a $4,57 \times 10^{-3}$	$1,66 \times 10^{-4}$ a $9,62 \times 10^{-3}$
02	50,5	52,0	$2,40 \times 10^{-5}$	$1,86 \times 10^{-5}$	$4,39 \times 10^{-5}$ a $9,59 \times 10^{-3}$	$4,40 \times 10^{-5}$ a $9,61 \times 10^{-3}$
03	35,8	36,0	$8,45 \times 10^{-6}$	$7,77 \times 10^{-5}$	$9,90 \times 10^{-6}$ a $9,62 \times 10^{-3}$	$9,87 \times 10^{-6}$ a $9,60 \times 10^{-3}$
04	39,9	42,1	$3,31 \times 10^{-5}$	$2,53 \times 10^{-5}$	$4,38 \times 10^{-5}$ a $1,70 \times 10^{-3}$	$4,41 \times 10^{-5}$ a $1,73 \times 10^{-3}$
05	47,0	47,0	$6,18 \times 10^{-6}$	$1,46 \times 10^{-5}$	$4,39 \times 10^{-5}$ a $9,60 \times 10^{-3}$	$4,35 \times 10^{-5}$ a $9,61 \times 10^{-3}$
06	52,0	53,7	$2,40 \times 10^{-5}$	$1,87 \times 10^{-5}$	$4,37 \times 10^{-5}$ a $9,59 \times 10^{-3}$	$4,30 \times 10^{-5}$ a $9,55 \times 10^{-3}$
07	48,4	53,9	$2,16 \times 10^{-5}$	$1,62 \times 10^{-5}$	$4,41 \times 10^{-5}$ a $9,63 \times 10^{-3}$	$4,40 \times 10^{-5}$ a $9,62 \times 10^{-3}$

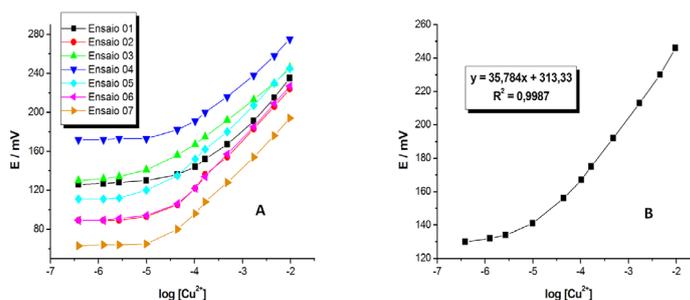


Figura 1. A) Respostas potenciométricas do EQMPC nas diferentes composições da pasta de carbono (Tabela 1). B) Melhor composição da pasta (Ensaio 03).

A Figura 2A apresenta o efeito do pH na resposta potenciométrica do sensor. Observa-se que o potencial é fortemente influenciado pelo pH da solução. Assim, torna-se necessário o controle rigoroso do pH na determinação de Cu^{2+} , fato já reportado na literatura para outros sensores [7]. A Figura 2B traz o estudo para os cátions Zn^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} , os quais são geralmente reportados como fortes interferentes na análise de Cu^{2+} . Nota-se claramente que o sensor proposto não possui sensibilidade para estes cátions.

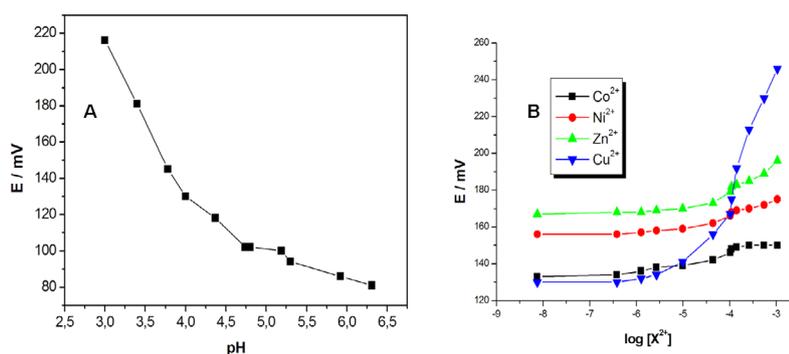


Figura 2. A) Influência do pH sobre o potencial e B) Resposta potenciométrica do sensor para os cátions Co^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} . X = Cu, Co, Ni e Zn.

CONCLUSÕES

Um sensor potenciométrico seletivo a íons Cu^{2+} , baseado numa pasta de carbono contendo 5% de SIL15NH como ionóforo foi desenvolvido. O sensor apresentou resposta super-nernstiana de 35,8 mV/década para íons Cu^{2+} , limite de detecção de $8,45 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ e faixa linear de $9,90 \times 10^{-6}$ a $9,62 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹. O eletrodo sofre forte influência do pH e não apresenta resposta potenciométrica significativa para os cátions Co^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} .

AGRADECIMENTOS: FACEPE, CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] WAGGONER, D.J.; BARTNIKAS, T. B.; GITLIN, J. D., "The role of copper in neurodegenerative disease", *Neurobiology of Disease*, 6(4), 221-230, 1999.
- [2] GUPTA, V.K., *et al*, "Copper(II)-selective potentiometric sensors based on porphyrins in PVC matrix", *Sens. Act. B*, 117(1): 99-106, 2006.
- [3] ABU-SHAWISH, H.M.; *et al*, "Improved determination of tramadol hydrochloride in biological fluids and pharmaceutical preparations utilizing a modified carbon paste electrode", *Bioch. Eng. Jour.* 48(2), 237-245, 2010.
- [4] CHANDRA, S.; LANG, H. "A new sodium ion selective electrode based on a novel silacrown ether", *Sens. Act. B*, 114(2), 849-854, 2006.
- [5] TORRES, K.Y.C., "Recentes avanços e novas perspectivas dos eletrodos íon-seletivos", *Quím. Nova*, 29(5), 1094-1100, 2006.
- [6] SVANCARA, I., *et al*, "Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: A review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis", *Electroanalysis*, 21(1), 7-28, 2009.
- [7] HU, X.; LENG, Z. "Highly selective and super-nernstian potentiometry for determination of Cu^{2+} using carbon paste electrode", *Analytical Letters*, 28 (6), 979-989, 1995.

CARACTERIZAÇÃO DO ELETRODO MODIFICADO COM O FILME $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{NiTsPc}^{4-}$ E APLICAÇÃO NA QUANTIFICAÇÃO ELETROANALÍTICA DE NITRITOS E SULFITOS

Rodolfo T. Ferreira¹, Cleverson Siqueira Santos¹, Sérgio T. Fujiwara², Karen Wohnrath¹, Jarem R. Garcia¹, Christiana Andrade Pessoa¹

¹ Universidade Estadual de Ponta Grossa-UEPG, Ponta Grossa - PR - Brasil; ² Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, Guarapuava - PR – Brasil. rodolfo.tatsu@gmail.com

Resumo: O presente trabalho visou o desenvolvimento de eletrodos modificados (EQM) pela técnica LbL, a partir do cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano (SiPy^+Cl^-) (polication), um polímero inorgânico com alta capacidade de formação de filmes^[1] e muito solúvel em H_2O , e metalofalocianina tetrassulfonada de Níquel ($\text{Na}_4[\text{NiTsPc}]$) (polianion), sobre uma superfície vítrea modificada com FTO (óxido de estanho dopado com Flúor) gerando filmes estáveis. A caracterização deste filme foi realizada por espectroscopia UV-Vis e IV, Microscopia de Força Atômica (MFA) e voltametria cíclica (VC). O sensor mostrou-se eficiente na quantificação de nitritos ($\text{LOD} = 23,58 \text{ nmol.L}^{-1}$ e $\text{LQ} = 78,60 \text{ nmol.L}^{-1}$) e sulfitos ($\text{LOD} = 205,40 \text{ nmol.L}^{-1}$ e $\text{LQ} = 684,70 \text{ nmol.L}^{-1}$), através de VOQ (voltametria de onda quadrada).

Palavras-chave: EQM, LbL, Nitrito, Sulfito, Ftalocianinas.

INTRODUÇÃO

A técnica LbL (do inglês *Layer-by-Layer*) é uma das técnicas mais utilizadas atualmente para formação de filmes finos. Esta técnica confere um controle em nível de organização molecular, com a deposição das camadas ocorrendo espontaneamente por interações eletrostáticas. Neste contexto, o presente trabalho visa à utilização da metalofalocianina tetrassulfonada de Níquel ($\text{Na}_4[\text{NiTsPc}]$) em conjunto com o polímero inorgânico cloreto de 3-n-propilpiridíniosilsexquioxano¹ (SiPy^+Cl^-), um excelente formador de filmes, gerando um composto estável na superfície de um substrato vítreo recoberto com FTO (óxido de estanho dopado com flúor) em reações redox para a quantificação eletroanalítica de sulfitos e nitritos².

A importância no monitoramento destes íons está relacionada diretamente com a saúde pública, uma vez que são amplamente utilizados como agentes conservativos e inibidores do crescimento de microrganismos em alimentos. No entanto, o uso excessivo destas substâncias com o objetivo de prolongar a vida útil dos produtos, pode gerar sérias consequências à saúde do consumidor.

Na literatura são descritas diversas técnicas para o monitoramento de tais substâncias³, porém, nem sempre estão acessíveis ou possuem fácil manejo. Deste modo, os métodos eletroanalíticos mostram-se como alternativa viável para o tratamento desses problemas.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As soluções de $[\text{NiTsPc}^{4-}] = 2 \text{ g/L} = [\text{SiPy}^+\text{Cl}^-]$ e soluções de lavagem (H_2O deionizada) foram corrigidas para $\text{pH} = 8,00$ com solução de NaOH ($1,0 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$). Construíram-se filmes adotando-se o parâmetro tempo de 300s para deposição e de 60s para lavagem. As bicamadas foram montadas alternando-se a ordem dos polieletrólitos. A caracterização morfológica foi realizada via AFM (Atomic Force Microscopy) SHIMADZU ASM-9600. O monitoramento do crescimento do filme se deu por espectroscopia na região UV-Vis e IV, através dos espectrofotômetros SHIMADZU-MultiSpec 1501 e SHIMADZU-IR Prestige-21, respectivamente. A caracterização eletroquímica por voltametria cíclica foi realizada com o Palm-Sens 4.1 na faixa de $-0,1 \text{ V}$ a $1,4 \text{ V}$, 50 mV , numa célula eletroquímica vítrea ($V = 0,01 \text{ L}$) de 3 eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho: $\text{SiPy}^+/\text{NiTsPc}^{4-}$ ($0,500 \text{ cm}^2$); contra eletrodo: Pt ($1,200 \text{ cm}^2$); eletrodo referência: $\text{Ag}^+/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$, utilizando-se como eletrólito suporte KCl $0,70 \text{ mol.L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,50$). A quantificação foi por VOQ ($a = 50 \text{ mV}$, $f = 12,5 \text{ Hz}$, $\Delta E = 4 \text{ mV}$) na faixa de concentração $[\text{NO}_2^-] = 15,08$ à $79,39 \text{ nmol.L}^{-1}$ e $[\text{SO}_3^{2-}] = 222,77$ à $853,08 \text{ nmol.L}^{-1}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Algo importante deve ser frisado neste trabalho é que sem a presença do polieletrólito SiPy^+ não há deposição da ftalocianina sobre a superfície do substrato (Fig. 1a e Fig. 1b), e por consequência, a formação do filme. Isto pois, considerando-se o fato da NiTsPc^{4-} portar uma carga negativa e o substrato possuir carga parcial negativa, há repulsão entre ambos. No entanto, quando o SiPy^+ é adicionado, o crescimento (através do monitoramento na região UV-VIS das Bandas-Q (bandas relativas às espécies diméricas em 626nm e monoméricas em 670nm) da NiTsPc^{4-} é linear

($R=0,999$) e aumenta com o número de bicamadas (Fig.1b). A linearidade (Fig.1c) do crescimento é um indicativo de que a mesma quantidade do composto é adsorvida a cada camada. Foi constatado que existe influência do pH no equilíbrio de dimerização da $NiTsPc^{4-}$. Os espectros obtidos mostraram uma maior predominância das espécies monoméricas quando $6,00 < pH < 8,00$. Para faixas $pH < 6,00$ e $pH > 8,00$, prevalece a existência das espécies diméricas da $NiTsPc^{4-}$. O aumento das espécies monoméricas tem relevância, pois, é um indicativo de maior organização das camadas do composto, podendo influenciar na resposta eletroquímica final do EQM.

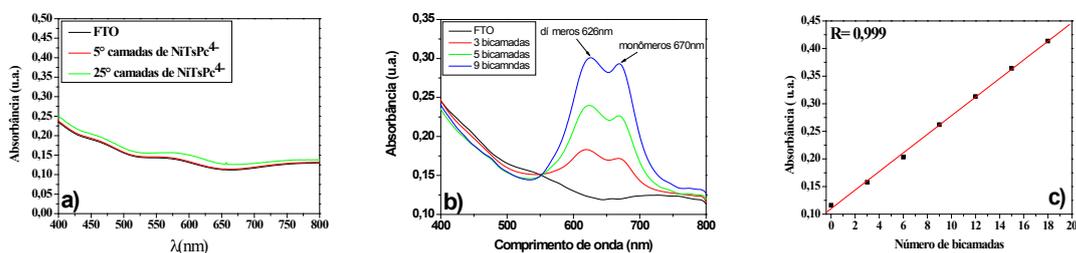


Figura 1: Estudo sobre a influência do $SilPy^+Cl^-$ no crescimento do filme: (a) Sem a adição de $SilPy^+Cl^-$, (b) com a adição de $SilPy^+Cl^-$ e (c) Curva do filme $SilPy^+Cl^-/NiTsPc^{4-}$ contendo 18 bicamadas.

O espectro de IV do filme $SilPy^+Cl^-/NiTsPc^{4-}$ revelou a ocorrência de um deslocamento⁴ (para regiões menos energéticas) das bandas dos grupos sulfônicos de 1190 cm^{-1} para 1179 cm^{-1} . O deslocamento destas bandas pode ser um indicativo da restrição dos movimentos possíveis para esses grupos. A restrição de movimentos, implica que a interação eletrostática entre o $SilPy^+$ e a $NiTsPc^{4-}$ no composto pode se dar de maneira eficiente perturbando as posições originais das transições observadas experimentalmente.

Estudos de AFM foram realizados em diferentes quantidades de bicamadas. A rugosidade (R_q), em geral, tende a diminuir com o aumento do número de bicamadas. O decréscimo é decorrente do preenchimento dos vales existentes entre os grãos do óxido, que a cada bicamada, acarreta na diminuição da rugosidade do substrato. A partir de um determinado número de bicamadas (no caso 9 bicamadas) esta passa a aumentar novamente. No entanto, com o aumento do número de bicamadas depositadas nesta superfície já preenchida e, portanto, menos rugosa, ocorre o aumento da R_q (uma vez que a morfologia está mais plana e a disponibilidade de vales é menor). Os dados de rugosidade associados à caracterização eletroquímica revelam que o aumento acentuado na rugosidade, leva a diminuição na intensidade de corrente. Tal comportamento é indicativo do aumento no efeito resistivo que aumenta com o número de bicamadas (Tabela 1 e Fig. 3a). Este efeito é notado tanto para os processos do anel quanto do metal. O perfil voltamétrico do EQM contendo uma bicamada de $SilPy^+Cl^-/NiTsPc^{4-}$ apresenta processos do centro metálico da ftalocianina Ni^{+2} à Ni^{+3} em $E_{pa1} = 0,091V$ e $E_{pc1} = 0,151V$ e anel Pc^{-6} à Pc^{-5} em $E_{pa2} = 1,110V$ e $E_{pc2} = 0,192V$ (Fig. 2b).

Tabela 1: Algumas propriedades do EQM.

Nº de bicamadas	R_q (nm)	i (μA)*
0 (FTO)	32,524	0,31694
1	20,871	1,31823
2	27,296	0,95085
5	20,428	0,61795
9	24,992	0,34733
18	38,635	0,78467
36	27,738	0,31672

*Referente ao processo na região do Ni.

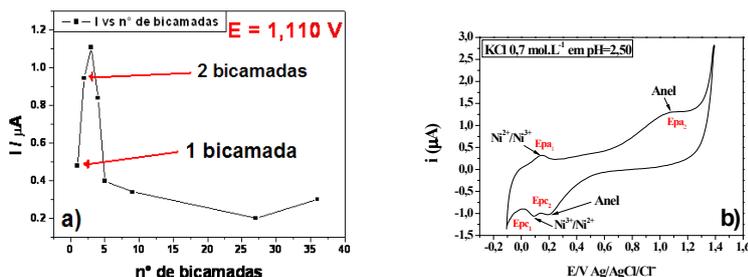


Figura 2: a) Relação entre a corrente (em $E_{pa1}=1,110V$) em função do aumento do número de bicamadas. b) Voltamogramas cíclicos do filme $SilPy^+Cl^-/NiTsPc^{4-}$ contendo uma bicamada.

Para a construção das curvas analíticas, o EQM de duas bicamadas foi o escolhido porque apresentou a maior área superficial com menor número de bicamadas possível (reduzindo o efeito resistivo e otimizando a resposta eletroquímica).

Os processos dos íons nitrito e sulfito no EQM com $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{NiTsPc}^+$ foram encontrados por voltametria cíclica (Fig.4a e 4b), na faixa de -0,1 a -1,4V vs. Ag/AgCl. Para NO_2^- , $E_{pa}= 1,207$ V e SO_3^{2-} $E_{pa}= 1,324$ V. A faixa de concentração para quantificação por VOQ foi de $[\text{NO}_2^-]= 15,08$ à $79,39$ nmol.L^{-1} com $\text{LOD}= 23,58$ nmol.L^{-1} e $\text{LQ}= 78,60$ nmol.L^{-1} , $R=0,997$ e equação $y= 0,11378x + 4.64105$ (Fig.4c). Para $[\text{SO}_3^{2-}]= 222,77$ à $853,08$ nmol.L^{-1} com $\text{LOD}= 205,40$ nmol.L^{-1} $\text{LQ}= 684,70$ nmol.L^{-1} , $R=0,999$ e equação $y= 0,00484x + 12,24369$ (Fig.4d).

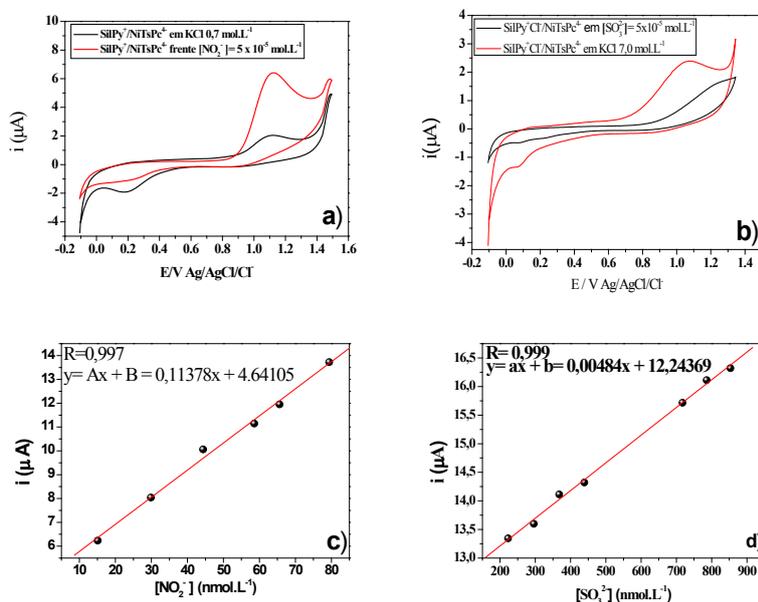


Figura 4: (a) Perfil voltamétrico, por VC, do EQM frente ao $[\text{NO}_2^-]= 5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (b) Perfil voltamétrico, por VC, do EQM frente ao $[\text{SO}_3^{2-}]= 5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (c) Curva de calibração do $[\text{NO}_2^-]= 15,08$ à $79,39 \text{ nmol.L}^{-1}$ (d) Curva de calibração do $[\text{SO}_3^{2-}]= 222,77$ à $853,08 \text{ nmol.L}^{-1}$.

CONCLUSÕES

A partir dos espectros de UV-VIS verificou-se o aumento da absorvância em função do número de bicamadas ($R=0,999$) indicando que a mesma quantidade de material é depositada a cada bicamada. A espectroscopia de IV indicou a existência de interação no compósito. Os estudos de AFM revelaram que não há vantagem em crescer filmes muito espessos, pois existe uma tendência na diminuição da área superficial com o aumento do número de bicamadas. Pela VC, observou-se que o eletrodo modificado com o filme $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{NiTsPc}^+$ apresenta processos do anel Pc^6 à Pc^5 e do centro metálico da ftalocianina Ni^{+2} à Ni^{+3} . O eletrodo modificado $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{NiTsPc}^+$ foi utilizado como sensor para a determinação de íons NO_2^- e SO_3^{2-} a baixas concentrações (da ordem de $10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$) pela técnica de VOQ. O filme $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{NiTsPc}^+$ com duas bicamadas apresentou a melhor resposta frente a estes analitos.

AGRADECIMENTOS: UEPG, CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] Fujiwara, S. T.; Gushikem, Y.; Alfaya, R. V.S.; Colloids and Surfaces A; 178; 135–141; 2000.
- [2] Santos, W.J.R.; Lima, P.R.; Tanaka, A.A.; Tanaka, S.M.C.N.; Kubota, L.T.; FoodChemistry; 113; 1206–121; 2009.
- [3] AOAC (1995) In: Cunnif P (ed) AOAC Official Method 962.16, 16 th edn, vol II.
- [4] Jesus, C.G.; Santos, V.; Canestraro, C.; Zucolotto, V.; Fujiwara, S. T.; Gushikem, Y.; Wohnrath, K.; Pessoa, C. A.; Journal of Nanoscience and Nanotechnology; Vol.11; 3499–3508; 2011.

DEPOSIÇÃO ELETROFORÉTICA DE FILMES LACASE/AMIDO EMPREGADOS NA QUANTIFICAÇÃO DE DOPAMINA

José Luiz Bott Neto, Luiz Henrique Dall'Antonia¹

¹ Departamento de Química/ Universidade Estadual de Londrina – Londrina (PR), Brazil.
luizh@uel.br

RESUMO: Dopamina é um importante neurotransmissor presente no sistema nervoso dos mamífero sendo que e a sua baixa concentração pode causar diversas anomalias. A sua quantificação torna-se muito importante, para tanto eletrodos modificados podem ser uma ótima alternativa para uma rápida análise, a facilidade e seu baixo custo de construção, além de sensibilidade e seletividade. No presente trabalho é reportada a imobilização da enzima lacase (NOVOZYM 51003®) junto com um polissacarídeo vegetal (amido de milho) pela técnica de eletroforese. Foram realizados estudos do comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados de lacase com amido de milho para determinação do neurotransmissor dopamina, sendo utilizado como mediador o sal 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), ABTS. A utilização de amido de milho como um possível estabilizante surgiu como uma alternativa eficiente e barata em comparação aqueles de alto custo utilizados comercialmente.
Palavras-chave: Eletrodo modificado, Lacase, amido de milho, dopamina, eletroforese.

INTRODUÇÃO

A dopamina (DA) é um importante neurotransmissor do sistema nervoso dos mamíferos, sendo responsável por desordens neurológicas, quando encontrada em concentração baixas. Essas desordens neurológicas podem estar associados a doenças como o Mal de Parkinson, Alzheimer e infecção por HIV. Portanto, sua detecção e quantificação são de grande interesse [1].

O desenvolvimento de eletrodos modificados com agentes biológicos tem recebido grande destaque por grupos de pesquisa, devido ao seu baixo custo de construção, facilidade de análises, a possibilidade de miniaturização do dispositivo e principalmente a sensibilidade e seletividade. Devido a esta sensibilidade, diversos biossensores têm sido desenvolvidos para diversos analitos [2].

Uma possibilidade de determinação de DA é o emprego da enzima lacase, como material biológico ativo, em eletrodos modificados, uma vez que esta é capaz de oxidar fenóis, amins e ligninas acopladas ao oxigênio, podendo ser utilizada na quantificação de DA. A lacase tem a capacidade de oxidar esses diferentes substratos com a concomitante redução do oxigênio à água devido à afinidade específica do oxigênio como receptor de elétrons [3].

A imobilização da enzima é um dos pontos mais críticos da construção de um eletrodo modificado, uma vez que pode afetar a atividade enzimática [4]. Para a construção do filme, utilizou-se a técnicas de deposição por eletroforese (EPD), que consiste na deposição do material em um substrato condutor de cargas opostas sobre a aplicação de um campo elétrico [5]. Apesar de ser um processo por via úmida, EPD oferece fácil controle da espessura e morfologia de um filme depositado através do simples ajuste do tempo de deposição e potencial aplicado [6].

Desta forma, o apresentado trabalho tem por objetivo a construção de um eletrodo modificado de lacase, obtida do fungo *Aspergillus Oryzae*, suportado em polissacarídeo (amido de milho) para a quantificação de DA. Sendo que os filmes foram obtidos pelo método de deposição eletroforetica. Os eletrodos modificados foram estudados quanto as propriedades eletroquímicas dos mesmos. A investigação ressalta a estabilização da enzima com o polissacarídeo, obtendo-se uma melhor repostas dos eletrodos.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho, foram obtidos da Sigma-Aldrich e utilizados como recebidos. A enzima lacase proveniente do fungo *Aspergillus Oryzae*, foi gentilmente cedida pela Novozymes. O material de suporte utilizado na construção dos eletrodos modificados foi uma lamina politereftalato de etileno recoberta com oxido de índio dopado com prata e ouro, FTI (Delta Techonologies - $R \leq 100 \Omega$). As laminas foram devidamente limpas em acetona e hidróxido de amônio em banho de ultrassom (UltraCleaner - 1400) por dez minutos.

Os eletrodos modificados foram preparados pela deposição do agente biológico e do polissacarídeo pela deposição por EPD, para tanto se construiu uma célula eletroquímica de forma que fosse possível fixar duas laminas de FTI paralelas e com as faces condutoras viradas uma de frente para outra. Para a otimização dos depósitos foram utilizadas soluções de amido em diferentes concentrações: 0,05, 0,075 e 0,1g/L, sendo também variada a concentração de lacase entre 1, 2 e 3 g/L. Ainda, o tempo de deposição utilizado (5, 10 e 15 min), bem como o potencial plicado (0,5, 1,0 e 1,5 V) foram variados.

Para o estudo da influencia do pH e da concentração de ABTS preparou-se três soluções de 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) nas concentrações 1, 2 e 3 mmol L⁻¹ com 0,1 mol L⁻¹ de NaCl em pH 1,

2 e 3, obtendo-se um total de 9 experimentos. Para a construção da curva de calibração usou-se uma solução de ABTS 2 mmol L⁻¹ em pH 3,0 e uma solução dopamina 10 mmol L⁻¹.

As análises eletroquímicas foram realizadas em uma célula eletroquímica convencional, tendo como eletrodos referência o Ag/AgCl (KCl 3,0M), aos quais todos potenciais do presente trabalho estão referendados, e com eletrodo auxiliar uma tela de platina. Todos os experimentos foram realizados em um potenciostato (Autolab 128N).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos foram realizados com a presença ABTS, que irá se comportar como composto padrão para medida da atividade enzimática, reduzindo o sítio ativo da lacase para posterior determinação da quantidade de elétrons envolvida na reoxidação do mesmo sítio ativo.

A voltametria cíclica (VC) realizada em meio de KCl 0,10 mol L⁻¹, ABTS 3,0 mmol L⁻¹, DA 150,0 μmol L⁻¹ mostrou uma densidade de corrente de oxidação em 0,57 V e de redução em 0,40 V tanto para os eletrodos estudados na presença e na ausência de polissacarídeo. Ainda, a realização de diversos ciclos mostrou que não há problema quanto a passivação do filme, pois os picos de densidade de corrente se sobrepuseram, não apresentando decaimentos nos valores de densidade de corrente, bem como variação nos valores dos potenciais de pico. O estudo em diferentes concentrações de DA revelou que o eletrodo somente com a lacase apresenta um crescimento da densidade de corrente de oxidação exponencial ao aumento da concentração de DA [6], porém o eletrodo contendo o polissacarídeo amido de milho mostra um aumento de densidade de corrente linear com o acréscimo da concentração de dopamina, apresentando um bom coeficiente de correlação ($r^2 = 0,998$) (Figura 1), cuja a sensibilidade foi igual a 117 mA mol⁻¹ L cm⁻², superior a encontrada para filmes sem o polissacarídeo [6]

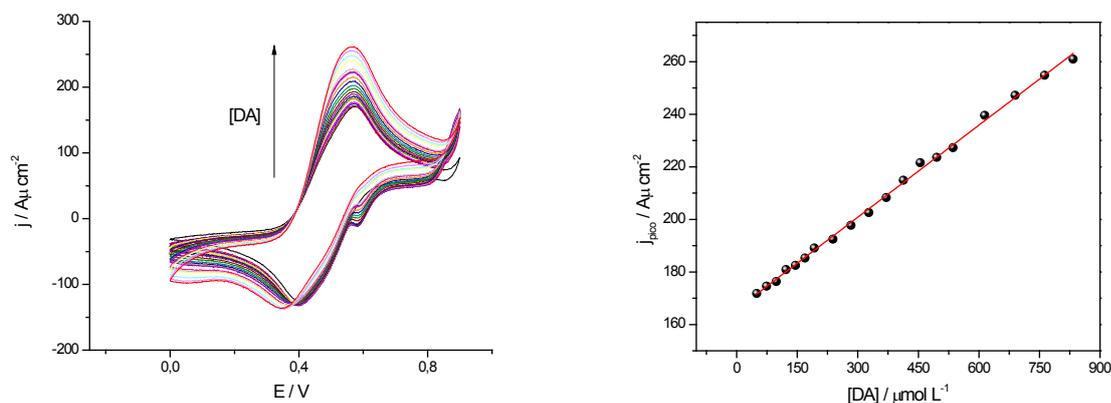


Figura 1: Respostas eletroquímicas para eletrodos modificados com enzima lacase na presença de amido de milho em soluções contendo o mediador ABTS, 3,0 mmol L⁻¹, KCl 0,10 mol L⁻¹, e crescente concentração de dopamina (entre 1,0 e 800,0 μM), pH mantido igual a 3, $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$: (A) voltametria cíclica, (b) densidade de corrente em função da concentração de dopamina.

A resposta de densidade de corrente foi registrada como parâmetro de melhor resposta, quanto a otimização das condições de deposição dos filmes contendo a enzima e o polissacarídeo, amido de milho. Os resultados são mostrados na Tabela 1, e indicam que os eletrodos que apresentaram melhor resposta foram aqueles depositados a 0,5 V por 10 minutos num banho contendo 0,2 g L⁻¹ de enzima e 0,1 g L⁻¹ de amido. Altos potenciais de deposição, altos tempos de pode estar relacionado a uma grande quantidade de material depositado bloqueando os sítios ativos dos eletrodos modificados.

Para a otimização da resposta dos eletrodos modificados com a lacase e o amido, foram realizados estudos do efeito de diferentes parâmetros, tais como: variação da concentração de ABTS (1,0, 2,0 e 3,0 mmol L⁻¹) e do pH (3,0, 5,0 e 7,0). Para o eletrodo lacase, a maior densidade de corrente de redução foi obtida em pH 3,0 e ABTS 3,0 mmol L⁻¹, indicando assim que o pH ótimo da enzima imobilizada é aquele próximo ao da enzima livre em solução, pH 3,5 [6].

Tabela 1: Parâmetros analisados para a otimização do biossensor de lacase.

Parâmetro	Faixa Estudada	Valor ótimo
Concentração da enzima (g/L)	1 - 3	2
Concentração de amido (g/L)	0,05 - 1	0,1
Tempo de deposição (min)	5 - 15	10
Potencial Deposição (V)	0,5 a 1,0	0,5

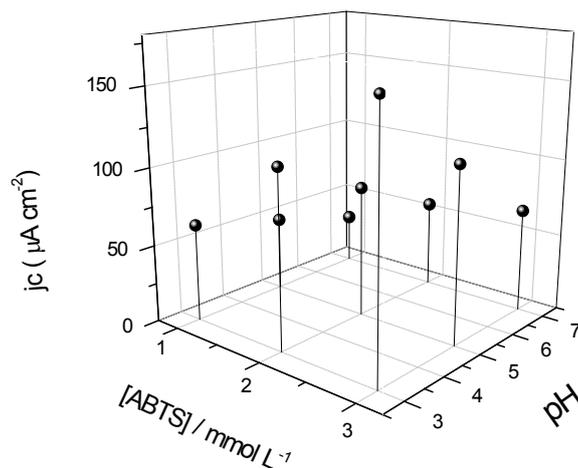


Figura 2: Relação da densidade de corrente catódica com a concentração de ABTS e com o pH para o eletrodo de lacase.

CONCLUSÕES

O biossensor de lacase suportado em amido de milho apresentou uma boa faixa de resposta $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$. A curva analítica apresentou um coeficiente de correlação igual 0,9981 e uma sensibilidade $116,7 \text{ mA mol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$. Durante a curva de calibração o potencial de redução manteve-se constante. Sendo possível o seu uso na determinação de DA.

AGRADECIMENTOS: Fundação Araucária (Proc. 15585/10), CNPq (Proc. 478272/2007), NOVOZYMES e ao Programa CNPq/PIBIC/ProPPG/UEL pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

- [1] Lin, L.; Chen, J.; Yao, H.; Chen, Y.; Zheng, Y; Lin, X. Simultaneous Determination of Dopamine, Ascorbic Acid and Uric Acid at Poly (Evans Blue) Modified Glassy Carbon Electrode. *Bioelectrochemistry*. 73, pp. 11-17, 2008.
- [2] Alfaya, A. A. S.; Kubota, L. T.; Utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Química Nova*, v. 25 (5), p. 835-841, 2002.
- [3] Wilkolazka, A. N.; Ruzgas, T.; Gorton, L. Use of Laccase-Modified Electrode for Amperometric Detection of plant Flavonoids. *Enzyme and Microbial Technology*. 35, pp. 238-241, 2004
- [4] Zhao, W.; Xu, J. J.; Chen, H. Y. Electrochemical Biosensors Based on Layer-by-Layer Assemblies. *Electroanalysis*. 18(18), pp. 1737-1748, 2006
- [5] Besra, L.; Liu, M. A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD). *Progress in Materials Science*, 52, 2007.
- [6] Cortes, A. P., Dissertação de Mestrado. UEL, 2008.

SENSOR PARA ÓXIDO NÍTRICO OBTIDO PELA MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE OURO COM MESO-METALOPORFIRINA DE COBRE DERIVADA DO LÍQUIDO DA CASTANHA DO CAJU

Vanessa N. dos Santos¹, Janaína L. Leitinho², Naiara H. Falcão², Túlio I. S. Oliveira², Adriana N. Correia¹, Selma E. Mazzetto², Pedro de Lima-Neto¹

¹ Departamento de Química Analítica e Físico Química - UFC, Fortaleza - CE - Brasil;

² Departamento de Química Orgânica e Inorgânica - UFC, Fortaleza - CE - Brasil.

vanessands@gmail.com

RESUMO: Meso-metaloporfirina de cobre (II) derivada do Líquido da Casca da Castanha do Caju (LCC) foi eletropolimerizada sobre a superfície do eletrodo de ouro e o comportamento eletroquímico para a aplicação deste sistema como sensor para NO foi avaliado, na ausência e presença de interferentes. Observou-se que a intensidade de corrente do pico anódico relativo à oxidação de NO na superfície do eletrodo modificado é três vezes maior que a do pico observado para o mesmo processo na superfície de ouro não modificado. As curvas analíticas para NO na faixa de concentração de $2,85 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,82 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foram obtidas e a partir dos resultados, o limite de detecção de $6,18 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ foi calculado. A presença dos interferentes dopamina, serotonina e NO_2 nas análises mostraram que estes interferem, porém não prejudicam a detecção do NO pelo sistema em estudo, mostrando o potencial deste sistema como sensor para NO.

Palavras-chave: metaloporfirina, LCC, óxido nítrico, eletrodo modificado.

INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula que tem a capacidade de ser benéfica, ou potencialmente tóxica, dependendo de sua concentração. Entretanto, monitorar a concentração de NO é difícil devido ao seu curto tempo de vida, elevada atividade química, baixíssima concentração e alta reatividade com outros componentes biológicos como oxigênio, ou hemoglobina, gerando as formas nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) [1].

A vantagem dos métodos eletroquímicos na determinação da concentração de NO baseia-se no fato de serem simples, rápidos e sensíveis. Assim, o uso de sensores eletroquímicos pode permitir a análise de NO *in vivo* e em tempo real [1]. Uma consideração importante deve ser levada em conta ao se construir um sensor eletroquímico para a determinação de NO: ele deve ser capaz de determinar NO na presença de íons interferentes como NO_2^- e neurotransmissores [2]. Para este fim, destaca-se a técnica de modificação de superfície de eletrodos a partir da eletropolimerização utilizando metaloflrocianinas [2] e metaloporfirinas [3].

O objetivo deste trabalho foi a modificação do eletrodo de ouro com a meso-metaloporfirina de cobre (II) derivada do Líquido da Casca da Castanha de Caju (LCC) [4], subproduto derivado do agronegócio, abundante em toda a região Nordeste do país, e a avaliação do comportamento eletroquímico deste sistema como sensor para NO.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A meso- metaloporfirina de cobre foi sintetizada de acordo com o procedimento descrito na literatura [4]. As análises voltamétricas foram executadas em um potenciostato/galvanostato da AUTOLAB PGSTAT 30 interfaceado a um computador com o programa GPES 4.0. A modificação da superfície do eletrodo de ouro com metaloporfirina de cobre (II) foi realizada por voltametria cíclica. O filme foi formado com 25 ciclos de 0 a 1,45 V e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , utilizando eletrólito PTBA ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) contendo $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ da porfirina, sendo Ag/AgCl em $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2$ + $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PTAB o eletrodo de referência e chapa de platina com 1 cm^2 o contraeletrodo.

A aplicabilidade deste eletrodo modificado como sensor de NO foi avaliada pela técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ), utilizando os seguintes parâmetros: frequência de pulso de potencial (f) de 100 s^{-1} , amplitude do pulso (a) de 50 mV e incremento de varredura (ΔE_s) de 2 mV. Empregou-se disco de ouro como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl saturado em KCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrodo de referência, chapa de platina de 1 cm^2 , como contraeletrodo e solução de Na_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte. O efeito dos interferentes NO_2^- , dopamina e serotonina na detecção de NO foi avaliado, pela adição desses na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os voltamogramas cíclicos da meso porfirina metalada com cobre (II) e o voltamograma cíclico do eletrodo de ouro não modificado e eletrodo modificado em presença de NO na concentração $2,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ estão mostrados na Figura 1.

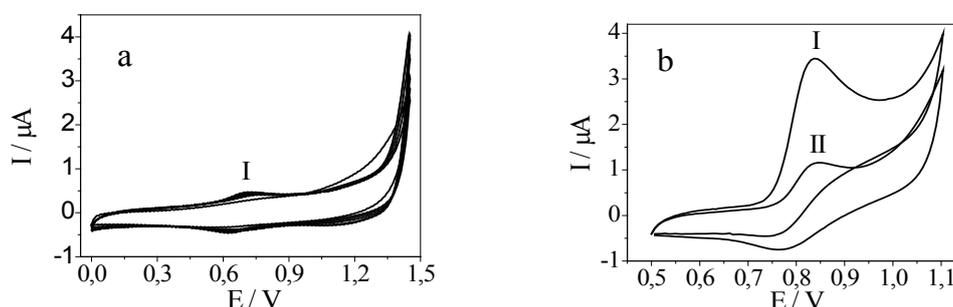


Figura 1: a) Perfil voltamétrico da meso porfirina de cobre (II) em meio de diclorometano e PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e b) perfil voltamétrico do NO sobre a superfície de ouro modificado (I) e não modificado.

O voltamograma cíclico da porfirina (Fig. 1a) mostrou um processo redox em $0,63 \text{ V}$ atribuído a uma transferência interna de elétrons entre o anel porfirínico e o substituinte [5]. Na Figura 1b observa-se o processo de oxidação do NO em torno de $0,85 \text{ V}$ que apresentou uma intensidade de corrente de pico três vezes maior sobre a superfície de ouro modificada que a observada para o mesmo processo na superfície de ouro não modificada.

As curvas analíticas para NO na faixa de concentração de $2,85 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,82 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foram obtidas, utilizando o método da adição de padrão, sendo que uma boa relação linear entre a corrente de pico e a concentração de NO ($I_p(\mu\text{A}) = (-1,40 \pm 0,60) + (0,73 \pm 0,04) [\text{NO}]$) foi observada. O teste t foi realizado devido ao valor negativo do coeficiente linear. Para 95% de confiança, o valor de t calculado é 4,15. Como o valor tabelado de t para $n = 3$ é 4,30, tem-se que, estatisticamente, o valor do coeficiente linear é zero. A partir dos resultados, o limite de detecção de $6,18 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ foi calculado, tal como recomendado pela IUPAC [6], e está em concordância com os valores obtidos para ultramicroeletrodo de ouro modificado com ftalocianina de ferro [7]. Estes resultados mostram a potencialidade do eletrodo modificado para atuar como sensor eletroquímico para NO.

A oxidação eletroquímica do óxido nítrico no eletrodo modificado em presença de dopamina e serotonina foi estudada, e os voltamogramas de onda quadrada obtidos estão mostrados na Figura 2.

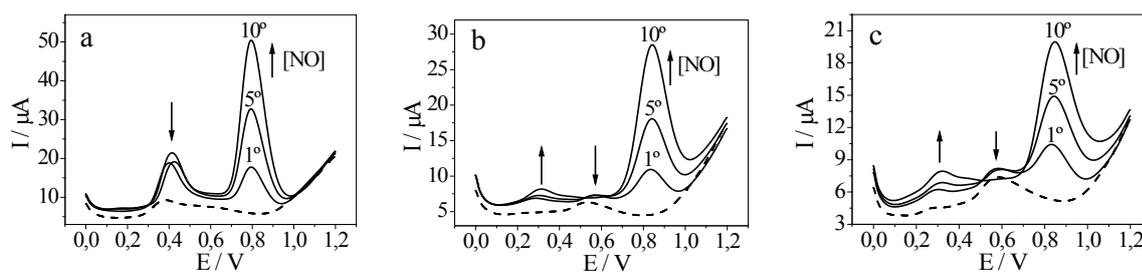


Figura 2: Voltamogramas de onda quadrada para a) dopamina, b) serotonina e c) ambas as moléculas na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na ausência de NO (---) e na presença de NO (—) na faixa de concentração $8,53 \times 10^{-6}$ a $3,37 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Verificou-se que o potencial de oxidação de NO ocorre em região diferente dos potenciais de oxidação da dopamina e serotonina. As Figuras 2a e 2b mostram os voltamogramas de onda quadrada para dopamina e serotonina na presença de NO, respectivamente, onde é possível observar que o pico de oxidação da dopamina em $0,35 \text{ V}$ desaparece e um novo aparece em torno de $0,40 \text{ V}$. Além disso, o pico de oxidação da serotonina em $0,55 \text{ V}$ diminui com o aumento da concentração de NO, um novo pico surge em torno de $0,30 \text{ V}$. Os voltamogramas de onda quadrada para NO na concentração $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ambas as moléculas (Fig. 2c) evidenciam, como esperado, um pico em torno de $0,30 \text{ V}$, um pico largo em $0,40 \text{ V}$ detectado apenas em altas concentrações de NO e um pico em $0,55 \text{ V}$.

Observou-se que a inclinação da curva analítica obtida na presença dessas moléculas ($I_p(\mu\text{A}) = (0,41 \pm 0,64) + (0,37 \pm 0,04) [\text{NO}]$) é menor que a obtida na ausência destes, confirmando que essas espécies em conjunto interferem na determinação de NO. Isso pode ser explicado pelo fato de que o NO é consumido por esses interferentes, pois é sabido

da literatura que o NO promove a desaminação de aminas naturais [8]. Assim, os resultados sugerem que o pico de oxidação em torno de 0,40 V na Figura 2a e em torno do 0,3 V na Figura 2b, estão relacionados com a oxidação dos produtos de desaminação da dopamina e a serotonina, respectivamente.

Também foi avaliada a interferência de NO_2^- na detecção de NO utilizando o eletrodo modificado. O nitrito apresentou um pico anódico em torno de 0,80 V, mesmo potencial onde ocorre a oxidação de NO. Esse resultado justifica o fato da inclinação da curva analítica para a oxidação de NO obtida na presença de NO_2^- ($I_p(\mu\text{A}) = (2,69 \pm 0,65) + (1,26 \pm 0,04) [\text{NO}]$) ser maior que a obtida na ausência deste interferente, confirmando que esta espécie interfere na determinação de NO. Este comportamento está em concordância com resultados relatados na literatura [7].

CONCLUSÕES

A modificação da superfície de ouro com a *meso*-porfirina de cobre (II) ocorreu de forma satisfatória após 25 ciclos de voltametria cíclica. O eletrodo modificado, a partir das relações lineares entre a corrente de pico e a concentração de NO na ausência e presença de interferentes, tais como NO_2^- , dopamina e serotonina, demonstrou potencial para aplicação com sensor para NO.

AGRADECIMENTOS: Petrobras, CNPq (INCT – Projeto Nonobiosimes), CAPES (PROCAD NF 2424/2008), FINEP, FUNCAP e ANP.

REFERÊNCIAS

- [1] WANG, Y.; HU, S. “A novel nitric oxide biosensor based on electropolymerization poly (toluidine blue) film electrode and its application to nitric oxide released in liver homogenate”. *Biosens. Bioelectron.* 22: 10-17, 2006.
- [2] VILAKASI, S. L.; NYOKONG, T. “Voltammetric determination of nitric oxide on cobalt phthalocyanine modified microelectrodes” *J. Electroanal. Chem.* 512: 56-63, 2001.
- [3] ONI, J.; DIAB, N.; RADTKE, I.; SCHUHMANN, W. “Detection of NO release from endothelial cells using Pt micro electrodes modified with a pyrrole-functionalised Mn(II) porphyrin”. *Electrochim. Acta* 48: 3349-3354, 2003.
- [4] PUANGMALEE, S.; PETSOM, A.; THAMYONGKIT, P. “A porphyrin derivative from cardanol as a diesel fluorescent marker” *Dyes Pigments* 82: 26-30, 2009.
- [5] BENNETT, J. E.; BUREWICZ, A.; WHEELER, D. E.; ELIEZER, I.; CZUCHAJOWSKI, L.; MALINSKI, T. “Conductive polymeric films of *meso*-tetrakis[2,2]-*para*-cyclophanyl-metalloporphyrins—spectroelectrochemistry and catalytic properties” *Inorg. Chim. Acta* 271: 167-173, 1998.
- [6] MOCÁK, J.; BOND, A. M.; MITCHEL, S.; SCOLLARY, G. “A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques (technical report)” *Pure Appl. Chem.* 69: 297-328, 1997.
- [7] KIM, I. K.; CHUNG, H. T.; OH, G. S.; BAE, H. O.; KIM, S. H.; CHUN, H. J. “Integrated gold-disk microelectrode modified with iron(II)-phthalocyanine for nitric oxide detection in macrophages” *Microchem. J.* 80: 219-226, 2005.
- [8] BUTLER, A. R.; WILLIAMS, D. L. “The physiological-role of nitric-oxide” *Chem. Soc. Rev.* 22: 233-241, 1993.

NOVO SENSOR COM ESPÉCIE SUPRAMOLECULAR PARA A DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DO PARACETAMOL

Monize Martins da Silva¹, Alzir Azevedo Batista¹, Andre Luiz Bogado² e Luis Rogério Dinelli²

¹ Universidade Federal de São Carlos- UFSCar, São Carlos - SP - Brasil;

² Universidade Federal de Uberlândia- Faculdade de Ciências Integradas do Pontal, Ituiutaba - MG - Brasil, monize_martins@yahoo.com.br

RESUMO: No presente trabalho a porfirina base livre 5,10,15,20-(tetrapiridil)porfirina- [TPyP]- foi sintetizada pela reação entre o pirrol e o 4-piridinacarboxialdeído, sendo que a mesma foi metalada utilizando-se acetato de manganês (II) obtendo-se como produto a metaloporfirina [Mn-TPyP]CH₃COO, a qual, por sua vez, posteriormente deu origem ao {Mn-TPyP[RuCl₃(dppb)]₄}CH₃COO, por sua reação com o complexo *mer*-[RuCl₃(dppb)(H₂O)], na proporção de 1 : 4, respectivamente. Para a caracterização destas porfirinas foram utilizadas técnicas espectroscópicas, tal como absorção na região do Ultravioleta/Visível/Infravermelho. O estudo eletroquímico foi realizado por voltametria cíclica, através do qual foi obtido um filme usando-se a supramolécula {Mn-TPyP[RuCl₃(dppb)]₄}CH₃COO. Como eletrodo foi usado o carbono vítreo, obtendo-se assim um novo sensor eletroquímico, o qual foi utilizado na detecção e quantificação do paracetamol, pelo método de adição padrão do fármaco comercial.

Palavras-chave: Porfirina, Polirutenada, Eletrodo modificado e Paracetamol

INTRODUÇÃO

A porfirina 5,10,15,20-tetrapiridilporfirina também chamada de TPyP tem sido utilizada como precursora de espécies supramoleculares e utilizadas como sensores em eletrodos modificados. Os eletrodos quimicamente modificados (EQM's) resultam da imobilização intencional de um agente modificador sobre a superfície do eletrodo. As metaloporfirinas aparecem como uma das classes mais aceitas para a formação de eletrodos modificados, devido as suas funções como mediadores redox, catalisadores ou centro seletivo, via ligante axial. As metaloporfirinas têm se destacado principalmente por sua capacidade de catalisar várias reações, muitas vezes de forma seletiva. Verifica-se que esses compostos também podem conferir estabilidade a eletrodos sólidos, minimizando os problemas de envenenamento superficial. A imobilização de metaloporfirinas na superfície do eletrodo é através do depósito eletroquímico que oferece a possibilidade da eletrogeração do filme em eletrodo de superfície pequena e de geometria complexa^[1].

Os eletrodos modificados por polimerização eletroquímica de porfirinas polirutenadas engloba múltiplas perspectivas, tanto de estudos de caráter mais fundamental, como de novas aplicações a serem exploradas. Essa modificação é feita com o objetivo de transferir as propriedades químicas e físico-químicas do agente modificador para a superfície do substrato, de tal modo que seja possível obter um comportamento previamente planejado do conjunto eletrodo/reagente. A construção de interfaces eletroquímicas com sistemas organizados de forma racional pode levar a obtenção de reatividade e seletividade desejadas para aplicações de interesse^[1].

O interesse pelas áreas de sensores e novos materiais tem permitido o desenvolvimento de novos compostos supramoleculares. Sendo assim pretende-se obter a supramolécula {Mn-TPyP[RuCl₃(dppb)]₄}CH₃COO e eletropolimerizá-la na superfície do eletrodo de carbono vítreo, a fim de se investigar a formação de filme e de obter um novo sensor para que este possa ser utilizado na detecção e quantificação de paracetamol em fármacos.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A porfirina base livre 5,10,15,20-(4-tetrapiridil)porfirina foi sintetizada pela adição lenta e simultânea de, 0,05 mol (3,35 g) de pirrol recém destilado e 0,05 mol (5,35 g) de 4-piridinacarboxialdeído, em 350 mL de ácido acético a 90° C, sob agitação magnética durante 6 horas. Todo solvente foi removido por evaporação rotatória e em seguida diluído com álcool etílico P.A. e precipitado com água destilada, o qual posteriormente foi filtrado, seco a vácuo e purificado por cromatografia em coluna de sílica flash. A síntese da porfirina metalada [Mn-TPyP]CH₃COO foi realizada dissolvendo-se $2,47 \times 10^{-4}$ mol (0,150 g) da TPyP em 100 mL ácido acético e adicionando-se lentamente $6,17 \times 10^{-4}$ mol (0,149 g) de acetato de manganês. A reação foi deixada sob refluxo por aproximadamente 6 horas, em seguida todo solvente foi evaporado e seco sob vácuo por 24 horas. Dissolve-se com água destilada a 62°C e então precipitou-se com uma solução de acetato de sódio 2 mol.L⁻¹. O precipitado foi filtrado e lavado com água gelada. O complexo *mer*-[RuCl₃(dppb)(H₂O)] foi sintetizado segundo o procedimento descrito na literatura^[2]. A porfirina polirutenada {Mn-TPyP[RuCl₃(dppb)]₄}CH₃COO foi sintetizada utilizando uma solução com 27 mL de clorofórmio e 3 mL de metanol em um balão, sob agitação magnética, onde foi adicionado $2,11 \times 10^{-5}$ mol (0,015g) da [Mn-TPyP]CH₃COO até a sua dissolução total, em seguida $9,1 \times 10^{-5}$ mol (0,0592g) do complexo *mer* - [RuCl₃(dppb)(H₂O)]

foi adicionado e a reação ficou sob agitação durante 4 horas. Terminada a reação, evaporou-se metade do solvente e adicionou éter etílico para obtenção de um precipitado, o qual foi filtrado e seco a vácuo.

Para a obtenção do filme foi utilizando voltametria cíclica, onde primeiramente montou-se uma célula eletroquímica (10,0 mL) utilizando-se como eletrólito suporte hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (HTBA 0,1 mol.L⁻¹), com os eletrodos de trabalho (carbono vítreo), contra-eletródo (platina) e o de referência (Ag/AgCl). Em seguida, a porfirina {Mn-TPyP[RuCl₃(dppb)]₄}CH₃COO foi adicionada. A voltametria cíclica foi iniciada partindo-se do potencial de repouso para a região anódica, em uma faixa de potencial conhecida (-0,4 a 1,0 V) por 4 ciclos, com uma velocidade de varredura de 100 mV/s. O processo de voltametria cíclica terminou na região catódica, pois assim a espécie aderida na superfície do eletrodo ficou em sua forma reduzida.

A curva analítica foi construída pelo seguinte procedimento: a partir de uma solução estoque do analito (10⁻² mol.L⁻¹), foram realizadas 5 adições de 100 µL e posteriormente 2 adições de 500 µL em uma célula eletroquímica com um volume inicial de 20 mL de acetato de sódio (0,1 mol.L⁻¹) e um voltamograma foi registrado para cada adição. Considerando as diluições, foram calculados os valores de concentração de cada adição. Em seguida construiu-se um gráfico de concentração *versus* corrente anódica de pico. Para construção da curva de adição padrão utilizou-se um fármaco comercial contendo paracetamol (tylenol) e adicionou 50 µL da amostra que supostamente esta em uma concentração de 104,57 µ.mol.L⁻¹ em uma célula eletroquímica contendo as mesmas condições na qual foi construída a curva analítica e um voltamograma foi registrado, em seguida realizou-se outras 5 adições de 100 µL da solução estoque de paracetamol (padrão) e em cada adição foi registrado um voltamograma e então construiu um gráfico de concentração *versus* corrente anódica de pico e determinou-se a concentração de paracetamol no tylenol, pelo método de adição padrão. Foi realizada triplicata da adição padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível foi bastante útil para a caracterização dos complexos em estudo, pois a porfirina base livre possui uma banda Soret em, 416 nm ($\epsilon=4,47 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$), e mais quatro bandas (Q) na região acima de 450 nm, de menor intensidade, em 512 ($\epsilon=2,96 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$), 548 nm ($\epsilon=1,16 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) e 588 ($\epsilon=1,32 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$), 647 nm ($\epsilon=6,36 \times 10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$), as quais são devidas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ da porfirina. Essas bandas são devido ao tipo de simetria apresentada pela porfirina, que no caso da base livre é C_{2h}, onde o orbital e_g está desdobrado em dois. Para a porfirina metalada observou-se uma diminuição no número de transições, pois o número de bandas Q diminuiu para duas. Essa diminuição no número de transições é devido ao aumento de simetria da molécula da porfirina, passando de uma simetria C_{2h} para D_{4h}. Quando metalada, a banda Soret apareceu 475 nm ($\epsilon=8,93 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) e as bandas Q em 579 nm ($\epsilon=9,19 \times 10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) e 613 nm ($\epsilon=7,04 \times 10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$). O complexo {Mn-TPyP[RuCl₃(dppb)]₄}CH₃COO apresentou muito pouca diferença em seu espectro eletrônico, quando este é comparado ao espectro da porfirina [Mn-TPyP]CH₃COO. Isso implica em dizer que os complexos periféricos não interferem na simetria local da porfirina e, portanto, o espectro eletrônico da porfirina polirutenada é apenas a soma do espectro eletrônico da porfirina, com o espectro do complexo periférico de rutênio.

Na análise dos dados de espectroscopia de absorção na região do infravermelho foram encontradas muitas dificuldades para a atribuição de todas as bandas, devido ao elevado número de possíveis vibrações, tanto do anel porfirínico como dos complexos de rutênio periféricos. Uma maneira bastante simplificada de se atribuir os estiramentos e as deformações da ligação P-C foi comparar os espectros das porfirinas sem os complexos de rutênio periféricos com as porfirinas que os contêm, conforme mencionado na literatura [3]. Para a porfirina polirutenada foram encontrados estiramentos ν P-C em 1096, 1485 cm⁻¹ e deformações δ P-C em 513 e 696 cm⁻¹. Observou-se uma baixa variação na frequência de estiramento ou deformação P-C, o que indica que há pouca influência do metal interno da porfirina com o conjunto P-C dos grupos periféricos. Os estiramentos Mn-N não foi possível de ser observado, pois se encontrava em região de baixa energia, dificultando, assim, a sua atribuição. Os estiramentos ν Ru-Cl foram atribuídos na região de 320 cm⁻¹ para a porfirina polirutenada. As bandas referentes ao anel porfirínico, em sua maioria, foram encobertas pelas bandas do complexo periférico. Entretanto, o estiramento ν C=N da porfirina (piridina periférica) foi observado em 1608 cm⁻¹.

A forma do voltamograma (Figura 1) para a obtenção do filme indica que realmente alguma espécie está sendo aderida no eletrodo, pois observou-se um aumento na corrente caracterizando que alguma espécie está sendo eletrodepositada na superfície do eletrodo, e quando retirou-se o eletrodo da solução, observou-se uma cor dourada na superfície do mesmo. A formação do filme polimérico na superfície do eletrodo ocorre quando a espécie de Ru(III) é reduzida na superfície do eletrodo, esta forma uma espécie intermediária de Ru(II), que então reage com a espécie de Ru(III) em solução, formando um complexo binuclear de valência mista.

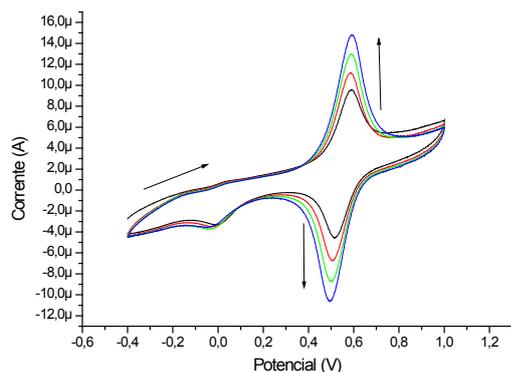


Figura 1: Obtenção do filme, com 4 ciclos.

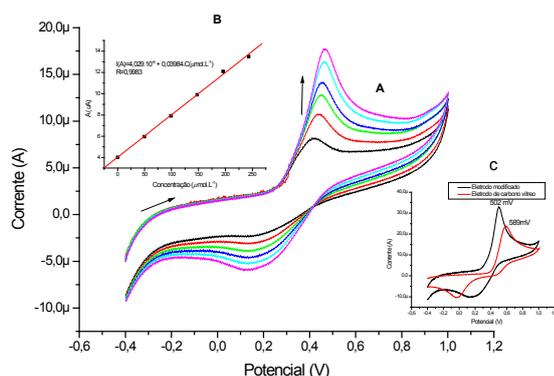


Figura 2:(A) Voltamograma cíclico com o aumento da concentração de paracetamol. (B) Curva de adição padrão (C) Comparação da resposta do eletrodo modificado com a do eletrodo de carbono vítreo limpo.

O aumento linear da corrente de pico com o aumento da concentração do paracetamol na curva de calibração sugeriu a possibilidade da determinação quantitativa do fármaco. Através da adição do padrão foi possível se determinar quantitativamente a concentração de paracetamol no tylenol, pois a reta obtida na curva padrão apresentou uma linearidade de 0,9983 (Figura 2B). A equação de reta foi $I(A) = 4,029 \cdot 10^{-6} + 0,03984 \cdot C (\mu.mol.L^{-1})$. A partir desta equação de reta determinou-se que a concentração de paracetamol é de $101,13 \pm 4,65 \mu.mol.L^{-1}$, ou seja a faixa de detecção obtida através do teste T com um índice de confiança de 95% é de 96,48 a $105,78 \mu.mol.L^{-1}$. sendo assim o eletrodo modificado foi eficiente na determinação quantitativa do paracetamol, pois a concentração do mesmo supostamente é de $104,57 \mu.mol.L^{-1}$, esta entre a faixa aceita. O eletrodo modificado apresentou melhor desempenho, tanto de potenciais de oxidação (potenciais mais catódicos) como de maior corrente de pico de oxidação em relação ao eletrodo convencional (Figura 2C). Ou seja, o novo sensor obtido com o eletrodo modificado com a porfirina polirutenada é promissor na detecção de paracetamol em fármacos.

CONCLUSÕES

As técnicas usadas para as caracterizações foram importantes para a identificação dos compostos TPYP e [Mn-TPYP]CH₃COO, uma vez que a partir do espectro de absorção na região do ultravioleta/visível observou-se a presença de bandas características como a Soret e a da diminuição das bandas Q quando a porfirina foi metalada. No espectro da porfirina polirutenada observou-se apenas uma soma das bandas da porfirina com as bandas do complexo periférico de rutênio. Já na região do infravermelho foi possível fazer as atribuições das principais bandas dos complexos, e notou-se presença dos estiramentos νP-C, νRu-P e νRu-Cl característico do complexo *mer*-[RuCl₃(dppb)(H₂O)] na porfirina polirutenada. Utilizando-se a técnica de voltametria cíclica foi possível obter um eletrodo de carbono vítreo modificado com a porfirina {Mn-TPYP[RuCl₃(dppb)]₄}CH₃COO. Esse eletrodo modificado se mostrou um promissor sensor na determinação de paracetamol, pois ocorreu um deslocamento no potencial (589 para 502 mV), o que apresenta uma diminuição de interferentes. A curva de adição padrão foi útil na quantificação do fármaco, pois determinou-se que a concentração do paracetamol no tylenol é de $101,13 \pm 4,65 \mu.mol.L^{-1}$, ou seja, o valor obtido esta dentro da faixa determinada pelo teste T com um índice de confiança de 95%.

AGRADECIMENTOS: UFU, UFSCar, FAPEMig, CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] BARROS, V. P.; “ *Caracterização eletroquímica de metaloporfirinas e imobilização em filmes de pirrol eletropolimerizados: Preparação e Aplicação*”. Dissertação (Mestrado em Química) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, p.p.113, 2003.
- [2] DINELLI, L.R.; BATISTA, A.A.; WOHNATH, K.; ARAUJO, M.P.; QUEIROZ, S.L.; BONFADINI, R.; OLIVA, G.; NASCIMENTO, O.P.; CYR, P.W.; MACFARLANE, K.S. & JAMES, B.R. “Synthesis and characterization of [RuCl₃(P-P)(H₂O)] complexes; P-P = achiral or chiral, chelating ditertiary phosphine ligands”. *Inorg.Chem.* **38**: 5341, 1999.
- [3] EGOROVA, M.B.; DROBACHENKO, A.V. & POPOV, A.M. “Synthesis of mixedligand chelates of ruthenium(ii) with 2,2'-bipyridyl and bidentate phosphines”. *Koordinatsionnaya Khimiya*, **13**(4): 541, 1987.

DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DE H_2O_2 UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE Pt PELA TÉCNICA LbL

Dhésmon Lima¹, Clíciane Guadalupe de Jesus¹, Monalisa dos Santos¹, Vagner dos Santos¹, Karen Wohnrath¹, Christiana Andrade Pessoa¹

¹Departamento de Química - UEPG, Ponta Grossa - PR - Brasil. dhesmon.lima@hotmail.com

RESUMO: O presente trabalho propõe o desenvolvimento de um sensor amperométrico para H_2O_2 construído a partir da técnica LbL utilizando o cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano modificado por nanopartículas de Pt (Pt-SiPy⁺Cl⁻) e a ftalocianina tetrassulfonada de cobre (CuTsPc), automontados sobre eletrodos de FTO. O eletrodo quimicamente modificado apresentou elevada sensibilidade, mostrando uma boa eficiência eletrocatalítica para a redução do H_2O_2 em tampão fosfato-salino (PBS), em pH 6,5. Após as condições experimentais terem sido otimizadas, tais como o número de bicamadas (Pt-SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc) e o potencial a ser aplicado, o sensor exibiu uma resposta linear em relação à concentração de H_2O_2 dentro da faixa analisada, ($9,90 \times 10^{-6}$ a $9,09 \times 10^{-5}$ molL⁻¹), com limites de detecção e de quantificação bastante baixos, da ordem de $1,64 \times 10^{-5}$ molL⁻¹ e $5,46 \times 10^{-5}$, respectivamente. Os resultados obtidos mostram que o eletrodo desenvolvido possui elevada possibilidade de aplicação na determinação eletroanalítica de H_2O_2 .

Palavras-chave: peróxido de hidrogênio, voltametria cíclica, amperometria.

INTRODUÇÃO

A determinação eletroanalítica de H_2O_2 consiste em um tópico de elevada importância, uma vez que este desempenha um papel significativo em muitas áreas, incluindo as de alimentos, farmacêutica, clínica e ambiental. Além disso, o H_2O_2 é um dos produtos das reações catalisadas por quase todas as enzimas oxidases. Numerosos métodos têm sido estudados para a sua determinação, sendo que os eletroquímicos vêm ganhando destaque cada vez maior, devido à sua alta sensibilidade, resposta rápida e baixo custo [1]. A fim de que a sensibilidade dos eletrodos seja aumentada, vários métodos de modificação química dos mesmos têm sido estudados, sendo a técnica LbL um dos mais promissores. Através dela, um elevado número de polieletrólitos de carga oposta podem ser automontados sobre substratos sólidos.

O cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano (SiPy⁺Cl⁻) constitui um polieletrólito que possui elevada capacidade de formação de filmes sobre superfícies condutoras. Além disso, devido à existência de cavidades em sua estrutura, o mesmo pode atuar como um nanoreator para a síntese de nanopartículas metálicas. Uma vez incorporadas ao polieletrólito, estas podem fazer com que a sensibilidade do eletrodo a ser modificado aumente. Isto se deve à suas pequenas dimensões, que determinam propriedades eletrônicas e catalíticas específicas. Além disso, a presença de nanopartículas metálicas em sensores eletroquímicos pode fazer com que os potenciais de redução ou oxidação de muitos analitos diminuam [2], fornecendo assim ao eletrodo uma maior seletividade.

Neste sentido, desenvolveu-se neste trabalho um novo tipo de sensor eletroquímico para o H_2O_2 baseado na modificação de eletrodos de FTO (vidro recoberto com óxido de estanho dopado com flúor) através da técnica LbL, utilizando-se como polícatión o SiPy⁺Cl⁻ modificado por nanopartículas de Pt (Pt-SiPy⁺Cl⁻), e como poliânion a CuTsPc, que possui uma reconhecida eficiência como mediador de elétrons.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ foi preparado da seguinte maneira: soluções de H_2PtCl_6 (2 mmolL^{-1}), HCOOH ($0,1 \text{ molL}^{-1}$) e SiPy⁺Cl⁻ (2 mgmL^{-1}) foram misturadas na proporção 1:1:1. A mistura reacional foi deixada sob agitação ao abrigo da luz por 24 horas. Os filmes LbL foram automontados sobre eletrodos de FTO através da imersão alternada do substrato por 5 minutos nas soluções de Pt-SiPy⁺Cl⁻ (pH 2,5) e de CuTsPc (pH 8,0). Após a deposição de cada camada, o sistema filme/substrato foi lavado com água e seco sob fluxo de ar. O crescimento das multicamadas foi monitorado por espectroscopia na região do UV-Vis (Varian®, modelo Cary 50). Para verificar a eletroatividade dos filmes (Pt-SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc) frente ao H_2O_2 foram realizadas medidas eletroquímicas utilizando-se um potenciostato Palm Sens® e uma célula eletroquímica convencional contendo três eletrodos: um contra-eletrodo de Pt, um eletrodo de referência Ag/AgCl e os filmes produzidos como eletrodo de trabalho em meio de tampão PBS. Voltamogramas cíclicos dos filmes contendo diferentes números de bicamadas foram obtidos a fim de avaliar qual apresentava melhor eletroatividade frente ao analito. Medidas amperométricas foram realizadas variando-se o potencial de aplicação de 0,0 a -0,4 V. Em seguida, curvas analíticas foram levantadas em -0,1 V. Antes de qualquer medida, o eletrólito de suporte foi borbulhado com N_2 por 10 minutos, a fim de que o O_2 dissolvido fosse removido, já que este é eletroativo e pode influenciar nas medidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Espectros de UV-VIS na região de 400-800 nm para a CuTsPc e para o nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ mostram que este último não absorve nesta região. Entretanto, duas bandas foram observadas para a CuTsPc: uma em 615 nm, relacionada às espécies diméricas e outra em 691 nm relacionada às espécies monoméricas. Os espectros obtidos para os filmes LbL apresentaram-se semelhantes ao da CuTsPc em solução, com pequeno deslocamento de 615 nm para 625 nm e de 691 nm para 695 nm (Figura 1). Tal deslocamento é um indicativo da interação entre os polieletrólitos no filme.

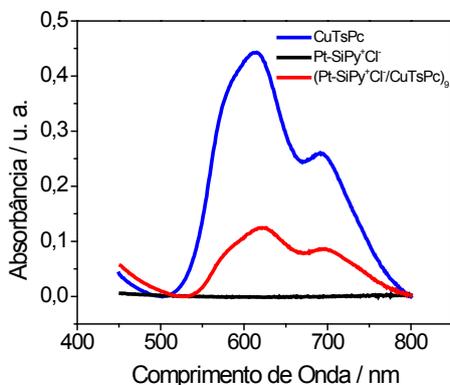


Figura 1: Espectros obtidos na região do UV-Vis para os polieletrólitos em solução aquosa e para o filme (Pt-SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₉.

A seguir, deu-se início às medidas eletroquímicas para a determinação de H₂O₂ utilizando os eletrodos modificados. Primeiramente, realizou-se um estudo com os filmes contendo diferentes números de bicamadas (Pt-SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc), a fim de se identificar qual deles apresenta uma maior sensibilidade ao H₂O₂ em meio de tampão PBS, em pH=6,5. Verificou-se que, dentre os números de bicamadas analisados (1 a 10), os filmes contendo nove (Pt-SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₉ responderam melhor no que diz respeito ao processo de redução do analito estudado, uma vez que os voltamogramas para este número de bicamadas apresentaram um melhor perfil e uma maior I_{pc} do que os voltamogramas correspondentes às outras bicamadas.

A fim de se confirmar que os eletrodos modificados com o filme são de fato mais sensíveis à redução do H₂O₂, um estudo comparativo entre somente o substrato, os filmes contendo apenas os polieletrólitos Pt-SiPy⁺Cl⁻ e CuTsPc e o filme LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₉ foi realizado. Verificou-se que os filmes realmente possuem uma maior I_{pc}, indicando que sua utilização para a determinação de H₂O₂ é, neste caso, bastante vantajosa (Figura 2).

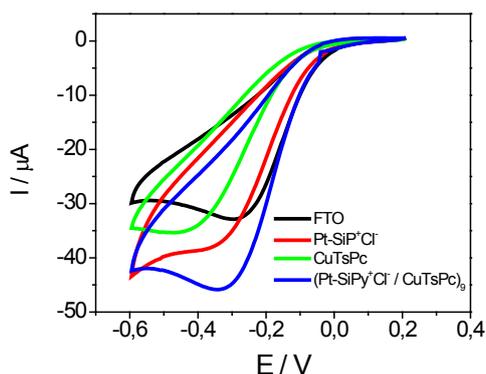


Figura 2: Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos sem modificação, modificados apenas com os polieletrólitos e modificados com o filme (Pt-SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₉, com velocidade de varredura 50 mVs⁻¹ e com [H₂O₂] = 4,76 x 10⁻⁴ mol L⁻¹.

Com as condições experimentais devidamente otimizadas, partiu-se para as medidas amperométricas, a fim de se investigar sob qual potencial o filme (Pt-SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₉ apresenta-se mais sensível ao H₂O₂. Os estudos realizados anteriormente por voltametria cíclica indicam que já a partir de 0,0 V inicia-se a redução do H₂O₂. Portanto, a faixa de potenciais estudada foi de 0,0 V a -0,4 V. Verificou-se que o filme apresentou resposta eletroquímica para todos os potenciais estudados, sendo que a maior variação de corrente ocorreu em -0,4 V. Apesar disso, para a obtenção das curvas analíticas, o potencial escolhido foi o de -0,1 V (Figura 3a). Este valor corresponde a um potencial mais baixo, o que garante uma maior seletividade para o filme. Após o levantamento das curvas, verificou-se que o filme

(Pt-SiPy⁺Cl/CuTsPc), apresentou resultados reprodutíveis, como pode ser observado pelos baixos valores de erro (Figura 3b). Os limites de detecção e de quantificação encontrados para o eletrodo foram satisfatoriamente baixos, da ordem de $1,64 \times 10^{-5}$ e $5,46 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$, respectivamente, comprovando a eficiência do sensor desenvolvido para a determinação de H_2O_2 .

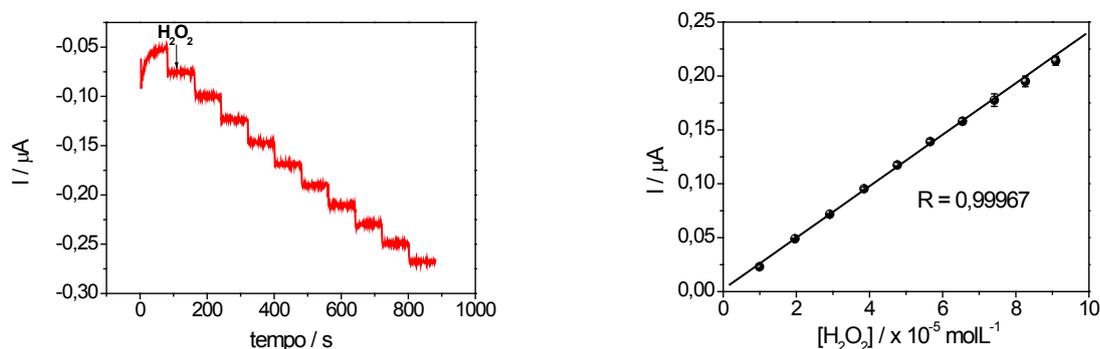


Figura 3: (a) Resposta amperométrica do filme (Pt-SiPy⁺Cl/CuTsPc), no potencial de -0,1 V após sucessivas adições de H_2O_2 na concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ a 10 mL de tampão PBS. (b) Relação entre a corrente gerada pela redução do H_2O_2 em potencial -0,1 V e sua concentração.

CONCLUSÕES

Neste trabalho, um novo tipo de sensor eletroquímico para H_2O_2 foi desenvolvido baseado na modificação de eletrodos de FTO com Pt-SiPy⁺Cl e CuTsPc pela técnica LbL. Através da espectroscopia na região do UV-Vis, pôde-se confirmar a presença dos polieletrólitos no filme, denotando a eficácia da referida técnica para a modificação dos eletrodos. Verificou-se que o filme (Pt-SiPy⁺Cl/CuTsPc), mostrou elevada sensibilidade em relação à redução do H_2O_2 , fato comprovado através das técnicas de voltametria cíclica e de amperometria. Uma relação altamente linear entre a corrente de pico catódico e a concentração de H_2O_2 foi observada em toda a faixa de potenciais analisada. No entanto, o potencial de -0,1 V foi escolhido como o melhor, já que sua aplicação garante uma maior seletividade para o filme. O filme apresentou ainda valores bastante baixos para os limites de detecção e quantificação. Estes resultados sugerem que o eletrodo modificado possui potenciais aplicações na determinação de H_2O_2 , podendo atuar inclusive como um biossensor, já que a maioria das reações enzimáticas ocorre com a geração deste composto como um subproduto.

AGRADECIMENTOS: À UEpg e à Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

- [1] R. Thangamuthu *et al.*, “Electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide and its determination in antiseptic and soft-glass cleaning solutions at phosphotungstate-doped-glutaraldehyde-cross-linked poly-L-lysine film electrodes”, *Sens. Actuators B: Chem.*, 151: 377-383, 2011.
- [2] Guascito, M. R., Filippo, E., Malitesta, C., Manno, D., Serra, A. and Turco, A. “A new amperometric nanostructured sensor for the analytical determination of hydrogen peroxide”, *Biosensors and Bioelectronics*, 24:1057-1063, 2008.

BIOSSENSOR À BASE DE NANOTUBOS DE HALOISITA, LÍQUIDO IÔNICO E NANOPARTÍCULAS DE PLATINA

Daniela Brondani¹, Iolanda C. Vieira¹, Jairton Dupont² e Carla W. Scheeren²

¹ Departamento de Química - UFSC, Florianópolis - SC - Brasil; ² Instituto de Química - UFRGS, Porto Alegre - RS - Brasil. danielabrondani@hotmail.com

RESUMO: Nanotubos de haloisita foram utilizados na imobilização da enzima peroxidase e aplicados na construção de um biossensor; juntamente com nanopartículas de platina e líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMI.PF₆). O biossensor proposto foi otimizado para determinação de dopamina, sendo que as condições experimentais selecionadas foram: 5,0 unidades de peroxidase por mg de pasta de carbono, $9,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de H₂O₂, solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,0) e os parâmetros da voltametria de onda quadrada (frequência 50 Hz, amplitude 100 mV e incremento 5,0 mV). A curva analítica apresentou linearidade entre as correntes resultantes (μA) e as concentrações de dopamina no intervalo de 0,40 a 18,87 μmol L⁻¹, com limite de detecção de 54,10 nmol L⁻¹. A recuperação de dopamina em amostras de formulações farmacêuticas foi de 97,5 a 101,4% e os resultados da determinação foram concordantes àqueles obtidos usando o método oficial.

Palavras-chave: Biossensor, Haloisita, Nanopartícula metálica, Líquido iônico, Dopamina

INTRODUÇÃO

Recentemente, a nanotecnologia vem desempenhando um importante papel no desenvolvimento de biossensores, tendo em vista as características eletrônicas, magnéticas, ópticas e eletroquímicas únicas exibidas pelos nanomateriais. A construção de eletrodos usando estes materiais tem apresentado resultados incríveis, tais como aumento na sensibilidade, estabilidade e velocidade de resposta destes dispositivos [1]. As nanopartículas metálicas vêm se destacando nesta área por apresentarem inigualáveis propriedades, tais como grande área superficial ativa e extraordinária atividade catalítica associada com seu tamanho controlado e composição [1,2].

Neste contexto, nanotubos de haloisita têm sido recentemente investigados como materiais promissores para imobilização de enzimas [3] e metaloporfirinas [4] e preparação de nanopartículas metálicas suportadas [5]. Haloisita é um argilomineral (1:1, Al:Si) do grupo da caulinita, que pode ser encontrado em duas formas diferentes, ou seja, desidratado (Al₂Si₂O₅(OH)₄: distância basal de 7Å) e hidratado (Al₂Si₂O₅(OH)₄.2H₂O: distância basal de 10 Å). Sua morfologia tubular é predominante, expondo os grupos Si-O na superfície externa, os grupos Al-OH na superfície interna, e Al-OH e Si-OH nas bordas do material [4,6].

Outra classe de compostos intensivamente explorada nos últimos anos é a dos líquidos iônicos (LI), os quais vêm sendo empregados com sucesso em diversas reações orgânicas, processos de extração e eletroquímica. Os LI apresentam negligenciável pressão de vapor, desprezível inflamabilidade, boa estabilidade química e térmica, habilidade catalítica, alta condutividade iônica e ampla janela eletroquímica de potencial. A aplicação destes líquidos tem ganhado notável espaço na química analítica, especialmente em eletroanalítica como eletrólito suporte ou como modificadores de sensores [7].

Dopamina é um neurotransmissor e desempenha um importante papel nas funções dos sistemas nervoso central, renal, hormonal e cardiovascular. A determinação da dopamina é um assunto de grande relevância para investigar suas funções fisiológicas e o diagnóstico das doenças nervosas decorrentes do metabolismo anormal da dopamina, como a epilepsia, Parkinson e esquizofrenia, bem como no controle de qualidade de medicamentos contendo esta catecolamina. Deste modo, diferentes métodos têm sido descritos na literatura para quantificação de dopamina, incluindo cromatografia, espectrofotometria e eletroanalítica [8].

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um biossensor à base de pasta de carbono contendo peroxidase (PER) vegetal imobilizada em nanotubos de haloisita, juntamente com nanopartículas de platina e LI hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMI.PF₆). As condições experimentais foram otimizadas, e o biossensor proposto foi aplicado na determinação de dopamina em formulações farmacêuticas.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Extrato de broto de trevo (*Trifolium*) foi usado como fonte enzimática e obtido conforme descrito na literatura [8]: 25 g de broto de trevo foram triturados juntamente com 50 mL de tampão fosfato (pH 7,0) e centrifugado (18.000 rpm; 4 °C). O sobrenadante foi usado como fonte da PER e a atividade determinada por espectrofotometria [8].

Os nanotubos de haloisita (diâmetro x comprimento: 30-70 nm x 1-3 μm; área superficial: 64 m²/g) foram utilizados como suporte para imobilização da PER. Foram adicionadas alíquotas de 10,5 a 42,0 μL do extrato vegetal (500-2000 unidades de PER) sobre 20 mg do argilomineral, sendo este material homogeneizado e seco a temperatura ambiente para posterior aplicação no desenvolvimento do biossensor.

O biossensor proposto foi construído homogeneizando-se 140 mg de pó de grafite e 20 mg de nanotubos de haloisita contendo PER imobilizada, durante 20 min. Em seguida, foram adicionados 40 mg de aglutinante (Pt-BMI.PF₆:nujol, 1:1), homogeneizando-se por mais 20 min. A pasta formada foi embutida em seringa de 1 mL e um fio de cobre inserido para obtenção do contato elétrico.

As medidas voltamétricas foram realizadas usando um potenciostato/galvanostato da Autolab modelo PGSTAT101, e um sistema contendo três eletrodos: biossensor usado como eletrodo de trabalho, platina como contraeletrodo e Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como referência. Em uma célula eletroquímica contendo 10,0 mL de solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0), foram adicionadas alíquotas de solução padrão de dopamina ou amostras farmacêuticas e, após cada adição, a solução foi mantida sob agitação durante 60 s e as medidas voltamétricas realizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A enzima PER foi imobilizada sobre os nanotubos de haloisita com o objetivo de aumentar a estabilidade da enzima e prolongar a vida útil do biossensor proposto. Os nanotubos de argilomineral contendo PER foram utilizados na construção do biossensor, juntamente com LI e nanopartículas de platina. A PER, na presença de peróxido de hidrogênio, catalisa a oxidação da dopamina à respectiva *o*-quinona, a qual é reduzida eletroquimicamente à dopamina em potencial de 140 mV vs. Ag/AgCl na superfície do eletrodo (Figura 1A).

Após investigação de vários parâmetros experimentais, foram selecionados: concentração de enzima de 5,0 unidades de peroxidase por mg de pasta de carbono, 9,8x10⁻⁵ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio e solução tampão fosfato pH 7,0 (0,1 mol L⁻¹). Os melhores parâmetros da técnica da voltametria de onda quadrada foram: frequência de 50 Hz, amplitude de 100 mV e incremento de 5,0 mV. Foram construídos 5 tipos de eletrodos: (a) eletrodo de pasta de carbono (EPC) sem modificação; (b) EPC modificado com haloisita; (c) EPC modificado com haloisita e BMI.PF₆; (d) EPC modificado com haloisita e Pt-BMI.PF₆ e (e) EPC modificado com haloisita-PER e Pt-BMI.PF₆, tendo como objetivo comparar a resposta destes sensores e avaliar a contribuição dos materiais modificadores utilizados. Através de estudos usando voltametria cíclica e de onda quadrada (Figura 1B e C), a maior resposta dos eletrodos estudados foi obtida na sequência: e > d > c > b > a. Portanto, o biossensor (e) contendo PER imobilizada em nanotubos de haloisita e Pt-BMI.PF₆ apresentou maior resposta, indicando que a incorporação destes modificadores à pasta de carbono contribuiu para o significativo aumento no sinal analítico. Este fato pode ser atribuído provavelmente à capacidade catalítica destes materiais, adequado meio para a imobilização da PER, além da facilitação da transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo pelos modificadores empregados.

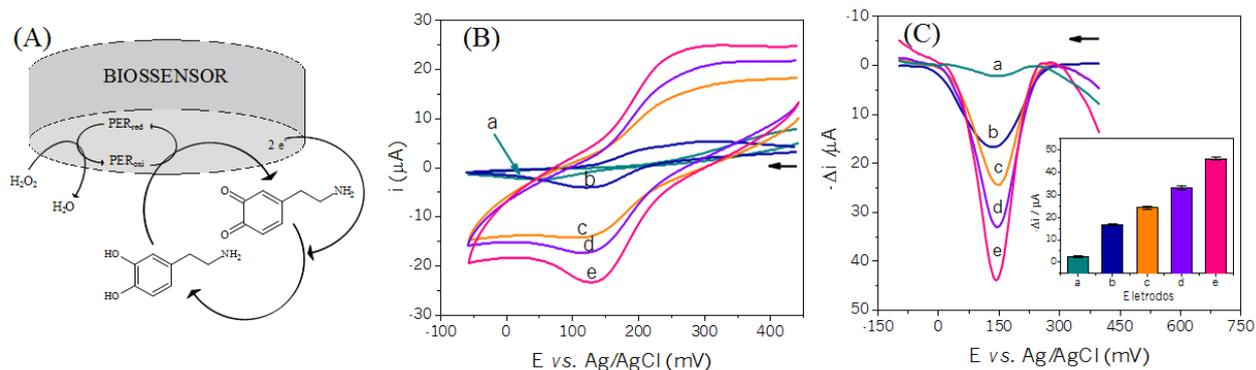


Figura 1: (A) Reação enzimática na superfície do biossensor. (B) Voltamogramas cíclicos usando diferentes eletrodos em 0,90 mmol L⁻¹ de dopamina. (C) Voltamogramas de onda quadrada usando diferentes eletrodos em 18,87 µmol L⁻¹ de dopamina (Inserido: gráfico com os valores de corrente).

Os voltamogramas de onda quadrada e a curva analítica, mostrados na Figura 2A e B, respectivamente, foram obtidos nas melhores condições experimentais. A curva analítica do biossensor proposto apresentou linearidade entre as correntes resultantes (µA) e as concentrações de dopamina no intervalo de 0,40 a 18,87 µmol L⁻¹ ($-\Delta i = 0,93 (\pm 0,044) + 2,44 (\pm 0,020) [\text{dopamina}]$; $r = 0,9993$), com limite de detecção de 54,10 nmol L⁻¹ e limite de quantificação de 0,18 µmol L⁻¹.

O estudo de recuperação de dopamina em três amostras de formulações farmacêuticas (A, B e C: cloridrato de dopamina injetável) variou de 97,5 a 101,4%, usando o biossensor proposto. Através do método de adição de padrão, o teor de dopamina também foi determinado nestas amostras, conforme apresentado na Tabela 1, juntamente com o valor rotulado e o encontrado usando o método oficial [9]. Os resultados obtidos com o biossensor apresentaram concordância com os valores obtidos pelo método oficial, demonstrando a exatidão do método proposto. Além disso, foram realizados estudos para avaliar a interferência de ácido úrico e ácido ascórbico sobre a corrente de redução obtida para a dopamina usando o biossensor. Observou-se uma mudança no sinal analítico menor que 7% na presença de uma concentração 100 vezes maior destes interferentes em relação à concentração de dopamina.

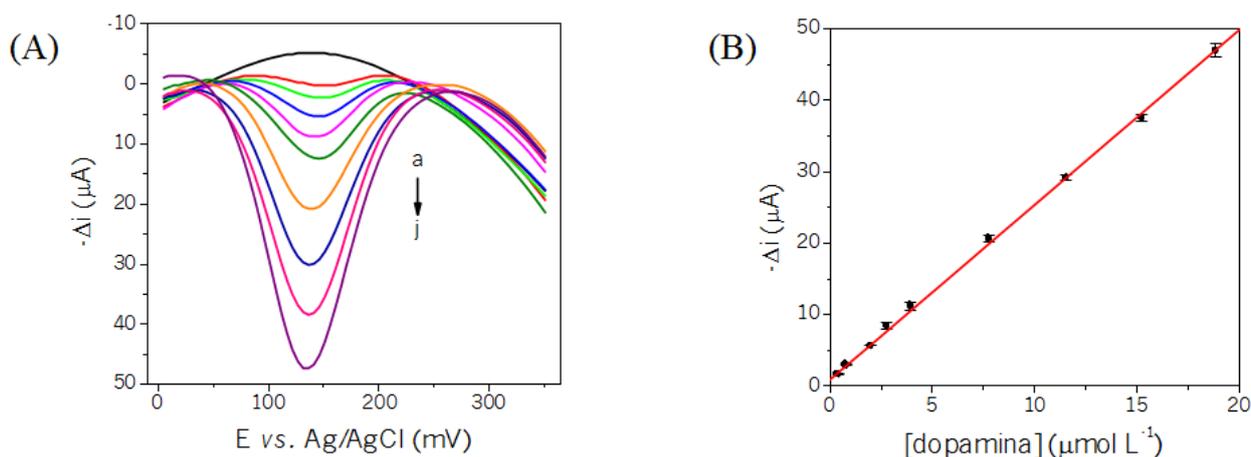


Figura 2: (A) Voltamogramas de onda quadrada usando o biossensor proposto em (a) tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) e nas seguintes concentrações de dopamina: (b) 0,40, (c) 0,79, (d) 1,97, (e) 2,75, (f) 3,92, (g) 7,77, (h) 11,54, (i) 15,24 e (j) $18,87 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva analítica da dopamina.

Tabela 1: Determinação de dopamina em formulação farmacêutica

Amostra	Dopamina (mg mL^{-1})			E.R. ₁ (%)	E.R. ₂ (%)
	Rotulado	Método oficial [9]	Biossensor		
A	5,0	$4,94 \pm 0,12$	$4,91 \pm 0,08$	-1,8	-0,6
B	5,0	$5,15 \pm 0,03$	$5,16 \pm 0,05$	+3,2	+0,2
C	5,0	$4,98 \pm 0,06$	$5,03 \pm 0,06$	+0,6	+1,0

A, B e C = Cloridrato de dopamina injetável; E.R.₁ = Biossensor vs. valor rotulado; E.R.₂ = Biossensor vs. método oficial.

CONCLUSÕES

O biossensor desenvolvido utilizando-se PER de broto de trevo imobilizada em nanotubos de halóisita, juntamente com Pt-BMI.PF₆ apresentou baixo limite de detecção para dopamina, sem interferência significativa de ácido úrico e ácido ascórbico. Além disso, mostrou-se eficiente na determinação de dopamina em amostras de formulações injetáveis, apresentando resultados concordantes aos obtidos usando o método oficial.

AGRADECIMENTOS: CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS

- [1] ZHANG X., GUO Q. and CUI D., "Recent advances in nanotechnology applied to biosensors", *Sensors* 9(2):1033-1053, 2009.
- [2] CAMPBELL F.W. and COMPTON R.G., "The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review", *Anal. Bioanal. Chem.* 396(1):241-259, 2010.
- [3] SUN X., ZHANG Y., SHEN H. and JIAN., "Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase based on halloysite nanotubes/chitosan nanocomposite film", *Electrochim. Acta* 56(2):700-705, 2010.
- [4] MACHADO G.S., CASTRO K.A.D.F., WYPYCH F. and NAKAGAKI, S., "Immobilization of metalloporphyrins into nanotubes of natural halloysite toward selective catalysts for oxidation reactions", *J. Mol. Catal. A* 283(1-2):99-107, 2008.
- [5] LIU P. and ZHAO M., "Silver nanoparticle supported on halloysite nanotubes catalyzed reduction of 4-nitrophenol (4-NP)", *Appl. Surf. Sci.* 255(7):3989-3993, 2009.
- [6] JOUSSEIN E., PETIT S., CHURCHMAN J., THENG B., RIGHI D. and DELVAUX B., "Halloysite clay minerals - a review", *Clay Minerals* 40(4):383-426, 2005.
- [7] WEI D. and IVASKA A., "Applications of ionic liquids in electrochemical sensors", *Anal. Chim. Acta* 607(2):126-135, 2008.
- [8] MOCCELINI S.K., FERNANDES S.C. and VIEIRA I.C., "Bean sprout peroxidase biosensor based on l-cys-teine self-assembled monolayer for the determination of dopamine", *Sens. Actuators B* 133(2):364-369, 2008.
- [9] United States Pharmacopeia National Formulary XXIII, Rockville: Maryland, US Pharmacopeia Convention, pp. 549-550, 1995.

SENSOR BIOINSPIRADO NA GLUTATIONA PEROXIDASE PARA DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Eduardo Zapp, Iolanda Cruz Vieira, Vanessa Nascimento, Daniel Dambrowski e Antonio Luis Braga

Departamento de Química - UFSC, Florianópolis - SC - Brasil. edu.zp@hotmail.com

RESUMO: Neste trabalho, um modelo mimético da enzima glutationa peroxidase (GPx) à base de derivado de calcogênio (seleneto) foi imobilizada em matriz de quitosana e grafeno co-eletrodepositada em superfície de eletrodo de ouro para detecção cronoamperométrica de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Vários parâmetros analíticos foram investigados e os melhores foram: 0,5% (m/v) de quitosana, 0,05% (m/v) de grafeno 7,4 μg de GPx, $9,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de glutationa reduzida (GSH), tampão Britton-Robinson pH 7,0, 0,0V vs. Ag/AgCl o potencial de redução para H_2O_2 . A linearidade para H_2O_2 foi obtida na faixa de $2,47 \times 10^{-6}$ a $2,84 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com limite de detecção de $2,24 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A recuperação de H_2O_2 em amostras de antisséptico foi de 98,3 a 101,3% e os resultados da determinação foram concordantes àqueles obtidos usando método oficial.

Palavras-chave: sensor, glutationa peroxidase, grafeno, peróxido de hidrogênio.

INTRODUÇÃO

O estudo de compostos organocalcogênicos vem ganhando interesse desde a década de 70. A evolução sintética e a concepção destes novos compostos têm atraído considerável atenção, particularmente devido à sua capacidade de mimetismo de compostos naturais com importantes propriedades biológicas. Destacam-se entre estas moléculas as selenoenzimas, que constituem um importante grupo de enzimas antioxidantes que atuam na proteção de biomembranas em mamíferos e outros componentes celulares do estresse oxidativo. Este processo está associado à atividade dos peróxidos e seus subprodutos, que são produzidos durante o metabolismo de oxigênio em células aeróbicas. Neste contexto, a enzima glutationa peroxidase (GPx) desempenha um importante papel catalítico na redução de peróxidos [1].

O peróxido de hidrogênio é uma molécula que desperta interesse científico e industrial, principalmente quanto à sua determinação. Este composto encontra-se presente em produtos alimentícios, farmacêuticos e clínicos, por exemplo. Tendo em vista sua grande importância, diversas técnicas de identificação e quantificação deste composto têm sido desenvolvidas, como os métodos volumétricos e as técnicas espectroscópicas; entretanto, os morosos procedimentos e o custos dos materiais empregados nestas técnicas tradicionais sustentam o desenvolvimento de técnicas eletroanalíticas na detecção de peróxido, seja pelo uso de sensores, biossensores ou sensores biomiméticos [2].

O grafeno é uma folha bidimensional planar formada por uma única camada de átomos de carbono sp^2 ligados, os quais são densamente empacotadas em uma estrutura cristalina na forma de favos. O grafeno, embora recentemente descoberto, tem sido colocado como uma grande promessa para muitas aplicações no campo geral da eletroquímica e eletroanalítica. Em razão das suas propriedades eletroquímicas, o grafeno tem se mostrado um promissor modificador para sensores eletroquímicos devido à sua escala nanométrica possibilitar a investigação de reações com transferência direta de elétrons entre os componentes que envolvem a arquitetura do sensor [3,4].

Neste trabalho, um eletrodo de ouro foi recoberto pela coeletrodeposição de um filme de quitosa-grafeno que foi utilizado para a imobilização de moléculas miméticas de enzima glutationa peroxidase. A construção deste sensor foi otimizado, e empregado na determinação de peróxido de hidrogênio em amostras farmacêuticas.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O eletrodo de ouro foi limpo através de método mecânico, para isso a superfície de ouro foi polida cuidadosamente com suspensão de alumina (0,3 e 0,05 μm) e sonificado em água e etanol absoluto, também realizou-se uma limpeza eletroquímica aplicando-se ciclos de 0,0 a 1,7 V vs. Ag/AgCl em solução de ácido sulfúrico ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Para a deposição de quitosana utilizou-se um sistema de três eletrodos conectados a um potenciostato e mergulhados em uma suspensão de quitosana-grafeno (pH 5,0, 0,5% m/v) por 2 min sob potencial de 3,0 V vs. Ag/AgCl. Como resultado, um filme de quitosana-grafeno foi eletrodepositado sobre a superfície do eletrodo de ouro, o qual foi mantido em dessecador em temperatura ambiente por cerca de 2 h. Em seguida, uma alíquota de solução metanólica de GPx ((2-(benzilselanyl)fenil)metilamina) foi gotejada sobre o filme, e o eletrodo foi novamente armazenado em dessecador para secagem e posterior utilização como eletrodo de trabalho.

As medidas cronoamperométricas foram realizadas usando um potenciostato/galvanostato da Autolab modelo PGSTAT128N, e o processamento de dados foi realizado usando o software (GPES, versão 4.9.007, Eco Chemie), utilizado um sistema contendo três eletrodos: sensor bioinspirado usado como eletrodo de trabalho, platina como contraeletrodo e Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) como referência. Em uma célula eletroquímica contendo 10,0 mL de solução

tampão Britton-Robinson (BR) pH 7,0 e 100 μL de glutationa reduzida (GSH) ($9,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), foram adicionadas alíquotas de peróxido de hidrogênio ou amostras de antisséptico de uso tópico e, após cada adição, a solução foi mantida sob agitação durante 60 s e as medidas cronoamperométricas foram registradas durante 25 s.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sensor proposto teve suas condições de construção e trabalho otimizados, sendo os resultados mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros de otimização

Parâmetro	Faixa estudada	Melhor resposta
Porcentagem de quitosana (% m/v)	0,05 – 0,75	0,1
Porcentagem de grafeno (% m/v)	0,02 – 0,07	0,05
Tempo de eletrodeposição (s)	60 – 420	120
Quantidade de GPx (μg)	2,5 – 17,3	7,4
Concentração de GSH ($\times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)	6,2 – 14,8	9,9
Estudo pH em tampão BR	4,0 – 8,0	7,0
Potencial de redução de H_2O_2 (V)	-0,3 – 0,1	0,0

A Figura 1 mostra de forma esquemática o processo de construção e atuação do sensor proposto (Figura 1-A), assim como os cronoamperogramas obtidos para avaliação da contribuição dos materiais empregados na modificação do eletrodo de ouro (Figura 1-B).

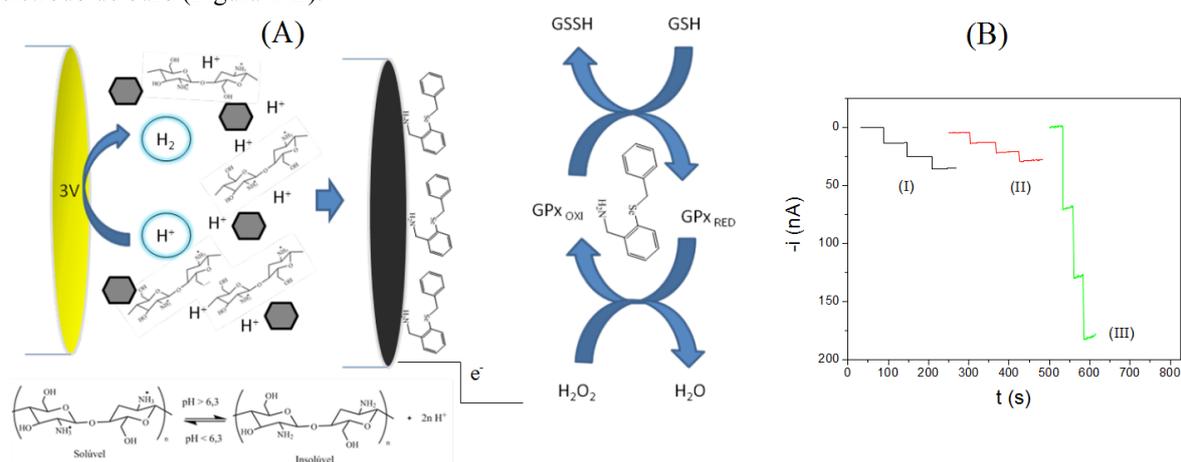


Figura 1: (A) Esquema de construção e atuação do sensor bioinspirado; (B) Cronoamperogramas de comparação entre (I) eletrodo de ouro não modificado, (II) sensor contendo filme de quitosana-grafeno e (III) sensor contendo filme de quitosana-grafeno e GPx.

O filme contendo quitosana-grafeno é obtido devido a redução dos prótons do meio a hidrogênio molecular em potencial de 3,0 V, ocasionando a elevação do pH e, conseqüentemente, co-deposição das moléculas de quitosana e grafeno formando um filme sobre o eletrodo de ouro (Figura 1-A). A GPx é incorporada posteriormente, e a sua contribuição na catálise de redução do H_2O_2 pode ser visualizada na Figura 1-B-III, fornecendo sinais analíticos mais sensíveis do que os demais sensores (Figura 1-B-I e 1-B-II).

Os cronoamperogramas e a curva analítica, mostrados na Figura 2, foram obtidos sob as condições experimentais otimizadas. A curva analítica para o sensor desenvolvido apresentou linearidade entre as correntes catódicas (μA) e as concentrações de peróxido de hidrogênio no intervalo de $2,47 \times 10^{-6}$ a $2,84 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($-i = 2,08 \times 10^{-8} + 2,71 \times 10^{-4} [\text{H}_2\text{O}_2]$; $r = 0,9998$) e limite de detecção de $2,24 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

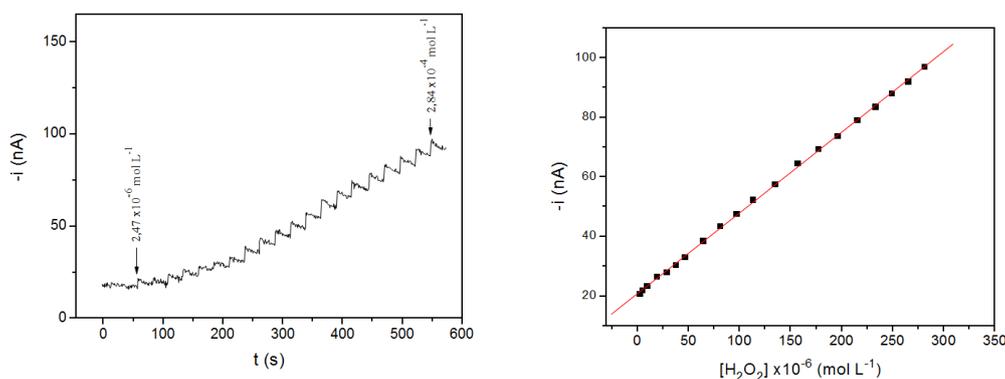


Figura 2: (I) Cronoamperogramas e (II) curva analítica para peróxido de hidrogênio usando o sensor biomimético.

O teor de peróxido de hidrogênio determinado nas amostras de antisséptico (A e B) usando o sensor proposto está apresentado na Tabela 2, juntamente com o valor encontrado usando o método oficial [5]. Os resultados foram comparados e apresentaram concordância, demonstrando a confiabilidade do sensor proposto. O estudo de recuperação de peróxido nas amostras variou de 98,3 a 101,3 %.

Tabela 2. Determinação de peróxido de hidrogênio em amostras farmacêuticas

Amostra	H_2O_2 (mol L ⁻¹)		Erro (%)
	Método oficial *	Sensor *	
A	1,05±0,01	1,01±0,02	-3,80
B	1,06±0,01	1,04±0,03	-1,08

*n=3

CONCLUSÕES

O sensor desenvolvido utilizando GPx imobilizada no filme à base de quitosana-grafeno sobre eletrodo de ouro apresentou baixo limite de detecção e mostrou-se eficiente na determinação de peróxido de hidrogênio em amostras de antissépticos de uso tópico, apresentando resultados concordantes com os obtidos usando o método oficial

AGRADECIMENTOS: CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] ALBERTO E.E., NASCIMENTO V. and BRAGA A.L., “Catalytic Application of Selenium and Tellurium Compounds as Glutathione Peroxidase Enzyme Mimetics”, *J. Braz. Chem. Soc.* 21(11):2032-2041, 2010.
- [2] JIA N., LIAN Q., WANG Z. and SHEN H., “A hydrogen peroxide biosensor based on direct electrochemistry of hemoglobin incorporated in PEO-PPO-PEO triblock copolymer film”, *Sens. Actuators B* 137(1):230-234, 2009.
- [3] BROWNSON D.A.C. and BANKS C.E., “Graphene electrochemistry: an overview of potential applications”, *Analyst* 135(11):2768-2778, 2010.
- [4] XU H., DAI H. and CHEN G., “Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin protein entrapped in graphene and chitosan composite film”, *Talanta* 81(1-2):334-338, 2010.
- [5] United States Pharmacopeia National Formulary XXIII, Rockville: Maryland, US Pharmacopeia Convention, pp. 767, 1995.

ESTUDO ELETROQUÍMICO DA INTERAÇÃO DO CITOCROMO C EM COMPÓSITOS COM LÍQUIDO IÔNICO E FELTROS COM NANOTUBOS DE CARBONO

Leonardo T. Silveira¹, Elaine Y. Matsubara², José Maurício Rosolen², Roberto M. Torresi¹, Susana I. Córdoba de Torresi¹

¹Depto. de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, SP

²Departamento de Química-FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo

leots@iq.usp.br

RESUMO: Neste presente trabalho a atividade eletroquímica do citocromo c imobilizado em um novo compósito formado por hidrogel de quitosana e o líquido iônico BMMIBF₄ será apresentada utilizando um feltro de fibra de carbono recoberto com nanotubos de carbono do tipo “cup stacked” como eletrodo de trabalho. Estudos por voltametria cíclica mostram que o compósito é eficiente na imobilização do citocromo c, sendo porém a presença dos nanotubos de carbono os responsáveis pela transferência direta de elétrons, pois ao utilizar feltros sem o recobrimento dos nanotubos, nenhuma atividade redox é observada. Experimentos de UV-Vis e de dicroísmo circular mostram a eficiência do compósito, pois a presença do líquido iônico não desnatura ou interfere na bioeletroquímica do citocromo c.

Palavras-chave: citocromo c, nanotubos de carbono, líquidos iônicos, biossensor

INTRODUÇÃO

O estudo da transferência direta de elétrons em proteínas redox, tem se tornado foco de grande interesse, devido a sua significância na aplicação prática e teórica na eletroquímica, pois acabam nos fornecendo informações importantes quanto sua estrutura química e da cinética dos processos redox biológicos. No entanto o processo de transferência de elétrons entre um biomaterial e um eletrodo convencional não é tão simples, pois na maioria das vezes os centros redox enzimáticos estão localizados no interior da estrutura da enzima ou proteína e, ainda tem-se a baixa condutividade eletrônica dos grupos aminoácidos que cercam os centros ativos. Uma das formas de garantir a boa eficiência de um biossensor esta em imobilizar o biomaterial diretamente na superfície do eletrodo, e por isso, diversos métodos de imobilização como materiais híbridos, nanopartículas, polímeros condutores, líquidos iônicos, entre outros, são utilizados^[1,2]. Entre estes materiais, os líquidos iônicos tem sido empregados na pesquisa de biomoléculas, pois devido suas propriedades intrínsecas, algum deles solubilizam os biomateriais sem desnaturá-los, garantindo seu estudo eletroquímico em um meio totalmente iônico^[1].

Entre as heme proteínas com atividade redox, o citocromo c representa excelente modelo de bio-molécula para investigar a bioeletroquímica em meios aquosos e aquosos mistos. Além disso, a manutenção de sua atividade eletroquímica esta diretamente relacionada ao modo como é imobilizada, assim como da sua interação com o substrato utilizado.

Para biossensores, quanto melhor for a interação do substrato com a biomolécula mais favorável será a transferência de elétrons, e por isso os nanotubos de carbono tem sido empregado para melhorar este processo^[2]. Os nanotubos de carbono são uma nova classe de nanomateriais, que apresentam propriedades únicas, como estrutura condutora, alta estabilidade química e extraordinária razão volume-superfície ativa. Sendo assim, os nanotubos de carbono exibem uma excelente habilidade para promover reações de transferência de elétrons em biomoléculas, e o estudo de utilizá-los como eletrodos modificados na área de bioeletroquímica tem crescido muito rápido. Existem duas classes principais dos nanotubos de carbono, os de parede simples, cuja estrutura é composta por uma única camada de grafeno curvada na forma de um tubo, e os de paredes múltiplas, no qual é possível observar varias folhas de grafeno curvadas ou empilhadas de forma organizada ou não. Da derivação do material de paredes múltiplas, existe o nanotubo de carbono do tipo “cup stacked” (copos empilhados), onde as folhas de grafeno formam cones de pontas abertas, e cada um deles esta empilhado um sobre o outro, sendo sua configuração mantida por forças de van der Waals^[3].

Pensando em melhorar a atividade eletroquímica do citocromo c, este trabalho apresenta a utilização de um novo compósito formado de hidrogel de quitosana e o líquido iônico tetrafluoroborato de 1-butil-2,3-dimetilimidazólio (BMMIBF₄) no processo de imobilização na superfície de um feltro de fibra de carbono recoberto com nanotubos de carbono no tipo “cup staked” e na sua resposta eletrocalítica para peróxido de hidrogênio.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente o feltro com nanotubo de carbono (FNTc) e o feltro sem recobrimento com nanotubo (Fc) foi deixado por 25 minutos em ácido clorídrico concentrado, para remover resíduos de óxidos que podem estar em sua superfície, sendo em seguida, lavado diversas vezes com água destilada, e secado em estufa a 80°C.

Para imobilizar o citocromo c na superfície do feltro, foi inicialmente utilizada uma solução com uma razão adequada de solução do hidrogel de quitosana (Quit) 0,5% (m/m) com solução de citocromo c (10mg/mL) (Citic) e em seguida foi adicionado 3% de líquido iônico BMMIBF₄ (no volume total da solução). A seguir o FNTc e/ou Fc foi colocado dentro desta solução por 48 horas e, após este período, o feltro foi retirado da solução e deixado para secar em um local escuro a temperatura ambiente por mais 12 horas, formando os eletrodos FNTc/Quit/Citic/BMMIBF₄ e Fc/Quit/Citic/BMMIBF₄ respectivamente. Os voltamogramas cíclicos foram realizados em solução tampão PBS pH 7.0 saturado com N₂, a 25mV.s⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1A apresenta os voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados FNTc/Quit/Citic/BMMIBF₄ e FNTc/Quit/Citic/BMMIBF₄. Como se pode observar para ambos os eletrodos, foi obtido um par redox devido a transferência direta de elétrons entre o Cit c e o eletrodo modificado, com um pico anódico em -0.21V e um pico catódico em -0.33V. Durante o experimento realizado foi observado que a corrente de pico se mantém constante, indicando que o microambiente ao redor do Cit c é favorável e sua função redox não é perdida, mesmo estando imobilizada no compósito. Além disso, este experimento mostra que para este compósito formado a utilização do líquido iônico BMMIBF₄ não esta beneficiando em relação ao comportamento eletroativo do Citc quando imobilizado no FNTc, fato não visto em estudos realizados com a utilização deste mesmo compósito em eletrodo de carbono vítreo.



Figure 1 A. – Voltamogramas cíclicos do eletrodos modificados FNTc/Quit/Citic/BMMIBF₄ e Fc/Quit/Citic/BMMIBF₄ em solução tampão PBS pH 7.0 a 25mV.s⁻¹.

Figura 2. – Resposta eletrocatalítica do FNTc/Quit/Citic/BMMIBF₄ para H₂O₂. Cada aumento de corrente (b-h) corresponde a um incremento de concentração de 200μM de H₂O₂.

A fim de explorar a atividade eletrocatalítica do Cit c, a figura 2 apresenta os voltamogramas cíclicos do FNTc/Quit/Citic/BMMIBF₄ na presença de peróxido de hidrogênio. O primeiro ciclo (Figura 2 a) corresponde ao eletrodo sem adição de H₂O₂ em solução, onde o perfil é similar ao obtido na figura 1A. Com o aumento da concentração de H₂O₂ (Figura 2 b-h), o pico de redução também aumenta, apresentando um processo típico de redução eletrocatalítica de H₂O₂ por citocromo c.

Quando o citocromo c foi imobilizado pelo compósito em um feltro sem o recobrimento dos nanotubos de carbono (Fc), o perfil eletroquímico foi totalmente diferente. Como pode ser observado nos voltamogramas cíclicos da figura 3, há apenas um pico catódico em valores abaixo de -0.30V que é perdido logo após o primeiro ciclo realizado.

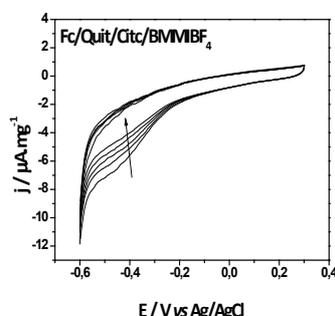


Figura 3 – Voltamograma cíclico do eletrodo Fc/Quit/Citic/BMMIBF₄ em solução tampão PBS 0.1M pH 7.0a 25mV.s⁻¹

Este comportamento indica que a eletroatividade do citocromo c esta relacionada com sua interação direta com o nanotubo de carbono, pois mesmo contendo o líquido iônico que supostamente auxiliaria a transferência de elétrons por ser um material exclusivamente iônico, neste Fc, o Cit c não responde eletroquimicamente.

Este comportamento esta relacionado ao não favorecimento da interação entre o citocromo c com o feltro, não permitindo a transferência direta de elétrons. Este mesmo comportamento foi observado em estudos utilizando carbono vítreo como eletrodo de trabalho (dados não mostrados), indicando a importância dos nanotubos de carbono na resposta eletroquímica do cit c.

A fim de investigar possíveis mudanças estruturais na cadeia do citocromo c devido ao uso do líquido iônico no compósito, foram realizados experimentos de UV-Vis e dicroísmo circular. Utilizando estas técnicas, o citocromo c nativo exibe uma banda Soret bem características e, que esta relacionada ao átomo de ferro do grupo heme no centro da biomolécula hexacovalente. O sexto ligante do grupo heme esta ligado ao resíduo de uma metionina (Met80), e a ruptura desta ligação ocasiona mudanças na estrutura primária e a função eletroativa do citocromo c é prejudicada.

O espectro UV-Vis do citocromo c nativo na figura 4, apresenta uma banda intensa em 409nm (Soret) e uma outra branda em 530nm, que são características ao estado oxidado do átomo de ferro do grupo heme (Fe^{3+}). O espectro de dicroísmo circular apresenta uma banda positiva e outra negativa em 402 e 417nm, cujo efeito é característico do estado Fe^{3+} , porem ele é específico da interação dos grupos polipeptídicos vizinhos ao grupo heme, sendo a banda negativa em 420nm particularmente relacionada à presença do grupo Met80 como a sexta posição coordenada no átomo de ferro do grupo heme do citocromo c.

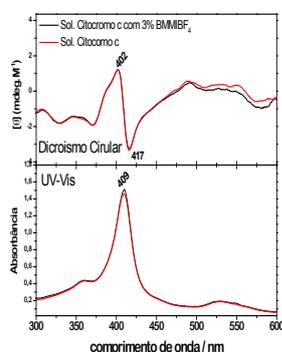


Figure 4 – Espectros de dicroísmo circular e UV-Vis da solução de Citocromo c nativo (--) e da solução de citocromo c com 3% de BMMIBF₄(-).

Ao realizar os experimentos espectroscópicos como UV-Vis e Dicroísmo circular do citocromo com 3% de BMMIBF₄ (figura 4) foi possível observar que os espectros obtidos não apresentam nenhuma diferença de intensidade e posição na região da banda Soret, indicando que o grupo heme do ferro permanece no mesmo estado oxidado (Fe^{3+}). Além disso, os espectros de dicroísmo circular mostram a integridade do citocromo c no compósito formado, sem sinais de mudanças na sua estrutura primária e não ocasionando a perda da atividade eletroativa.

Os experimentos realizados neste trabalho mostram que é possível utilizar um compósito de hidrogel de quitosana com o líquido iônico BMMIBF₄ no estudo eletroquímico do citocromo c, mostrando que este material totalmente iônico não ocasiona nenhuma modificação na estrutura química da biomolécula e nem em suas funções redox. No entanto, a interação do citocromo c com o substrato foi determinante na manutenção desta eletroatividade, já que ao utilizar o mesmo compósito de hidrogel de quitosana e BMMIBF₄ o citocromo c somente apresenta os picos de oxidação e redução no feltro recoberto por nanotubo de carbono.

AGRADECIMENTOS: CAPES, CNPq, INCT/BIOanalítica e FAPESP.

REFERÊNCIAS

- [1] ZHANG, Y., ZHENG, Z., “Direct electrochemistry and electrocatalysis of cytochrome c based on chitosan-room temperature ionic liquid-carbon nanotubes composite”, *Electrochim. Acta.*, 54:749-754, 2008.
- [2] GONÇALES, V.R., MATSUBARA, E.Y., ROSOLEN, J.M., CÓRDOBA DE TORRESI, S.I., “Micro/nanostructured carbon composite modified with a hybrid redox mediator and enzymes as a glucose biosensor”, *Carbon* 49(9):3039-3047, 2011.
- [3] MORAES, I.R., SILVA, W.J., TRONTO, S., ROSOLEN, J.M., “Carbon fibers with cup-stacked-type structure: An advantageous support for Pt-Ru catalyst in methanol oxidation”, *J. Power. Sour.*, 160(2):997-1002, 2006.

ELETRODOS IMPRESSOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PLATINA PARA A DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE DAPSONA

Fabio R. Caetano¹, Ava Gevaerd¹, Aldo J.G. Zarbin¹, Márcio F. Bergamini¹ e Luiz H. Marcolino-
Jr¹

¹ Departamento de Química – Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba - PR - Brasil;
fabio.caetano@ufpr.br

RESUMO: Neste trabalho, foram utilizadas nanopartículas de platina (NPpt) passivadas por dodecanotiol para a construção de um sensor eletroquímico posteriormente aplicado na determinação de dapsona. Primeiramente foi realizada a modificação dos eletrodos impressos com a suspensão em estudo, seguida da caracterização eletroquímica desse material por voltametria cíclica, bem como a otimização dos parâmetros de pré-tratamento, influência do pH, velocidade de varredura, eletrólito suporte, volume de dispersão adicionado ao eletrodo, repetibilidade, reprodutibilidade, entre outros. Pelo monitoramento do decréscimo da corrente de pico referente à redução dos óxidos de Pt, em aproximadamente 0,4 V vs Ag/AgCl, que variou linearmente com a concentração de DDS adicionada ao eletrodo. Foi construída uma curva analítica que apresentou linearidade no intervalo de $5,0 \times 10^{-6}$ a $9,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com LD de $7,63 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ R = 0,9996. Testes de adição e recuperação, sensibilidade e aplicação em formulações farmacêuticas foram efetuadas com resultados bastante satisfatórios, mostrando a potencialidade dessa forma de determinação estudada.

Palavras-chave: Nanopartículas, platina, dapsona, eletrodo impresso, determinação.

INTRODUÇÃO

Química nanoeletroanalítica é um campo interdisciplinar em expansão que combina características dos métodos eletroquímicos de análise (alta sensibilidade, baixo custo e rápida resposta) e propriedades significativas de nanomateriais (elevada área superficial, planos cristalinos mais expostos, aumento do transporte de massa) [1]. Essa combinação de características pode levar a um aumento de sensibilidade e seletividade, o que é de extrema importância para a aplicação de sensores eletroquímicos.

Em relação à construção destes sensores, os métodos de modificação de eletrodos com nanopartículas metálicas (NPs) descritos na literatura geralmente envolvem a eletrodeposição de um íon metálico, o que não garante o controle de tamanho e forma das partículas obtidas. Dessa forma, apesar de requer um maior tempo no processo de síntese, a rota química de obtenção de NPs garante que as propriedades da escala nanométrica sejam preservadas.

Sendo assim, propõe-se neste trabalho a utilização de nanopartículas de platina, com tamanho médio de $2,4 \pm 0,5$ nm passivadas por dodecanotiol, obtidas pela rota bifásica descrita por Castro e col [2] para a construção de um sensor eletroquímico para a determinação de dapsona utilizando um eletrodo impresso a base de carbono.

A dapsona (DDS) é um fármaco com ação bacteristática, ou seja, inibe a reprodução de bactérias. É o fármaco mais utilizado no tratamento de doenças que afetam a pele como o Lupus e a Hanseníase [3]. Em relação a suas características químicas, a DDS é uma sulfonamina de baixa solubilidade em água com valores de pKa de 1,3 e 2,5.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Nanopartículas de platina passivadas por dodecanotiol com tamanho menor a 3 nm foram obtidas por rota bifásica. Em um balão de fundo redondo contendo 3,75 mL de uma solução ácido hexacloroplatínico ($[H_2PtCl_6]$) $0,03$ mol L⁻¹ ($1,25 \times 10^{-4}$ mol), adicionou-se 10 mL de uma solução $0,05$ mol L⁻¹ de brometo de tetraoctilamônio ($N(C_8H_{17})_4Br$) solubilizado em tolueno ($5,00 \times 10^{-4}$ mol). A seguir, deixou-se a mistura sob agitação por 10 minutos. Ainda sob agitação, adicionou-se rapidamente, com o auxílio de uma seringa, 3,5 mL de uma solução aquosa $0,4$ mol L⁻¹ de borohidreto de sódio ($NaBH_4$) ($4,5 \times 10^{-3}$ mol). Depois de decorrido o tempo de 90 segundos da adição do agente redutor, adicionou-se 51 μ L ($2,50 \times 10^{-4}$ mol) de dodecanotiol ($C_{12}H_{25}SH$) ao meio. Após a adição de DT, o sistema permaneceu sob agitação magnética por 3 horas. A seguir, as fases foram separadas em um funil de separação e adicionou-se 40 mL de etanol à fase orgânica e levou-se a mistura à temperatura de $-18^\circ C$ por 1 hora. O precipitado marrom escuro foi então separado por centrifugação, por 10 minutos a 3000 rpm e lavado três vezes com etanol. O sólido obtido foi disperso em 2,0 mL de tolueno.

A modificação de um eletrodo impresso (BVT Technologies®, modelo AC1W4R1) composto de um eletrodo de trabalho de grafite ($A = 7,8 \times 10^{-3}$ cm²), contra eletrodo de platina e pseudo-eletrodo de referência de prata foi realizada com o auxílio de uma ponteira de micropipeta de polietileno de 100 μ L, que foi utilizada para delimitar a área a ser modificada. Diferentes volumes da dispersão de nanopartículas (0,5 a 2,0 μ L) foram adicionados à superfície do

eletrodo de trabalho e após a evaporação do solvente, 1,0 μL de tolueno foi adicionado às paredes da ponteira, para remoção das nanopartículas adsorvidas. O eletrodo impresso foi deixado em repouso por 20 minutos para a total evaporação do solvente.

As medidas eletroquímicas foram realizadas por um potenciostato $\mu\text{Autolab}^{\text{®}}$ Type III, a coleta de dados foi obtida com auxílio do software GPES 4.9 EcoChemie $^{\text{®}}$ e os dados coletados foram tratados com o software Origin PRO8 $^{\text{®}}$. O eletrodo de referência utilizado em todas as medidas foi o de Ag/AgCl com KCl 3,0 mol L^{-1} como eletrólito suporte e um eletrodo de platina foi utilizado como eletrodo auxiliar. Na voltametria cíclica o intervalo de potencial utilizado foi de -0,3 a 1,2 V e na voltametria linear foi de 0,0 a 1,2 V. A cela eletroquímica utilizada tem volume máximo de 50 mL, porém foi utilizada com volume fixo de eletrólito suporte de 30 mL para todas as medidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra dois voltamogramas cíclicos em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , referentes ao eletrodo impresso não modificado (vermelho), que não apresenta nenhum processo redox, comportamento típico para o eletrodo de carbono. Devido à pequena corrente capacitiva, o voltamograma final tem aparência de uma fina linha horizontal quando comparado com o material modificado com nanopartículas de platina (voltamograma preto), o qual apresenta processos redox bem definidos, que são referentes aos processos de adsorção/dessorção de hidrogênio (A e D) e formação e redução dos óxidos de platina (B e C) [4].

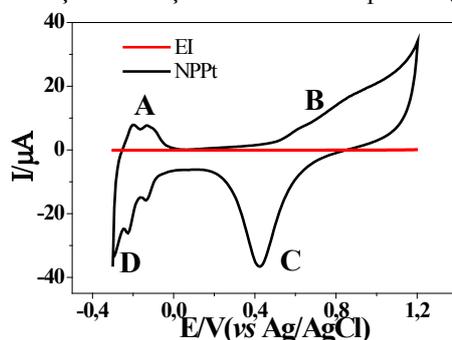


Figura 1: Comportamento eletroquímico do eletrodo impresso não modificado (vermelho) e após a adição de NPPt (preto).

Após a modificação da superfície, outros parâmetros foram otimizados para a geração de óxidos de platina. Esses parâmetros estão resumidos na tabela 1:

Tabela 1: Parâmetros otimizados na caracterização eletroquímica das nanopartículas de platina, visando as melhores condições para geração de óxidos.

Parâmetro estudado	Intervalo estudado	Valor escolhido
Volume adicionado	0,5 - 2 μL	1,0 μL
pH	1 - 6	1,0
Eletrólito	H_2SO_4 , HNO_3 , HClO_4	H_2SO_4
Velocidade de Varredura	5 - 200 mV s^{-1}	50 mV s^{-1}
Pré-tratamento	70 ciclos	50 ciclos

Após as caracterizações eletroquímicas do material em estudo, o eletrodo impresso modificado em condições otimizadas foi avaliado frente à oxidação de dapsona. Através da Figura 2, observa-se no voltamograma cíclico que existe um incremento no valor da corrente de pico anódica ($\Delta I \sim 3,36 \mu\text{A}$), na presença de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} de dapsona em solução, o que sugere uma interação no processo de oxidação da DDS pelo óxido de platina. O eletrodo não modificado não apresentou nenhum processo redox na presença de DDS no mesmo intervalo de potencial estudado para o eletrodo modificado.

Em teoria, poderíamos acompanhar a quantificação de dapsona monitorando o aumento da corrente de pico anódica referente à regeneração do óxido de platina. Porém, devido à formação de diferentes espécies de óxidos e hidróxidos, não se observa um aumento linear dos valores da corrente de pico anódica com o aumento da concentração de dapsona em solução. Desta forma, foi preferível trabalhar com o monitoramento do pico catódico na quantificação de dapsona, devido a sua melhor definição como também maior sensibilidade. Então a partir da corrente de pico catódica, foi construída uma curva analítica para a DDS, onde foi possível fazer a correlação entre a concentração de DDS e a

diminuição do pico catódico com linearidade de $5,0 \times 10^{-6}$ a $9,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com LD de $7,63 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ R = 0,9996.

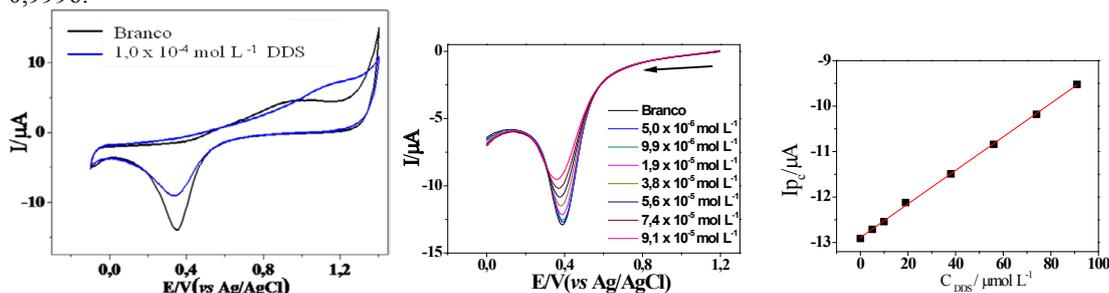


Figura 2: Voltametria Ciclica (esquerda), voltametria linear (centro) e curva analítica (direita) para as sucessivas adições de dapsona.

O eletrodo impresso modificado com nanopartículas de Pt foi aplicado na determinação de três amostras diferentes contendo DDS em comprimidos e os valores obtidos empregando o procedimento proposto mostraram-se muito próximos àqueles encontrados tanto pelo método comparativo quanto em comparação ao valor nominal apresentado pelo produto (Tabela 2).

Tabela 2: Valores obtidos pelo método proposto e o comparativo para a determinação de DDS em amostras reais.

Fármaco	mg DDS /cap.	Método proposto	Método UV-Vis	Err ₁ (%)	Err ₂ (%)
Amostra A	100	100,3 ± 1,0	100,7 ± 1,0	0,3%	0,4%
Amostra B	100	98,7 ± 3,0	100,2 ± 2,0	-1,3%	1,5%
Amostra C	100	100,6 ± 2,0	100,3 ± 3,0	0,6%	-0,3%

Err₁ = Erro relativo entre valor encontrado pelo método proposto e o valor rotulado. Err₂ = Erro relativo entre o valor encontrado pelo método de referência e o método proposto.

Os resultados obtidos para o teste *t* entre os valores apresentados pelas duas metodologias mostraram valores inferiores ao *t* calculado para um nível de confiança de 95%. Assim, o método proposto pode ser aplicado na determinação de DDS em amostras reais uma vez que não apresenta grandes diferenças em relação ao método comparativo.

CONCLUSÕES

Através da modificação do eletrodo impresso com nanopartículas de platina foi possível a aplicação desse sensor na determinação voltamétrica de dapsona em amostras farmacêuticas através da do decréscimo da corrente de pico catódica, que apesar de menos convencional que se mostrou eficiente, com valores estatisticamente semelhantes ao método comparativo para as amostras farmacêuticas, mostrando a potencialidade desse método desenvolvido.

AGRADECIMENTOS: UFPR, CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] Compton, R. G., Wildgoose, G. G., Rees, N. V., Streeter, I., Baron, R. *Chemical Physics Letters*, 459, 1, 2008.
- [2] Castro E. G, Salvatierra R. V, Schreiner W. H., Oliveira M. M., Zarbin A. J.G. *Chem. Mater.* 22, 360, 2010.
- [3] Queiroz, R.H.C., *Avaliação das alterações bioquímicas e hematológicas em pacientes hansenianos na terapia com dapsona*, Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Universidade de São Paulo: São Paulo, 1995.
- [4] Conway, B.E. *Progress in Surface Science*, 49, 4, 331, 1995

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS MODIFICADOS COM FILMES *LbL* DE FTALOCIANINA TETRASSULFONADA DE NÍQUEL E POLIELETRÓLITO SILSESQUIOXANO

Cleverson S. Santos¹, Rodolfo T. Ferreira¹, João Paulo Winiarski¹, Vagner dos Santos¹, Sergio T. Fujiwara², Karen Wohnrath¹, Christiana A. Pessoa¹

¹ Departamento de Química - Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Ponta Grossa - PR - Brasil; ² Departamento de Química - Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, Guarapuava - PR - Brasil; cleversons.santos@yahoo.com.br

RESUMO: Neste trabalho foram utilizados os polieletrólitos: cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano (SiPy^+Cl^-) e ftalocianina tetrassulfonada de níquel (NiTsPc) na construção de filmes pela técnica *Layer-by-Layer* para o desenvolvimento de um sensor voltamétrico. Os filmes obtidos foram caracterizados utilizando-se as técnicas de UV-VIS, AFM e voltametria cíclica. Os espectros de UV-Vis mostraram que a cada bicamada depositada tem-se aproximadamente a mesma quantidade de moléculas depositadas. As caracterizações por AFM mostraram que a rugosidade média dos filmes ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{NiTsPc}$)_n diminui com o aumento do número de bicamadas. Os eletrodos foram caracterizados utilizando-se a técnica de voltametria cíclica, e determinou-se que o eletrodo de melhor resposta foi o de duas bicamadas em que a molécula de NiTsPc se encontra na camada externa, pois nesta configuração o processo de transferência de carga é facilitado. Utilizando-se a técnica de voltametria de onda quadrada foi possível quantificar dopamina com LD de $1,37 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Palavras-chave: Ftalocianina tetrassulfonada de níquel, *LbL*, polieletrólito, silsesquioxano.

INTRODUÇÃO

Os filmes construídos pela técnica *LbL* (*layer-by-layer*), apresentam-se altamente organizados e em escala nanométrica. A técnica *LbL* foi primeiramente proposta por Sagiv na década de 80 e mais tarde Decher et al. reformulou o método proposto por Sagiv, e estendeu o método de construção de filmes a qualquer composto que possa ser solubilizado, baseado na deposição alternada de camadas de compostos de cargas opostas onde a interação predominante é eletrostática. Esta técnica se destaca, porque apresenta baixo custo, simplicidade experimental, e permite combinar muitos compostos como: biomoléculas, complexos inorgânicos, polímeros, desde que esses sejam solúveis em meio aquoso^{1, 2}. A principal aplicação destes filmes é no desenvolvimento de biossensores e sensores eletroquímicos.

As ftalocianinas metaladas são complexos macrocíclicos altamente conjugados apresentam estabilidade térmica e química, solubilidade em água, atividade redox definida, e são semicondutores. Na literatura encontram-se muitos trabalhos relatando a utilização destes compostos no desenvolvimento de sensores eletroquímicos³. Dentre as ftalocianinas metaladas, a tetrassulfonada de níquel (NiTsPc) se destaca, pois apresenta atividade redox bem definida. O polieletrólito cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano (SiPy^+Cl^-) é um composto que apresenta propriedades interessantes para a construção de filmes *LbL* tais como: solubilidade em água, alta capacidade de formação de filmes finos, além de ser um trocador iônico. Desta forma, neste trabalho espera-se que a combinação destes dois polieletrólitos na forma de filmes *LbL* possa propiciar novas propriedades físico-químicas de modo a potencializar a aplicação destes materiais como sensor eletroquímico na determinação de dopamina (DA).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Foram construídos filmes utilizando os polieletrólitos NiTsPc e SiPy^+Cl^- em duas configurações ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{NiTsPc}$)_n e ($\text{NiTsPc}/\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$)_n com diferentes números de bicamadas (2 a 24). Os filmes foram depositados sobre a superfície do substrato FTO (óxido de estanho dopado com flúor). Os filmes foram secos entre a deposição de uma monocamada e outra utilizando jato de ar quente. A Tabela 1 informa o tempo de imersão, pH, e concentrações utilizadas dos polieletrólitos para a construção dos filmes.

Tabela 1: Parâmetros utilizados para a construção dos filmes *LbL* à base de SiPy^+Cl^- e NiTsPc .

Solução	Concentração	Tempo de Imersão	pH
NiTsPc	2 mg/mL	5 min.	8
Solução de Lavagem	$\text{H}_2\text{O}/\text{NaOH}$	1 min.	8
SiPy^+Cl^-	4 mg/mL	5 min.	3
Solução de Lavagem	$\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$	1 min.	3

As soluções dos polieletrólitos e também a deposição das bicamadas em ambas as configurações foram monitorados pela técnica espectroscópica de UV-VIS, utilizando-se o espectrofotômetro VARIAN modelo Cary 50 Bio. Os filmes nas duas configurações e também o substrato foram caracterizados morfologicamente pela técnica de microscopia de força atômica (AFM) com um microscópio SHIMADZU modelo SPM 9600, pelo modo não contato. As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato μ -autolab tipo III (autolab/Ecochemie) utilizando-se uma cela eletroquímica de capacidade de 10 mL contendo três eletrodos: contra eletrodo de platina de área de 1 cm², eletrodo de referência de Ag/AgCl e eletrodo de trabalho de 0,5 cm² contendo os filmes finos. Inicialmente, os filmes em ambas as configurações foram caracterizados eletroquimicamente utilizando a técnica de voltametria cíclica. A partir desta técnica, foram realizados estudos em diferentes velocidades de varredura, eletrólitos suporte e pH, na ausência e na presença de espécie eletroativa DA $9,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Para a aplicação dos filmes como sensor, utilizou-se a voltametria de onda quadrada. Para tanto, realizou-se primeiramente estudos de otimizações dos parâmetros desta técnica como: amplitude, incremento e frequência. Utilizando-se os parâmetros otimizados, os filmes foram aplicados como sensores voltamétricos na determinação de DA, na faixa de concentração estudada foi de $4,9 \times 10^{-5}$ a $4,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As ftalocianinas apresentam duas regiões de absorção uma na faixa de 200 a 300 nm, região que apresenta a chamada banda Soret, e outra na região de 500 a 700 nm, referente a banda Q. A região da banda Q foi a escolhida para a caracterização das soluções, e para o monitoramento da deposição das bicamadas. O polieletrólito SiPy⁺Cl⁻, não apresenta absorção nesta faixa de comprimento de onda. A Figura 1 mostra os espectros referentes aos filmes SiPy⁺Cl⁻/NiTsPc e NiTsPc/SiPy⁺Cl⁻.

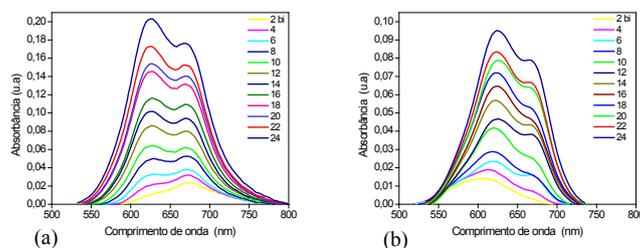


Figura 1: Espectros de absorção na região do UV-VIS para os filmes (a) SiPy⁺Cl⁻/NiTsPc (b) NiTsPc/SiPy⁺Cl⁻, com diferentes números de bicamadas.

Para ambas as configurações de filmes, tanto para a banda referente à forma dimérica quanto para a forma monomérica foi possível estabelecer a relação entre a absorbância e o número de bicamadas depositadas, e pode-se observar que a absorbância aumentou linearmente com o aumento do número de bicamadas, mostrando que a cada bicamada depositada tem-se aproximadamente a mesma quantidade de material sendo depositado. Ao analisar os espectros referentes à configuração SiPy⁺Cl⁻/NiTsPc, pode-se observar que durante as primeiras deposições as bandas relativas a forma monomérica são mais intensas, quando comparadas a outra configuração, fato que pode ser atribuído a maior organização das moléculas imobilizadas.

Os filmes nas duas configurações NiTsPc/SiPy⁺Cl⁻ e SiPy⁺Cl⁻/NiTsPc, foram caracterizados pela técnica de microscopia de força atômica (AFM). Observou-se que a rugosidade média dos filmes diminuiu com o aumento do número de bicamadas depositadas, fato que pode ser atribuído a adsorção das espécies entre os grãos (partículas de óxido) da superfície do substrato, ocasionando uma diminuição na rugosidade em ambas as configurações. Pôde-se observar que a rugosidade média dos filmes NiTsPc/SiPy⁺Cl⁻ foi maior quando comparada com a rugosidade dos filmes SiPy⁺Cl⁻/NiTsPc. Isso ocorre provavelmente devido ao fato de que nas primeiras bicamadas deve ocorrer a repulsão entre as moléculas de NiTsPc e o substrato de mesma carga. No entanto, à medida que mais bicamadas vão sendo depositadas, a deposição começa a ser mais efetiva proporcionando um decréscimo na rugosidade média. Os filmes com diferentes bicamadas foram também caracterizados utilizando-se a técnica de voltametria cíclica em HNO₃ 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5), na presença de dopamina $9,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O eletrodo (SiPy⁺Cl⁻/NiTsPc)₂ de duas bicamadas apresentou potencial de pico anódico em 1,0 V vs Ag/AgCl, referente ao processo de oxidação da molécula de dopamina, e foi o que apresentou a maior intensidade de corrente, pois provavelmente a difusão de íons e a transferência de elétrons nesta configuração é facilitada. Os eletrodos com configuração (NiTsPc/SiPy⁺Cl⁻), com menor número de bicamadas apresentaram apenas corrente capacitiva. No entanto, com o aumento do número de bicamadas os eletrodos apresentaram um pico anódico em aproximadamente 1,2 V vs Ag/AgCl. Porém, quando se compara a corrente obtida com essa configuração de eletrodo com a configuração oposta pode-se observar que a intensidade de corrente é menor e os voltamogramas não são definidos, o que é uma indicação de que a espécie responsável pelo processo de transferência de elétrons é a molécula de ftalocianina. Estudos em diferentes velocidades de varredura mostraram que o sistema em estudo tem característica de sistema quasi-reversíveis, pois com o aumento da velocidade de varredura pode-se observar que o

potencial de pico deslocou-se para potenciais mais positivos e a distância entre os potenciais de pico aumentaram em função do aumento da velocidade. A correlação entre a corrente de pico anódica e a raiz quadrada da velocidade de varredura foi linear, informando que o processo de transferência de elétrons é controlado por difusão.

Como o objetivo deste trabalho é aplicar o eletrodo como sensor eletroquímico foi utilizada a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV) por ser uma técnica mais sensível do que a voltametria cíclica. Após as otimizações dos parâmetros envolvidos na técnica como incremento 2 mV, frequência 20 Hz e amplitude 40 mV, foi possível obter a curva analítica, e obteve-se um limite de detecção de $1,37 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O limite de detecção é superior ou está na mesma faixa de eletrodos semelhantes a este encontrados na literatura⁴, e o mesmo pode ser aplicado como sensor eletroquímico para a determinação de DA em fármacos.

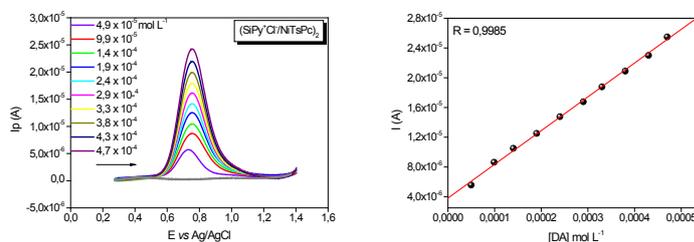


Figura 2: (a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos a partir do filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{NiTsPc})_2$, $f = 20 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, em solução de HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,5, (b) Correlação entre a corrente de pico em função da concentração de DA.

CONCLUSÕES

Os espectros de UV-VIS confirmaram que a cada bicamada depositada obtém-se aproximadamente a mesma quantidade de material sendo depositada. Estudos de voltametria cíclica indicaram que a espécie responsável pelo processo de transferência de carga é a molécula de NiTsPc, e apontaram que o eletrodo de melhor resposta na presença de DA é o que possui a configuração $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{NiTsPc})_2$. Este sistema apresentou características de processos quasi-reversíveis. Utilizando-se a técnica de voltametria de onda quadrada foi possível quantificar concentrações de DA, e obteve-se um limite de detecção de $1,37 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

AGRADECIMENTOS: Ao CNPq pela bolsa concedida (MCT/CNPq n^o 70/2009 – n^o processo 55397/2010-0).

REFERÊNCIAS

- [1] DECHER, G.; Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites, *Science Z*, v. 277, 1997.
- [2] CRESPILO, F. N.; ZUCOLOTO, V.; OLIVEIRA Jr.; O. N.; NART, F. C.; *Electrochemistry of Layer-by-Layer Films: a review*, *Int. J. Electrochem. Sci.*, v. 1, p. 194-214, 2006.
- [3] CLAESSENS, C. G.; HAHN, U.; TORRES, T.; Phthalocyanines: From Outstanding Electronic Properties to Emerging Applications, *The Chemical Record*, v. 8, p. 75–97, 2008.
- [4] JESUS, C. G.; SANTOS, V.; CANESTRARO, C. D.; ZUCOLOTO, V.; FUJIWRA, S. T.; GUSHIKEM, Y.; WOHNATHK.; PESSOA, C. A.; Silsesquioxane as a New Building Block Material for Modified Electrodes Fabrication and Application as Neurotransmitters Sensors, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v. 11, n. 4, 2011.

CINÉTICA DE TRANSFERÊNCIA ELETRÔNICA DIRETA E MEDIADA DA ENZIMA HRP SOBRE DIFERENTES MATERIAIS NANOESTRUTURADOS

Saimom Moraes Silva¹, Delton Martins Pimentel¹, Rita de Cássia Silva Luz^{1,3}, Wallans Torres Pio dos Santos¹ (PQ) Lauro Tatsuo Kubota^{2,3}, Flávio Santos Damos^{1,3}

¹ Departamento de Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, Diamantina - MG – Brasil; ² Instituto de Química - Unicamp, Campinas - SP - Brasil; ³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, UNICAMP, Campinas-SP-Brazil.
flavio_damos@ufvjm.edu.br

RESUMO: Recentemente, o interesse no emprego de materiais nanoestruturados como suporte para TED de enzimas tem sido crescente. No presente trabalho foi realizado estudo sobre o percentual de Transferência Eletrônica Direta (TED) e Mediada (TEM) da enzima HRP sobre materiais baseados em Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas (MWCNT, do inglês Multiwalled Carbon Nanotubes), nanopartículas de ouro (AuNP) e monocamadas auto-organizadas de mercapto-piridina (MPD). Com propósito comparativo foram confeccionados três substratos para imobilização da Enzima HRP: (Substrato 1) MWCNT, (Substrato 2) MWCNT/AuNP e (Substrato 3) foi constituído de MWCNT/AuNP/MPD. Para cada modificador, após a imobilização da HRP, foram realizadas medidas com Eletrodo de Disco Rotativo e amperometria. Através destes estudos ficou evidente o aumento da TED de 50% no MWCNT/HRP para 98 % no eletrodo modificado com MWCNT/AuNP/MPD/HRP. Tais resultados demonstram que os eletrodos modificados explorando a sinergia dos nanotubos de carbono, nanopartículas de ouro e monocamada de mercaptopiridina apresentam-se como excelentes materiais para se explorar a TED para a enzima HRP.

Palavras-chave: Horseradish Peroxidase, materiais nanoestruturados, TED e TEM

INTRODUÇÃO

Um biossensor pode ser definido como um sensor que utiliza um material biológico (enzimas, anticorpos, antígenos, DNA, etc.) imobilizado a um transdutor que irá converter um sinal biológico em um sinal mensurável^[1]. A utilização de um elemento biológico permite fazer uso da seletividade única das biomoléculas para espécies alvo, fazendo com que ocorra uma significativa diminuição na leitura de interferentes. O sinal traduzido no biossensor é resultante da reação entre o material de bio-reconhecimento e o analito alvo (por oposição ao sinal obtido num eletrodo clássico que provém diretamente da reação do analito com este).

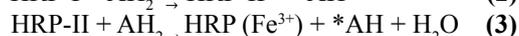
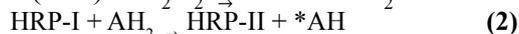
Para a melhora da sensibilidade dos biossensores e eletrocatalise do processo, eletrodos são modificados com filmes de biomoléculas, nanopartículas, polímeros condutores, entre outros. Os polímeros condutores e nanomateriais têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento destes sensores devido à versatilidade de suas propriedades físicas e químicas^[2].

Neste contexto, os nanotubos de carbono (CNT) têm surgido como uma nova classe de nanomateriais que têm despertado considerável interesse nos últimos anos na preparação de modificadores de superfícies de eletrodos devido à sua elevada área superficial, alta condutividade elétrica e estabilidade química, que quando em conjunto com as outras espécies modificadoras potencializam a detecção dos mais diversos analitos.

Por sua vez, dentre os principais materiais utilizados como base para o desenvolvimento de sensores encontram-se tradicionalmente o carbono vítreo, grafite pirolítico, pasta de carbono e grafite compósito, podendo ainda ter suas superfícies modificadas com enzimas redox, tais como tirosinase, lacase e peroxidase quando o propósito é desenvolver biossensores.

O uso de enzimas óxiredutases como modificadores tem sido muito comum em construção de biossensores amperométricos porque as mesmas catalisam uma reação química redox, envolvendo uma etapa de transferência eletrônica de seu próprio ciclo natural contudo são raros os trabalhos de caracterização da TED e TEM para os biossensores desenvolvidos. A enzima Horseradish Peroxidase (HRP) catalisa a oxidação de uma variedade de compostos inorgânicos e orgânicos na presença de peróxido de hidrogênio através de seu sítio ativo protoporfirínico.^[3]

O ciclo catalítico das peroxidases pode ser descrito através das seguintes equações:



onde HRP-I e HRP-II são intermediários oxidados da enzima, AH₂ é o substrato redutor e *AH é um radical livre.

Na primeira etapa, a enzima reduz o peróxido formando um composto oxidado intermediário (HRP-I) de elevado estado de oxidação. A forma oxidada da enzima é então, reduzida à sua forma nativa em duas etapas, sendo que em

cada etapa uma substância orgânica é oxidada, podendo este processo ocorrer de forma direta ou mediada.

Na transferência de elétrons direta (TED) as formas oxidadas da enzima são reduzidas por elétrons doados do próprio eletrodo. Já na transferência mediada (TEM) de elétrons, a enzima recebe elétrons de substâncias doadoras (AH_2), que podem ser fenóis, aminas aromáticas, ou ferrocenos.

Na presença de uma substância doadora de elétrons a enzima é regenerada e as espécies $*AH$ formadas são reduzidas eletroquimicamente no eletrodo, resultando em uma corrente de redução proporcional à concentração da substância doadora.

Desta forma os fenóis, tais como a dopamina podem atuar como doadores de elétrons na reação da peroxidase com peróxidos, sendo este o princípio da utilização de eletrodos modificados com peroxidase para a detecção de espécies fenólicas em células eletroquímicas.^[4]

A sensibilidade dos biossensores a base de peroxidase para a determinação de fenol é limitada pela corrente produzida pela transferência de elétrons direta entre a enzima e o eletrodo na presença apenas de peróxido, sendo interessante uma diminuição neste processo para aumentar a sensibilidade do biossensor para fenol. Neste sentido, o estudo da cinética de TED e TEM da HRP sobre novos materiais de eletrodo é fundamental para se aperfeiçoar os mais diversos biossensores a base desta enzima.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos eletroquímicos foram conduzidos em uma cela eletroquímica de três compartimentos com a utilização de três eletrodos sendo eles: eletrodo de carbono vítreo ($\text{Área} = 0,071 \text{ cm}^2$), de Ag/AgCl ($\text{NaCl } 3 \text{ molL}^{-1}$) e de Pt, como eletrodos de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente. As medidas eletroquímicas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato AUTOLAB PGSTAT 128N e as medidas Hidrodinâmicas de Eletrodo de Disco Rotativo foram conduzidas em um Rotatório PINE modelo AFMSRCE. Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água purificada em ultrapurificador GEHAKA ($18\text{M}\Omega$)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram conduzidos voltamogramas lineares para o eletrodo modificado com MWCNT/HRP sob diferentes velocidades de rotação do eletrodo em tampão fosfato pH 7 e uma concentração de peróxido de $200 \mu\text{molL}^{-1}$ (Figura 1). Este estudo produz duas informações de extrema importância relacionadas à viabilidade dos estudos de quantificação da TEM e TED: (1) a corrente de redução do peróxido de hidrogênio é proporcional à velocidade de rotação do eletrodo e (2) o eletrodo modificado apresenta estabilidade mesmo sob condições hidrodinâmicas.

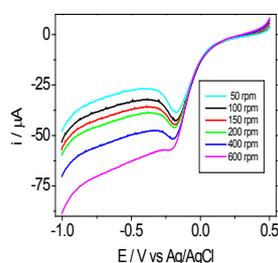


Figura 1. Voltamogramas linear para eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT/HRP em $200 \mu\text{molL}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ em diferentes velocidade de rotação do eletrodo.

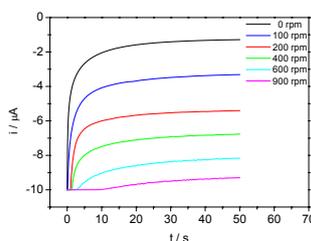


Figura 2. Medidas de Amperometria com eletrodo de disco rotatório modificado com MWCNT/HRP em $200 \mu\text{molL}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ em diferentes velocidade de rotação do eletrodo.

Na Figura 2 são apresentados amperogramas sob diferentes velocidades de rotação do eletrodo ($\omega = 0, 100, 200, 400, 600$ e 900 rpm) na presença de $200 \mu\text{molL}^{-1}$ de H_2O_2 . Conforme pode ser observado, à medida que a velocidade de rotação do eletrodo aumenta há uma maior corrente catódica referente à redução do peróxido de hidrogênio. Neste sentido, foram plotados os Gráficos de Levich e Koutecky-Levich (Figura 3) com o propósito de avaliar a existência de controle cinético no experimento realizado.

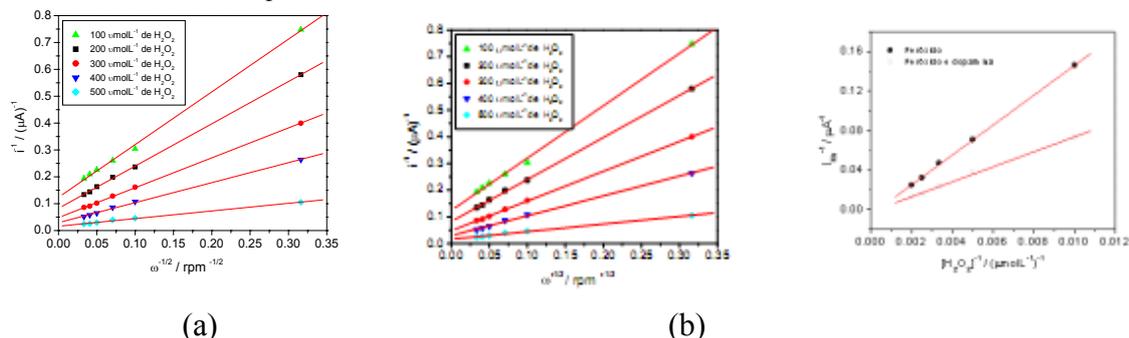


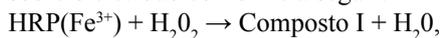
Figura 3. (a) Gráfico de Levich referente aos dados da Figura 2, (b) Gráfico de Koutecky-Levich para eletrodo modificado com MWCNT/HRP: $100 \mu\text{molL}^{-1}$; $200 \mu\text{molL}^{-1}$; $300 \mu\text{molL}^{-1}$; $400 \mu\text{molL}^{-1}$ e $500 \mu\text{molL}^{-1}$ (c) Dependência dos interceptos dos gráficos de Koutecky-Levich com a concentração de peróxido na ausência e presença de dopamina.

O comportamento linear obtido na Figura 3b-c estão em concordância com a Equação de Koutecky-Levich, de forma que é possível extrair os parâmetros cinéticos para a cinética direta e direta-mediada:

$$I^{-1} = I_k^{-1} + I_L^{-1}$$

onde I_k e I_L ($I_L = 0,62nFAD^{2/3}\omega^{1/6}c^*$) representam as correntes cinética e difusional, respectivamente.

A análise dos dados foi conduzida explorando duas abordagens diferentes: (a) Mecanismo de transferência eletrônica direta e (b) mecanismo de transferência eletrônica direta e mediada ocorrendo simultaneamente. Na primeira abordagem a redução de peróxido é conduzido pela enzima e a redução do sítio ativo da enzima ocorre diretamente sobre o eletrodo conforme a seguir:

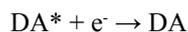
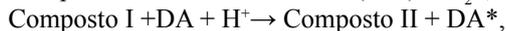
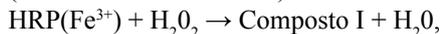


onde k_1 e k_s representam as constantes de velocidade referente às etapas 1 e 2, respectivamente.

Para tal abordagem, a I_k é dada por:

$$1/I_k = 1/nFEDET1k_1c^* + 1/k_s$$

Para a segunda abordagem, a redução de peróxido também é conduzido pela enzima, contudo a redução do sítio ativo da enzima ocorre diretamente sobre o eletrodo bem como indiretamente mediante uma molécula doadora (neste caso usamos a DA) conforme o mecanismo a seguir:



Para a segunda abordagem, a I_k é dada por:

$$1/I_k = 12Fn1ETotal1k_1c^* + 1/k_3[\text{DA}]$$

Com base nas expressões para corrente cinética anteriores para TED e TED/TEM foram estimados os percentuais de TED e TEM para os materiais confeccionados sendo obtido respectivamente: 50% de TED para MWCNT/HRP,

Através de estudos amperométricos e voltametria hidrodinâmica, ficou evidente o aumento da TED de 50% para 98 % no eletrodo modificado com a piridina e nanopartículas de ouro. Tais resultados demonstram que os eletrodos modificados de tal forma apresentam-se como excelentes materiais para se explorar a TED para a enzima HRP mediante um bloqueio mais eficiente da TEM sobre materiais nanoestruturados.

AGRADECIMENTOS: FAPEmig e CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] Fatibello Filho, O.; Capelato, M. D.; "Biossensores," in *Quím. Nova*, v.15, n.2 pp. 28-39, 1992.
- [2] A.K. Sarma, P. Vatsyayan, P. Goswami, S.D. Minter, Recent advances in materials science for developing enzyme electrodes, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2313–2322 e T. Rajesh, D. Ahuja, Kumar, Recent progress in the development of nanostructured conducting polymers/nanocomposites for sensor application, *Sens. Actuators*, 136, 275–286, 2009.
- [3] Rugas, T., Csöregi, E., Emméus, J., Gorton, L. e Marko-Varga, G., Peroxidases-modified electrodes: Fundamentals and Application. *Anal. Chim. Acta*, 330, 123, 1996.
- [4] Ruzgas, T.; Gorton, L.; Emméus, J.; Marko-Varga, G.; *J. Electroanal. Chem.*, 41, 391, 1995.

ÁCIDO FERÚLICO: UM NOVO MEDIADOR REDOX PARA OXIDAÇÃO ELETROCATALÍTICA DE NADH

Wilson C. Silva¹, Phabyanno R. Lima^{1,2,3}, Francisco A. S. Silva^{1,3}, Cleylton B. Lopes^{1,3}, Erivaldo O. Costa^{1,3}, Lauro T. Kubota³, Marília O. F. Goulart^{1,3}

¹Instituto de Química e Biotecnologia, UFAL, Maceió-AL-Brasil; ²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Alagoas, IFAL, Maceió-AL-Brasil; ³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, UNICAMP, Campinas-SP-Brasil. eri_olc@yahoo.com.br

RESUMO: Neste trabalho é descrito o desenvolvimento e aplicação de uma plataforma nanoestruturada a base de ácido ferúlico (AF), um novo mediador redox, e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) com foco na oxidação eletrocatalítica da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). O AF foi eletrodepositado in situ sobre eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT e um sistema quinônico ($E^0 = 0,18 \text{ V vs. Ag/AgCl}$) foi obtido a partir da oxidação irreversível do grupo funcional hidroxila do AF. A plataforma foi caracterizada por voltametria cíclica e cronoamperometria. Assim, foram obtidos os valores do coeficiente de difusão ($D_{\text{NADH}} = 4,49 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) e constante catalítica da reação ($k_{\text{cat}} = 5,57 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para a NADH. Após otimização, o sensor apresentou em relação à NADH um potencial de detecção ($0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$), uma faixa linear de resposta ($1-20 \mu\text{mol L}^{-1}$), limite de detecção ($0,092 \mu\text{mol L}^{-1}$), sensibilidade ($0,29 \mu\text{A L}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$) e tempo de resposta ($0,2 \text{ s}$).

Palavras-chave: Ácido Ferúlico, MWCNT, NADH, Eletrodo Quimicamente Modificado, Eletrocatalise

INTRODUÇÃO

A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) é uma coenzima bastante estudada devido à grande quantidade de enzimas desidrogenases que dependem do processo redox da mesma, e devido a sua importância como transportador de elétrons em células vivas. Atualmente sabe-se que existem cerca de 250 enzimas que dependem da NAD(H) e 150 NAD(P) [1].

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

Estudos com ênfase na oxidação eletrocatalítica de NADH têm atraído considerável atenção em anos recentes. Estes mediadores incluem quinonas [2] e recentemente os nitroderivados [3], entre outros. Por outro lado, alguns desses catalisadores apresentam uma série de limitações como baixa sensibilidade e estabilidade, reprodutibilidade ou modestas constantes de velocidade. Assim, há uma busca contínua por novos dispositivos que possam contornar tais problemas.

Por essa razão, o presente trabalho lança mão de um novo mediador redox, o ácido ferúlico (AF), ácido-4-hidroxi-3-metoxicinâmico. AF é um fenol muito encontrado no tecido de plantas. Este ácido é um constituinte bioativo de muitos alimentos, tais como, grãos, frutas cítricas, banana, brócolis, entre outras. Além de ser aprovado como um aditivo conservante/antioxidante no Japão, seu sal de sódio é usado na China para o tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrais [4].

Apesar de possuir uma estrutura química relativamente simples, viabilizando-o como um bom candidato a mediador, o AF possui subunidades estruturais químicas estratégicas. Estas subunidades podem desempenhar papéis fundamentais na confecção e ótimo desempenho de um eletrodo quimicamente modificado:

- I) O grupo carboxila é fundamental, pois pode permitir a conexão da enzima requerida;
- II) A dupla ligação permite a conjugação entre a parte aromática e a carboxila ajudando a estabilizar espécies transientes formadas, o que é importante, pois diminui o sobrepotencial de oxi-redução;
- III) O anel aromático, altamente conjugado pode estabilizar radicais e cátions formados, possibilitar ainda a formação de polímeros e conferir alta estabilidade;
- IV) A hidroxila fenólica localizada na posição para conjugada com II e I, pode perder elétrons de forma relativamente fácil, para constituir um possível par redox;
- V) A metoxila em posição orto à hidroxila possui pares de elétrons não ligantes e, portanto, em conjugação com possíveis espécies deficientes em elétrons que se formam a partir da hidroxila, torna-se um bom nucleófilo, que, carregado positivamente, sofre ataque nucleofílico por uma molécula de água, com quebra do éter e formação de uma orto-quinona.

Neste sentido, descreve-se pela primeira vez, o desenvolvimento de uma nova plataforma nanoestruturada funcionalizada com AF eletrodepositado em nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês MWCNT) para detecção eletrocatalítica de NADH. O eletrodo modificado ECV/MWCNT/

AF foi caracterizado usando as técnicas voltamétricas e cronoamperométricas com intuito de obter os parâmetros cinéticos e analíticos tanto na ausência quanto na presença de NADH.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Alumina dispersa de 1,0, 0,5 e 0,3 μm de diâmetro (Fortel) foi utilizada para polimento da superfície do eletrodo de carbono vítreo (ECV). Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) (>95%, 10–20 nm de diâmetro, 5–20 μm de comprimento NanoLab, Inc. Brighton) foram dispersos em dimetilformamida (DMF, Nuclear). O eletrodo foi modificado utilizando 5 μL da mesma dispersão de nanotubos citada anteriormente, sendo que esse volume final foi distribuído em 5 alíquotas de 1,0 μL . A cada adição o sistema foi deixado em estufa a 80 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. O ECV/MWCNT foi imerso em uma solução de AF, sendo a concentração ótima a 0,4 mmol L^{-1} (tampão fosfato, $\text{pH}=4,5$). Em seguida, a espécie eletroativa foi eletrogerada, sistema quinônico, sobre a plataforma ECV/MWCNT por um processo de eletrodeposição. Os experimentos eletroquímicos foram conduzidos numa célula eletroquímica (com capacidade de 10 mL) e utilizando-se um eletrodo de prata cloreto de prata (Ag/AgCl) como referência e um fio de platina como eletrodo auxiliar. Oxigênio foi removido pelo borbulhamento de nitrogênio através da solução por ao menos 10 min. As medidas eletroquímicas foram realizadas em potenciostato/gavanostato modelo PGSTAT-30 de Autolab Echo chemie (Utrecht, Holanda).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Processo de ativação do ácido ferúlico sobre ECV/MWCNT

O AF foi eletrodepositado *in situ* sobre ECV/MWCNT através de sucessivas varreduras de potencial no sentido anódico com $E_{\text{inicial}} = -0,25 \text{ V}$ e $E_{\lambda} = 0,575 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ (10 ciclos, $\nu = 0,02 \text{ V s}^{-1}$) (Figura 1A). Em seguida, o ECV/MWCNT/AF obtido foi lavado e imerso em uma nova solução tampão. Assim, foi possível observar a formação de um sistema quinônico (Figura 1B), Ia/Ic, com $E^0 = 0,18 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ (3M), a partir da oxidação irreversível do grupo funcional hidroxila do AF (IIa) e um pico catódico IIc, sendo que, tanto o pico IIa quanto o IIc desaparecem quando o eletrodo é lavado e transferido para uma nova solução tampão isenta de AF (Figura B). A formação do pico Ia/Ic só é possível devido o ácido ferúlico ter seu grupo metoxila quebrado e convertido a carbonila, formando assim, o sistema orto-quinona, como mostrado no mecanismo proposto (C)[5].

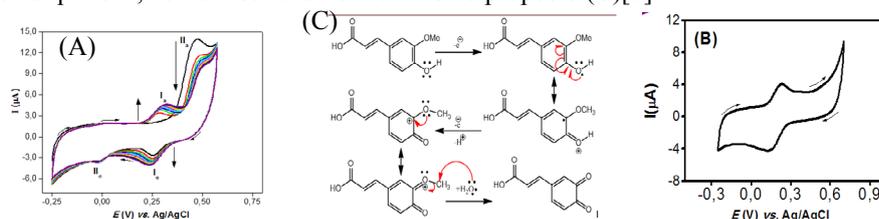


Figura 1. (A) Voltamogramas cíclicos (VCs) para a eletrodeposição e ativação do ECV/MWCNT com ácido ferúlico 0,4 mmol L^{-1} , em PBS 0,1 mol L^{-1} , pH 4,5 e $\nu = 0,020 \text{ V s}^{-1}$. (B) VC do eletrodo ECV/MWCNT/AF em PBS 0,1 mol L^{-1} , pH 7,0. (C) Proposta de mecanismo de ativação do AF sobre o ECV/MWCNT.

Oxidação eletrocatalítica de NADH pelo MWCNT/AF, estudos cronoamperométricos, EDR e analítico

Para verificar a atividade eletrocatalítica do ECV/MWCNT/AF na presença de NADH, alguns ensaios foram realizados. A Figura 2A mostra os voltamogramas cíclicos para um eletrodo modificado em PBS 0,1 mol L^{-1} ($\text{pH} = 7,0$), com $E_{\text{inicial}} = -0,1 \text{ V}$ e $E_{\lambda} = 0,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, na ausência e na presença de NADH. Após adição de NADH a solução (Fig. 2A), o pico de oxidação aumenta significativamente e o pico de redução do mediador diminui na presença de NADH, indicando, portanto, uma eletrocatalise eficiente. Na ausência de AF, o sistema ECV/MWCNT apresenta um alto potencial de detecção [2] quando comparado ao ECV/MWCNT/AF essa diferente é de aproximadamente 200 mV vs. Ag/AgCl, apresentando, portanto, um efeito sinérgico entre o MWCNT e AF. Além disso, a oxidação catalítica de NADH pelo MWCNT/AF foi também estudado pelo método cronoamperométrico de duplo salto de potencial com $E_{\text{inicial}} = 0,2 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ (Fig. 2B). Assim, a partir dos cronoamperogramas e usando a equação de Cottrell [6], o coeficiente de difusão do NADH foi determinado para o MWCNT/AF e apresentou um valor de $4,49 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para o NADH. Este valor está próximo dos valores reportados na literatura [2,3]. Para uma melhor avaliação quantitativa do comportamento eletrocatalítico da oxidação de NADH frente ao ECV/MWCNT/AF, medidas cinéticas foram realizadas em diferentes concentrações de NADH, em várias velocidades de rotação ω (rad s^{-1}). Estes experimentos foram realizados em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) e uma velocidade de varredura fixa de 5 mV s^{-1} (Fig. 2C). A partir dos gráficos de Koutecky-Levich (Fig. 2D) e usando sua respectiva e bem conhecida equação para reações catalíticas empregando eletrodos contendo mediadores de elétrons [6], calculou-se a constante catalítica, κ_{cat} , do processo reacional entre a NADH e eletrodo modificado, a qual apresentou um valor de $5,77 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$.

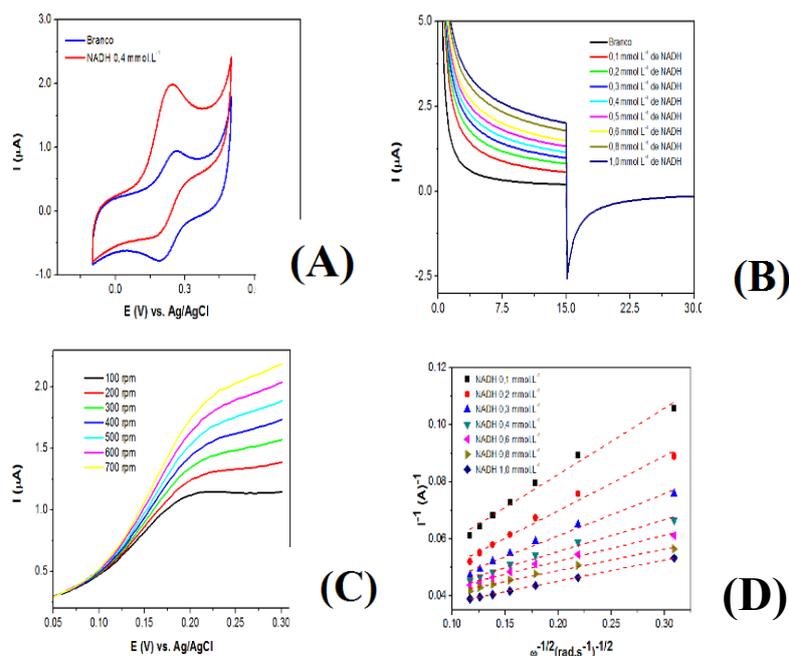


Figura 2. (A) voltamogramas cíclicos para o ECV/MWCNT/AF na ausência e presença de NADH, $v = 2 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Curvas I-t obtidas pela técnica de cronoamperometria de duplo salto de potencial em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7. (C) Curvas de polarização obtidas para oxidação electrocatalítica de NADH, $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 5,0 \text{ mV s}^{-1}$. (D) Gráficos de Koutecky-Levich da Fig.2C.

Caracterização analítica e aplicação do sensor proposto

Após a otimização dos parâmetros operacionais, com o objetivo de se obter uma curva analítica para o sensor desenvolvido, estudos amperométricos para detecção e quantificação de NADH foram conduzidos em diferentes concentrações do analito com $E_{\text{detecção}} = 0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,0 (Fig. 3). O sensor proposto apresentou uma ampla faixa de resposta linear de $1,0$ a $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (insert da Fig. 3), que pode ser expressa de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta I_p / \mu\text{A} = 0,29 (\pm 0,01) + 0,12 (\pm 0,01) [\text{NADH}] / \mu\text{mol L}^{-1}$$

com um coeficiente de correlação de 0,999 (para $n=20$).

A sensibilidade obtida de $0,12 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ foi melhor que em outros trabalhos descritos na literatura. A boa sensibilidade pode ser atribuída à eficiência da transferência eletrônica entre AF eletrodepositado sobre MWCNT e NADH. Um limite de detecção de $0,092 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi determinado, usando $3\sigma/b$, sendo σ o desvio padrão para 10 amperogramas do branco, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC. Além disso, o tempo de resposta do sensor é muito curto, alcançando 100% de máximo da sua resposta em $0,2 \text{ s}$.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi demonstrado de forma simples o uso de um MWCNT/AF para a determinação electrocatalítica de NADH. O sensor desenvolvido possibilita detectar e quantificar NADH de forma mais precisa, rápida e estável, portanto, tornando-se uma alternativa em potencial para o desenvolvimento de biossensores a base de enzimas NADH dependentes.

AGRADECIMENTOS: Ao PNPd, CNPQ, CAPES.

REFERÊNCIAS

- [1] GORTON, L.; DOMÍNGUEZ, E.. *Reviews in Molecular Biotechnology* (**82**) 371-392, 2002.
- [2] SILVA, F.A.S.; LOPES, C.B.; COSTA, E.O.; LIMA, P.R.; KUBOTA, L.T.; GOULART, M.O.F.. *Electrochemistry Communications* (**12**) 450-454.5, 2010.
- [3] LIMA, P.R.; WILNEY, J. R.; SANTOS, A.B.O., GOULART, M.O.F.; KUBOTA, L.T.. *Biosensors and Bioelectronics* (**24**) 448-454, 2008.
- [4] ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H.. *Food Chemistry* (**109**) 691-702, 2008.
- [5] MILCZAREK, G.. *Electrochemistry Communication* (**9**) 123-127, 2007.
- [6] BARD, A.J.; FAULKNER, L.R.. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, 2001.

APLICAÇÃO DA RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE (SPR) NO ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA CHAGASI* SOBRE MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS

Dênio E. P. Souto¹, Jussara V. Silva¹, Helen R. Martins², Alexandre B. Reis⁴, Rita C. S. Luz^{1,3}, Lauro T. Kubota³, Flávio S. Damos^{1,3}

¹ Departamento de Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, Diamantina - MG – Brasil; ² Departamento de Farmácia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, Diamantina - MG - Brasil;

³ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica - UNICAMP, Campinas -SP – Brasil;

⁴ Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP, Ouro Preto - MG - Brasil denioemanuel@yahoo.com.br

RESUMO: Este trabalho apresenta a otimização do preparo bem como a caracterização da formação de monocamadas auto-organizadas (SAM) do ácido mercaptoundecanoico (AMU) sobre a superfície de eletrodos de ouro. Foram feitos também estudos da imobilização de antígenos de *Leishmania chagasi* (agente etiológico da leishmaniose visceral) sobre a monocamada do tiol. O eletrodo de ouro foi modificado empregando diferentes tempos de adsorção bem como empregando várias concentrações do AMU. A caracterização da SAM foi feita através das técnicas de voltametria cíclica e redução dessortiva. Após formação em disco de ouro, a SAM foi ativada através de uma mistura contendo N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS). Posteriormente, foi realizada através da técnica de SPR a imobilização de diferentes concentrações dos antígenos.

Palavras-chave: SPR, monocamadas auto-organizadas, *Leishmania chagasi*.

INTRODUÇÃO

Sensores químicos são dispositivos que transformam uma informação química, em um sinal analítico útil. Uma subclasse de sensores químicos são os biossensores, os quais combinam a sensibilidade, como indicado pelo baixo limite de detecção, com transdutores de alta especificidade para reconhecimento de processos biológicos. Classicamente existem diferentes classes de biossensores, sendo o imunossensor uma das classes, a qual explora a capacidade de um anticorpo em reconhecer o seu antígeno^[1], podendo a superfície sensora ser construída através da imobilização do antígeno ou do anticorpo.

A metodologia de imobilização de biomoléculas é essencial uma vez que a espécie a ser imobilizada deve manter suas propriedades de reconhecimento. Assim, o emprego de monocamadas auto-organizadas (SAM, do inglês Self-Assembled Monolayer) como fase inicial para construção de biossensores tem proporcionado maior sensibilidade e estabilidade a esses sistemas preservando as propriedades das moléculas imobilizadas. Este tipo de modificação emprega camadas monomoleculares que exibem uma alta organização e que são formadas espontaneamente como consequência da imersão de uma superfície sólida em solução constituída de moléculas anfóteras. Nos últimos anos a formação das SAMs através da adsorção irreversível de alcanos funcionalizados sobre superfícies metálicas cresceu muito. Apesar de uma grande variedade de alcanos funcionalizados e de superfícies metálicas terem sido examinadas, o grupo mais empregado e estudado é, indubitavelmente, de tióis sobre superfícies de ouro.

A ativação de grupos funcionais terminais da SAM é um procedimento muito utilizado para imobilização covalente de proteínas sobre a superfície sensora. Um exemplo comum é a utilização de uma mistura contendo um agente de acoplamento, como o N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) com um auxiliar como a N-hidroxisuccinimida (NHS)^[2] para gerar um éster NHS susceptível ao ataque de grupos nucleofílicos presentes nas proteínas.

Recentemente, imunossensores baseados na técnica de ressonância de plasmon de superfície (SPR, do inglês surface plasmon resonance) foram desenvolvidos para quantificação da interação específica entre antígenos e anticorpos na superfície sensora. A técnica de SPR apresenta resposta diretamente relacionada com o índice de refração no meio, tornando possível a detecção de analitos em meios biológicos complexos com alta especificidade e seletividade, permitindo análises em tempo real, além do mais, a presença de analitos pode ser determinada diretamente sem utilização de moléculas marcadoras.

Devido a essa grande capacidade para avaliação de processos em interfaces e superfícies, a construção de biossensores através da técnica SPR tem se tornado altamente atraente clinicamente, pois, este pode consistir no primeiro passo para a criação de uma nova metodologia para diagnósticos clínicos.

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado. No Brasil, o agente etiológico é a

Leishmania chagasi [3]. No ambiente doméstico, o cão é considerado um importante hospedeiro e fonte de infecção para os vetores.

Neste contexto, o presente trabalho apresenta a otimização do preparo bem como caracterização da etapa inicial de formação de SAM do ácido mercaptoundecanóico (AMU) sobre a superfície de eletrodos de ouro, bem como a etapa inicial de construção de um imunossensor através da imobilização de antígenos solúveis de *L. chagasi* sobre discos de ouro, incluindo os estudos cinéticos e termodinâmicos relacionados a diferentes concentrações dos antígenos imobilizados.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As medidas voltamétricas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato AUTOLAB PGSTAT 128N. Para essas medidas foram utilizados os eletrodos de Au (0,071 cm²), de Ag/AgCl (NaCl 3,0 mol.L⁻¹) e de Pt, como eletrodos de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente. As medidas ópticas do ângulo de SPR foram obtidas através de um AUTOLAB SPRINGLE, no qual a parte óptica do sistema é composta de um prisma e de um disco de vidro recoberto com um fino filme de ouro. Como fonte de radiação foi empregado um laser de He-Ne (com emissão em 670 nm) e a intensidade da luz refletida foi medida através de um detector de fotodiodo. A configuração utilizada é baseada na reflexão interna total atenuada (configuração de Kretschman). Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Os antígenos solúveis de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* da cepa BH 46 foram cedidos pelo laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Inicialmente, foram feitas modificações do eletrodo de ouro empregando diferentes tempos de adsorção bem como empregando várias concentrações do AMU. A caracterização foi feita através das técnicas de voltametria cíclica e redução dessortiva. Após otimização da preparação e caracterização da monocamada através das técnicas voltamétricas, o disco de ouro foi imerso em uma solução contendo 0.5 mM MUA durante 24 horas. Após formação da SAM, a ativação de sua superfície foi feita utilizando uma mistura contendo 100 mM EDC e 150 mM NHS durante 20 minutos. Posteriormente, foram injetados os antígenos de *L. chagasi* diluídos em tampão HBS-EP sobre a superfície, durante aproximadamente 30 minutos. Após cada uma das etapas anteriores, a superfície sensora foi lavada tampão HBS-EP com a finalidade de remover espécies fracamente adsorvidas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 1 ilustra o comportamento eletroquímico observado para a interação entre as sondas redox hexacianoferrato de potássio (Fig. (A)) obtidas em diferentes tempos de adsorção do AMU bem como os respectivos voltamogramas lineares referentes à redução dessortiva para os mesmos tempos de interação entre a sonda e o material eletródico (Fig. (B)).

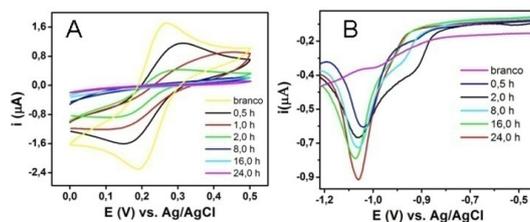


Figura 1. (A) Voltamogramas cíclicos para eletrodo de ouro modificado com AMU obtidos em ferricianeto e KCl após vários tempos de modificação. **(B)** Reduções dessortivas para eletrodo de ouro modificado com AMU obtidas após vários tempos de modificação através da técnica de voltametria de pulso diferencial em KOH. O Branco foi obtido em eletrodo de Au limpo.

Em tempos de interação superiores a 24 horas não foram verificadas variações significativas na corrente de redução dessortiva para o AMU. Por outro lado, a Fig. 1 (A) deixa evidente que a partir de tempos de interação superiores a 8 horas a SAM de AMU apresenta excelente supressão dos processos redox da sonda eletroquímica empregada mesmo com a cobertura parcial da superfície eletródica. Tal resultado deve estar associado com a natureza aniônica da SAM de AMU bem como do hexacianoferrato. Tais resultados indicam que o processo de adsorção das SAM investigada ocorre de forma rápida de forma a alcançar uma cobertura de superfície elevada seguindo-se por uma etapa lenta de rearranjo molecular conforme proposto a seguir:

1 etapa
2 etapa

Au+Ads □ Au-Ads
Au-Ads □ Au-Ads*

Onde Au representa o sítio de adsorção, Ads é o tiol, Au-Ads representa a monocamada desorganizada e Au-Ads* representa a SAM no seu estado final organizado. A partir do modelo proposto a seguinte equação de ajuste foi desenvolvida:

$$\Theta = A_1 (1 - \exp(-K_{\text{obs},1} t)) + A_2 (1 - \exp(-k_{\text{obs},2}))$$

Onde A_1 e A_2 são:

$$A_1 = -K_a C (K_t - K_{\text{obs},1}) / (K_{\text{obs},1} - K_{\text{obs},2}) K_{\text{obs},1}$$

$$A_2 = -K_a C (K_t - K_{\text{obs},2}) / (K_{\text{obs},1} - K_{\text{obs},2}) K_{\text{obs},2}$$

A partir do ajuste não-linear da equação representante do modelo aos dados de redução desortiva foi obtido os seguinte valor de constante de associação, $k_a = 2,08 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, que está em excelente concordância a literatura [4].

Por fim, como propósito de investigar a capacidade da SAM de AMU referente à imobilização do antígeno *L. Chagasi* bem como os processos de associação e dissociação do mesmo foi empregada a ressonância de plasmon de superfície (Figura 2). Conforme pode ser observado, a técnica de SPR é extremamente sensível ao processo de adsorção bem como ao processo de desorção do antígeno após lavagem do excesso de superfície com tampão HBS-EP (Figura 2(A)). Na Figura 2(B), por sua vez, são apresentados os sensorgramas para diferentes concentrações de antígeno e, pode ser observado que o aumento na concentração do antígeno é acompanhada pelo aumento do ângulo de plasmon de superfície como resultado do aumento do índice de refração local na superfície do disco sensor devido a presença de moléculas na superfície. Tal resultado é indicativo da grande eficiência da SAM confeccionada em imobilizar o antígeno da *L. Chagasi* uma vez que não foram observadas variações de ângulo de SPR para a proteína na ausência da SAM.

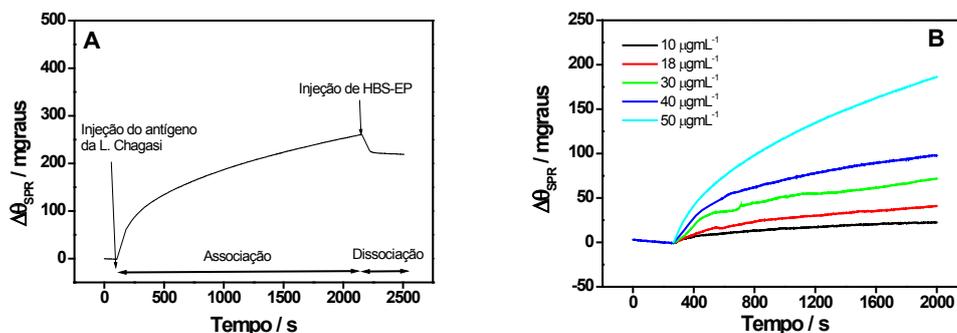


Figura 2. (A) Sensorgrama referente à associação e dissociação do antígeno *L. Chagasi* sobre SAM de ácido mercaptoundecanóico previamente ativada em EDC/NHS ($[L. Chagasi]=50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e (B) Sensorgramas referentes à associação do antígeno *L. Chagasi* a partir de soluções de diferentes concentrações: $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; $18 \mu\text{g mL}^{-1}$; $30 \mu\text{g mL}^{-1}$; $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

CONCLUSÕES

Do exposto, fica evidente que a investigação prévia de parâmetros como tempo de adsorção e concentração de AMU é de fundamental importância como para a confecção de SAMs, proporcionando maior sensibilidade e estabilidade para a fase inicial de construção do imunossensor. Verificou-se também que a técnica de SPR mostrou ser sensível às variações das concentrações de antígenos imobilizados, sendo uma perspectiva muito grande para estudos clínicos com as amostras biológicas em estudo.

AGRADECIMENTOS: FAPEMIG, CNPQ e INCT-Bioanalítica.

REFERÊNCIAS

- [1] Jain, K.K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clin. Chim. Acta* (358): 37–54, 2005.
- [2] Liu J, Row MNP, Gooding JJ; *Chem Phys* (324): 226-235, 2006.
- [3] Gontijo, C. M. F.; Melo, M. N.; *Rev. Bras. Epidemiol.* (7), 338, 2004.
- [4] Damos, F. S. Luz, . C. S. e Kubota, L. T., *Langmuir*, 21, 602-609. 2005.

ANÁLISE VOLTAMÉTRICA DE CAPTOPRIL UTILIZANDO ELETRODO DE PLATINA MODIFICADO COM HEXACIANO FERRATO II DE FERRO III

Izabel C. Eleotério*, Marco A. Balbino, Matheus M. T. de Menezes, Marcelo F. de Oliveira

Departamento de Química, Laboratório de Métodos Analíticos e Química Forense, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-901, Ribeirão Preto, Brasil. izabeleleoterio@yahoo.com.br

RESUMO: Fármacos encontrados no meio ambiente mesmo em baixas concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} podem causar problemas ambientais e de saúde pública, por estas substâncias serem biologicamente ativas. Por este motivo, a busca de métodos instrumentais para determinação destes têm sido grande alvo dos pesquisadores. Neste trabalho foi escolhido o fármaco captopril que é considerado um dos anti-hipertensivos mais utilizados no tratamento de insuficiência cardíaca. O objetivo do trabalho foi realizar a análise voltamétrica de captopril, empregando eletrodo de platina modificado com filme de hexacianoferrato II de ferro III (azul da Prússia) associado a modalidade voltametria cíclica. Os resultados apontaram um coeficiente de correlação linear (r) de 0,998 com desvio padrão (DP) de 0,007 μA e limites de detecção (baseado na relação 3 DP/m) em $0,35 \mu\text{mol L}^{-1}$ e quantificação (baseado na relação 10 DP/m) em $1,17 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Palavras-chave: captopril, eletrodo quimicamente modificado, azul da Prússia, voltametria cíclica.

INTRODUÇÃO

Recentemente, estudos mostram que agentes anti-hipertensivos, antidepressivos, antibióticos, anti-inflamatórios e hormônios têm sido encontrados em níveis alarmantes nos rios e lagos que abastecem grandes cidades. Sendo um sinal da complexidade de substâncias jogadas diariamente em esgotos domésticos, utilizadas na medicina humana, estas substâncias são encontradas até em concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . Os problemas de contaminação são decorrentes destas substâncias, presentes nos despejos, serem biologicamente ativas, isto é, podendo provocar modificações no meio ambiente, mesmo em concentrações baixas de contaminantes [1] e tendo em vista os graves problemas de saúde pública, que podem ser causados pelo acúmulo desta substância em águas naturais. Por tais motivos, torna-se necessário uma atenção especial na sua determinação.

Dentre estes fármacos tem-se o captopril, um potente vasodilatador, que é um dos fármacos utilizados na terapia anti-hipertensiva e também no tratamento da insuficiência cardíaca, sendo o primeiro fármaco inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA). A figura 1 apresenta a estrutura química do captopril, é um pó cristalino, facilmente solúvel em água [2]. Vários métodos têm sido propostos para a determinação de captopril, incluindo a cromatografia líquida de alta eficiência ou com pré-derivatização pós-coluna, colorimetria, fluorometria, quimioluminescência, espectrometria e voltametria de pulso diferencial [3].

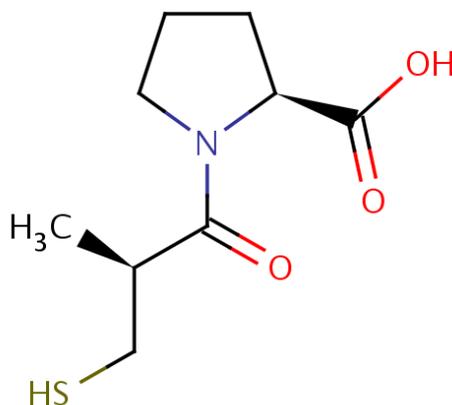


Figura 1: Estrutura química do captopril.

O objetivo do trabalho é a análise voltamétrica de captopril, empregando eletrodo de platina modificado com filme de hexacianoferrato II de ferro III (azul da Prússia) associado a modalidade voltametria cíclica. A literatura apresenta alguns trabalhos de determinação de substâncias orgânicas e inorgânicas utilizando filme de azul da prússia [4,5].

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste trabalho foi estudado o comportamento voltamétrico do fármaco captopril frente ao eletrodo de platina modificado com filme de hexacianoferrato II de ferro III (azul da Prússia – $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$). Para a realização dos experimentos foi utilizada uma solução estoque de captopril $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, de procedência Sigma Aldrich, em meio aquoso com $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (em pH 7,2) como eletrólito suporte, eletrodo de trabalho (eletrodo de platina 3 mm^2 de diâmetro da Metrohn), eletrodo auxiliar (fio de platina em forma de espiral), eletrodo de referência (Ag/AgCl) e célula eletroquímica de 5 mL . A Figura 2 apresenta o arranjo da célula eletroquímica. As medidas voltamétricas foram registradas em potenciostato/ galvanostato modelo $\mu\text{AUTOLAB III}$ (Eco chemie). O filme foi depositado em um eletrodo de platina, em uma solução contendo $0,01 \text{ mol/L}$ de FeCl_3 e $0,01 \text{ mol/L}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, através de voltametria cíclica por 15 ciclos sucessivos potenciais de $-0,4$ a $0,8 \text{ V}$ (vs. Ag / AgCl), utilizando uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . A estabilidade do filme eletrodepositado foi testado em solução $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, sendo aplicados 20 ciclos sucessivos, de $-0,4$ a $0,8 \text{ V}$ (vs. Ag / AgCl) e 100 mV s^{-1} . A análise de captopril em diferentes concentrações na célula eletroquímica, foram obtidas pelo método de adição padrão, os volumes adicionados foram entre 10 e $80 \mu\text{L}$, sendo estes correspondentes a faixa de concentração entre $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $138 \mu\text{mol L}^{-1}$ e conseqüentemente, esta é a faixa linear do sensor; e os voltamogramas cíclicos registrados no intervalo de potencial $-0,4$ a $0,6 \text{ V}$ (vs. Ag / AgCl) e velocidade de varredura em 100 mV s^{-1} .

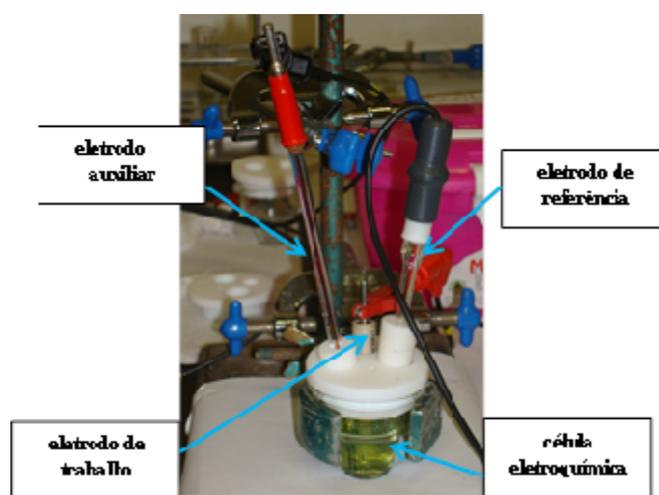


Figura 2: Arranjo da célula eletroquímica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 3A apresenta a formação do filme após sucessivos ciclos com o potencial aplicado $-0,4$ a $+0,8 \text{ V}$. Considerando-se que a espécie eletrodepositada é o azul da Prússia, $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$, o valor de potencial empregado tem por objetivo reduzir os íons $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ desde que o equilíbrio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + e^-$

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ apresenta $E^\circ = +0,36 \text{ V}$. Desta forma, na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (reduzido eletroquimicamente) e íons Fe^{3+} é formado o filme de azul da Prússia na superfície do eletrodo [4]. No estudo de estabilidade do em meio de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a 100 mV s^{-1} , o filme de azul da Prússia permaneceu estável durante os 20 ciclos. O eletrodo de platina modificado com FeHCFE foi aplicado para a determinação voltamétrica de captopril. A Figura 3B apresenta a influência da concentração de captopril na resposta voltamétrica do filme de FeHCFE: adições sucessivas de $10 \mu\text{L}$ de solução padrão de captopril.

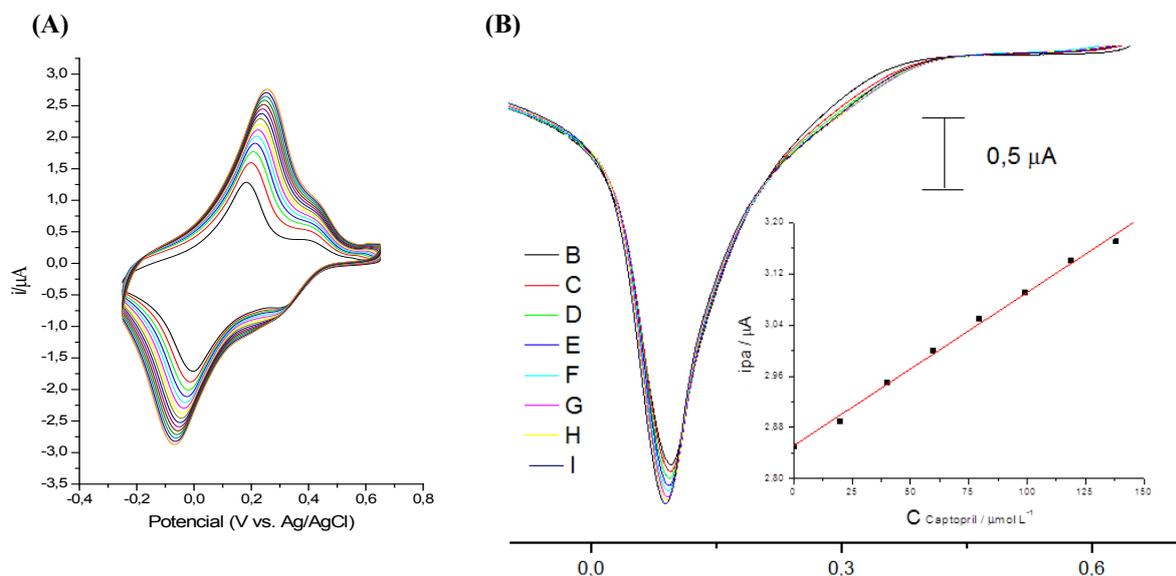


Figura 3: (A) Formação do filme de Azul da Prússia (FeHCFe) em um eletrodo de platina: 3 mm²; 0,100 mol L⁻¹ de K₃Fe(CN)₆ e FeCl₃; 15 ciclos a 100 mV s⁻¹. Variando o potencial de -0,4 a 0,8 V. (B) influência da concentração de captopril na resposta voltamétrica do filme de FeHCFe: B (branco), C (20 μmol L⁻¹), D (40 μmol L⁻¹), E (60 μmol L⁻¹), F (79 μmol L⁻¹), G (99 μmol L⁻¹), H (119 μmol L⁻¹), I (138 μmol L⁻¹); velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹ e intervalo de potencial -0,4 a 0,6 V, em meio de KCl 0,1 mol L⁻¹. (C) Curva analítica da corrente de pico (μA) vs. Concentração (μmol L⁻¹) do padrão captopril.

Na análise da influência da concentração do analito em função da corrente (μA) com adições sucessivas do padrão captopril 0,01 mol L⁻¹, foi adicionado inicialmente cerca de 10 μL e finalizou-se a adição com volume de 100 μL. De acordo com o voltamograma apresentado na figura 3 (B), foi observado proporcionalmente aumento de corrente de pico a medida que a concentração de captopril foi elevada. O coeficiente de correlação linear (r) obtido foi de 0,998 com desvio padrão (DP) de 0,007 μA. Sua correspondente equação foi: $i_{pc} = 2,85 + 0,06 \mu A$, sendo o limite de detecção (calculado de acordo com a relação 3 DP/m, onde m é a sensibilidade amperométrica da curva) em 0,35 μmol L⁻¹ e o limite de quantificação (baseado na relação 10 DP/m) em 1,17 μmol L⁻¹.

CONCLUSÕES

Os resultados mostram que FeHCFe como modificador químico para o eletrodo de platina permitiu o desenvolvimento de um método voltamétrico para a determinação de captopril. O eletrodo quimicamente modificado pode ser utilizado como uma alternativa na análise de captopril.

AGRADECIMENTOS: CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

REFERÊNCIAS

- [1] HALLING-SØRENSEN, B.; NORS NIELSEN, S.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F.; HOLTEN LÜTZHØFT, H. C.; JØRGENSEN, S. E. **Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review.** *Chemosphere*. Vol. 36, n. 2, p. 357-393, 1998.
- [2] BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica.** Tradução: Carlos Henrique de Araújo Cosendey et al. 11 ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. p. 983 – 1038.
- [3] SIMÕES, S. S. **Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIR e calibração multivariada,** Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2008.
- [4] DE MATTOS, I. L.; GORTON, E. **Filmes de metal-hexacianoferrato: uma ferramenta em química analítica.** *Química Nova*, Vol. 24, n. 2, p. 200-205, 2001.
- [5] OLIVEIRA, M. F.; STRADIOTTO, N. R.; MORTIMER, R. J. **Voltamperometric determination of persulfate in modified electrodes with Iron (II) Hexacianoferrate.** *Microchemical Journal*, v. 64, n. 2, p. 155-159, 2000.

ELETRODOS MODIFICADOS COM COMPÓSITO ARGILA/NÍQUEL COLOIDAL COMO SENSOR DE URÉIA

Cícero V. Nunes Junior (PG), Marins Danczuk (PG), Hécio Marcos Vileski (PG)
, Fauze J. Anaissi (PQ)*

¹ Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, Cep 85040-080, Guarapuava, Pr.²
Laboratório de Materiais e Compostos Inorgânicos – LabMat, Departamento de Química. *fauze.anaissi@pesquisador.cnpq.br*

RESUMO: A preparação e caracterização de géis inorgânicos têm por finalidade a sua interação com argilas montmorilonita para posterior geração de novos materiais híbridos coloidais que apresentem condutividade eletrônica e iônica, promovidas pelos géis, que aderem fisicamente em superfícies metálicas formando filmes lamelares. Desta maneira, pode-se projetar interfaces eletroquímicas e gerar nanocompósitos com aplicações em reconhecimento molecular, sensores e eletrocatalise.

Palavras-chave: Sol-Gel, Hidróxido de Níquel, Sensor de ureia.

INTRODUÇÃO

Materiais mistos são sistemas formados por dois ou mais constituintes que podem ser moléculas, oligômeros, agregados e partículas¹. Em razão da interação entre as fases de seus componentes esses materiais exibem propriedades mecânicas, ópticas, térmica e físico-química notavelmente melhor quando comparados com os compostos de partida isolados².

Entre os potenciais precursores de materiais mistos estão as argilas³, que possuem uma química de intercalação bastante rica e os géis inorgânicos de metais de transição, que apresentam propriedades de condução ou semicondução e podem ser facilmente preparados pelo método sol-gel^{4,5}.

Por outro lado, eletrodo de níquel modificado com um filme de hidróxido de níquel possui diversas propriedades, tais como: alto poder de densidade, ótima capacidade cíclica e alta energia específica, que lhe proporciona grande potencial para várias aplicações, por exemplo, na eletrocatalise da hidrólise da ureia e como sensores de gases^{5,6}. Uma linha de pesquisa envolvendo sensores eletroquímicos pode atrair a atenção das áreas tecnológicas e comerciais, demonstrando a importância deste ramo da ciência para a melhoria das condições de vida em nossa sociedade.

Os sensores eletroquímicos têm apresentado grande desenvolvimento nos últimos anos, devido à crescente necessidade de testes analíticos simples, rápidos e baratos para a determinação de importantes compostos químicos e biológicos em concentrações muito baixas. Os principais sensores eletroquímicos podem ser classificados como: potenciométricos, amperométricos, voltamétricos e condutométricos⁷.

Neste trabalho, após a compreensão do comportamento eletroquímico do material misto argila/níquel coloidal na presença de diferentes eletrólitos, apresentamos resultados sobre o comportamento eletroquímico de eletrodo modificado como sensor eletroquímico na presença de ureia.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O gel de Ni(OH)₂ foi preparado utilizando como precursores acetato de níquel, glicerina, hidróxido de potássio, álcool etílico. A argila bentonita foi utilizada como uma suspensão aquosa (2%). Misturando a argila e o gel de hidróxido de níquel formou-se o material misto denominado BNi, resultante da interação entre o gel de Ni(OH)₂ e a suspensão de argila bentonita.

O comportamento eletroquímico do material misto argila/hidróxido de níquel foi estudado utilizando a técnica de voltametria cíclica (VC). Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em um potenciostato da BAS, modelo Epsilon, acoplado a uma cela eletroquímica da BAS, modelo Cell Stand C3, no arranjo convencional de três eletrodos. O eletrodo de trabalho foi um disco de platina (diâmetro de 1,6 mm) modificada com o material misto, um eletrodo de referência Ag/AgCl e um fio de platina como eletrodo auxiliar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Caracterização Eletroquímica - Voltametria Cíclica (VC)

O estudo eletroquímico foi realizado através da técnica de voltametria cíclica em soluções aquosas de NaOH e na presença de ureia. O BNi apresenta estabilidade em solução aquosa, mantendo suas propriedades físicas e eletroquímicas, é aderente em superfícies vítreas e metálicas. Assim foi possível realizar um estudo da caracterização eletroquímica com o eletrodo modificado utilizando a voltametria cíclica. O eletrodo de platina foi modificado pela

deposição direta de alíquotas da suspensão aquosa do material BNi seguida da evaporação do solvente, obtendo-se assim um filme fino do material na superfície do eletrodo. Utilizou-se a técnica de voltametria cíclica por ser uma das técnicas mais relevantes do ponto de vista de aplicação, possibilita conhecer o processo redox em função da solução de eletrólito suporte, permitindo direcionar o foco do trabalho para sensores amperométricos ou potenciométricos.

2. Testes como Sensor Eletroquímico

Analisando o comportamento eletroquímico da **Fig. 1**, ao qual mostra a presença da solução aquosa de hidróxido de sódio nota-se que no mesmo ocorre os processos redox do níquel(II)/níquel(III). A oxidação ocorre formando o oxi-hidróxido de níquel (NiOOH) saindo o H^+ , continuando a varredura ocorre a redução, cujo forma-se o hidróxido de níquel $Ni(OH)_2$ pela entrada do H^+ , independente da concentração.

Após a compreensão do comportamento eletroquímico do BNi frente a concentrações diferentes para eletrólitos diferentes, foi realizado teste como sensor eletroquímico na presença de ureia adicionada gradativamente. A partir de uma solução 0,5 mol/L, a ureia foi adicionada ao eletrólito suporte (NaOH - 0,5M), em frações de 10 em 10 μ L. Dois estudos de caso foram realizados

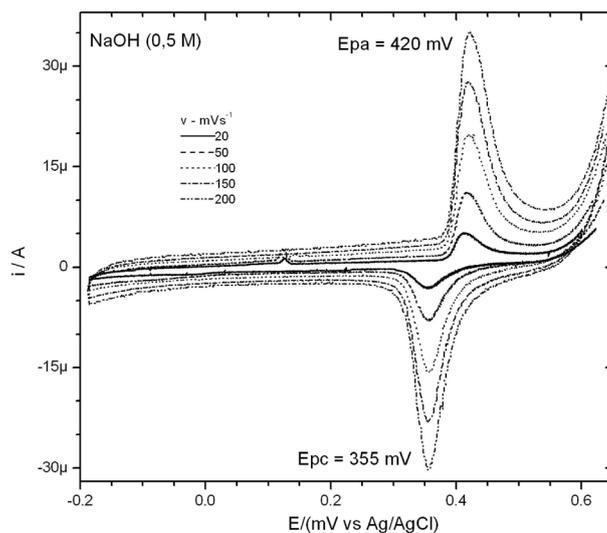


Figura 1: VC do eletrodo modificado com BNi em solução aquosa de NaOH (0,5M).

2.1 Caso 1.

Na **Fig. 2** são mostrados os VC para o eletrodo modificado com BNi na velocidade de varredura de 100 $mV.s^{-1}$ (linha cheia). Após o primeiro ciclo foi adicionado alíquotas da solução de ureia de maneira a registrar o seu efeito sobre o processo redox do íon níquel. Verificou-se que ocorre um aumento da corrente de pico com um pequeno deslocamento do potencial de pico para a região mais anódica, indício de um comportamento misto, ou seja, sensor amperométrico-potenciométrico.

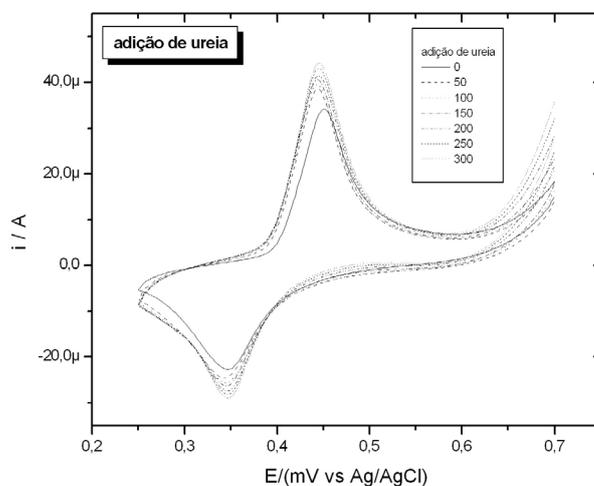


Figura 2: VC para o eletrodo modificado com o material BNi na presença de NaOH 0,5 M adicionando ureia 0,5M.

2.2 Caso 2.

A fim de impor alterações estruturais ao filme de BNi, realizou-se 30 ciclagens antes de adicionar a ureia, como mostrado na **Fig. 3A**. Como se pode perceber, num certo ponto tanto pico anódico quanto catódico se estabiliza não ocorrendo mais aumento da corrente, assim o filme está estabilizado no que diz respeito à condução iônica e eletrônica.

Após o tratamento eletroquímico do filme adicionou-se gradativamente a solução de ureia, tal qual como no caso 1. Verifica-se que nos VCs da **Fig. 4B**, que a adição de uréia promove o aumento de corrente de pico, porém ocorre um deslocamento de potencial em sentido catódico, indicando que a utilização de eletrodo modificado com BNi deve ser previamente condicionado para estabilizar o processo redox dos sítios ativos do íon níquel, antes de qualquer tentativa de aplicação eletroquímica.

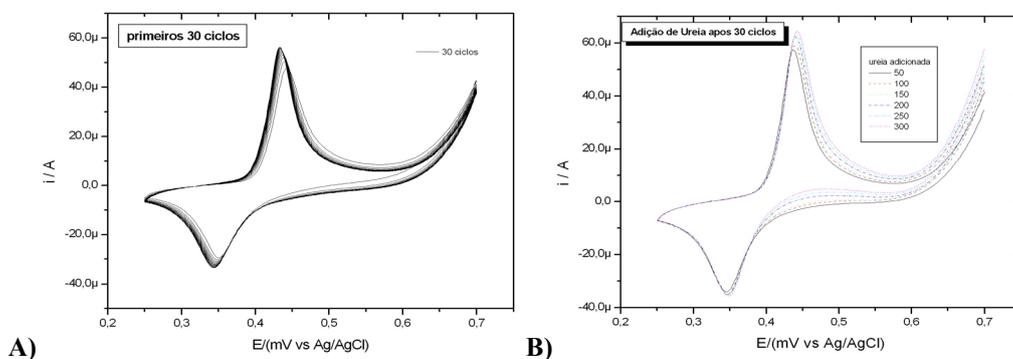


Figura 3: VC do eletrodo com BNi na presença de: A) NaOH (0,5 M), 30 ciclos na $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, e B) após 30 ciclos com adição de ureia em meio de NaOH (0,5M).

CONCLUSÕES

A interação entre a argila bentonita e o gel de hidróxido de níquel gera um novo material que denominamos de BNi - óxido misto de bentonita/hidróxido de níquel(II). Um material simples de ser manuseado e consideravelmente barato e com diversas aplicações em várias áreas, como por exemplo: catálise e eletrocatalise, dispositivos eletroquímicos e eletrocromáticos, sensores amperométricos e potenciométricos, etc.

Seu comportamento eletroquímico é interessante, tendo em vista que em meio alcalino o processo redox dos íons $\text{Ni}^{2+/3+}$ é observado e é suscetível à natureza do cátion em solução. Como sensor a presença de ureia intensificou a corrente de pico relacionado à presença do níquel. Sendo assim podendo ser utilizado como sensor eletroquímico do tipo amperométrico.

AGRADECIMENTOS: CAPES, CNPq, Fundação Araucária, Unicentro, Finep.

REFERÊNCIAS

- [1] ROCHA, M.A.; ANAISSI, F.J., **Resumos do XIII EAIC**, Londrina, Paraná, Brasil, 2004.
- [2] UNATES, M.E.; FOLQUER, M.E.; VILCHE, J.R; ARVÍA, A.J. **J. Electrochem. Soc.** 139, 2697, 1992.
- [3] LI, B.; WANG, X.Y.; YUAN, H.T; ZHANG, Y.S.; SONG, D.Y.; ZHOU, Z.X. **J. App. Electrochem** 1999, 29, 855.
- [4] LEV, O.; BHARATHI, S.; GLEZER, V.; MODESTOV, A.; GUN, J.; RABINOVICH, L. e SAMPATH, S., **Chem. Mater.** 1997, 9, 2354.
- [5] ANAISSI, F.J.; ROCHA, M.A.; VILLALBA, J.C.; PEREIRA, C.D., DA SILVA, M.C.V.M. e TOMA, H.E., **Resumos da 26a RASBQ**, Poços de Caldas, Brasil, 2003.
- [6] FREITAS, M.B.J.G., **Journal of Power Sources**, 93, 163-173, 2001.
- [7] ALFAYA, A. S.; KUBOTA, L. T. "A Utilização de Materiais Obtidos Pelo Processo Sol-Gel na Construção de Biossensores". **Química Nova**, São Paulo, v.25, no 5, p. 835-841, Set/Out. 2002.

ELETRODOS MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS

Paulo Roberto de Oliveira¹ (PG), Marcela M. Oliveira² (PQ), Aldo J. G. Zarbin³ (PQ), Luiz H. Marcolino Jr.¹ (PQ), Marcio F. Bergamini¹ (PQ)

¹ Laboratório de Sensores Eletroquímicos–Departamento de Química – UFPR - Curitiba – PR

² Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Curitiba - PR,

³Laboratório de Sensores Eletroquímicos–Departamento de Química – UFPR - Curitiba – PR
pauloroberto_sor@hotmail.com

RESUMO: O desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados tem-se concentrado na obtenção de dispositivos com desempenho analítico cada vez mais eficiente, umas das formas de atingir esse objetivo vem sendo a utilização de nanopartículas metálicas. As Nanopartículas de prata (NP-Ag) empregadas nesse trabalho possuem um tamanho médio de 5 nm e foram obtidas pelo método bifásico. A modificação dos eletrodos foi realizada pela adição direta de uma alíquota da suspensão de NP-Ag seguida da evaporação do solvente sobre a superfície eletrodica. O comportamento voltamétrico foi avaliado inicialmente em solução alcalina e comparado com o perfil obtido para um eletrodo de prata bulk. Posteriormente, foi investigada a formação do hexacianoferrato de prata (NP-AgHCF) formado sobre as NP-Ag empregando um procedimento galvanostático e avaliado seu comportamento voltamétrico em solução contendo diferentes cátions metálicos e isoniazida (INZ). Foi verificada a influência do cátion no perfil voltamétrico e também potencialidade analítica frente a INZ. O eletrodo modificado foi empregado como detector amperométrico, sendo obtida uma sensibilidade significativamente maior quando comparada ao eletrodo não modificado.

Palavras-chave: Eletrodo impresso, Nanopartículas de prata, Hexacianoferrato de prata, isoniazida.

INTRODUÇÃO

Recentemente, o desenvolvimento de nanomateriais tem possibilitado a aplicação de partículas nanométricas em diversas áreas da química analítica devido a suas características físico-químicas especiais. Para a área de eletroanalítica, o uso de nanopartículas na preparação de eletrodos quimicamente modificados (EQM) apresenta vantagens incomuns, tais como eletrocatalise, melhora no transporte de massa devido à contribuição da difusão radial e à diminuição da razão sinal/ruído, atribuída à magnitude das correntes obtidas e a sua baixa resistência interna, além de uma alta área superficial efetiva¹. Desta forma, o estudo de diversos nanomateriais, como agentes modificadores na construção de EQM vêm promovendo o surgimento de sensores eletroquímicos com desempenho analítico significativo. Outro aspecto importante verificado na construção de sensores é a utilização de eletrodos base cada vez mais simples e baratos. Dentro desse contexto cabe ressaltar o uso de eletrodos impressos, os quais visam oferecer ao operador não só instrumentos mais econômicos, com respostas sensíveis e seletivas, mas também facilidade de uso e simplicidade na medida da resposta².

Dentre as mais diversas possibilidades de modificação de eletrodos, uma importante espécie empregada na preparação de EQM são os filmes de hexacianoferratos metálicos (MHCFs). Estes, em sua maioria, são insolúveis e constituem uma classe interessante de materiais inorgânicos polinucleares bem definidos que, se assemelham tanto a polímeros condutores π -conjugados, zeólitas, e polímeros condutores redox. EQMs preparados com HCF são aplicados na construção sensores voltamétricos ou amperométricos para a determinação de diversos analitos. O azul da Prússia, mais precisamente Hexacianoferrato de Ferro ($\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$; FeHCF) é o representante dessa classe mais estudado e conhecido, possui o átomo de ferro (III) coordenado ao nitrogênio e ferro átomo (II) coordenados a átomos de carbono. As estruturas verificadas para análogos do azul da Prússia são muito semelhantes, apresentando em sua estrutura os íons $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^- / [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^+$ ligados ao respectivo metal pelo N ($\text{Fe}^{2+}\text{-CN-M}^{\text{x}+}$). Além da estrutura semelhante, os análogos do azul da Prússia apresentam também características eletroquímicas semelhantes³. A utilização de nanopartículas de MsHCF para a construção de sensores eletroquímicos tem sido relatado nos últimos anos, porém, a maior parte dos trabalhos utiliza o complexo sintetizado quimicamente e posteriormente imobilizado na superfície do eletrodo.

No presente trabalho é relatada a construção e caracterização voltamétrica de eletrodos modificados com nanopartículas de prata (NP-Ag) quimicamente sintetizadas, a preparação de AgHCF sobre as superfícies das NP-Ag, e a potencialidade analítica do dispositivo construído frente a determinação de isoniazida (INZ), um agente antituberculástico.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Nanopartículas de Prata (NP-Ag): A obtenção das NP-Ag utilizadas neste projeto foi feita através da rota química utilizando-se um sistema bifásico passivadas por dodecanotiol, método descrito por Oliveira e col⁴. Após a obtenção das nanopartículas, as mesmas foram caracterizadas de forma a observar principalmente seu tamanho e suas propriedades eletroquímicas.

Caracterização morfológica: Difração de Raio X utilizando um aparelho Shimadzu XRD-6000, com radiação CuK α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), operando com voltagem de 40 KV e corrente de 30 mA.

Caracterização Voltamétrica: As NP-Ag foram empregadas como material modificador em diferentes substratos imobilizadas pela adição de uma alíquota da suspensão seguida da evaporação do solvente (*drop casting*) em diferentes eletrodos: Eletrodo impresso (EI) a base de carbono, vidro modificado com óxido de estanho dopado com índio (ITO) e eletrodo de carbono vítreo (ECV).

As medidas amperométricas e voltamétricas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato μ AUTOLAB Type III, produzido pela EcoChemie, acoplado a um microcomputador e gerenciado pelo programa GPES 4.9.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento voltamétrico do eletrodo de prata (Bulk) é bem estabelecido em solução alcalina, assim essa condição experimental foi inicialmente adotada para a caracterização eletroquímica das NP-Ag. Em adição, todas as NP-Ag empregadas apresentam tamanho estimado (difração de Raio-X) de 5 nm, os eletrodos de carbono vítreo modificados com 10 μ L da suspensão de NP-Ag foram submetidos a varreduras cíclicas de potencial em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e o comportamento voltamétrico obtido foi comparado com um eletrodo de prata *bulk*. Os perfis de resposta observados para ambos os eletrodos (ECV/NP-Ag e eletrodo de prata *bulk*) foram condizentes com os relatados na literatura. O interesse da presente proposta é estudar a utilização de eletrodos impressos, assim, embora haja coerência dos processos observados entre o eletrodo contendo NP-Ag e o eletrodo *bulk*, a utilização de uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ (pH 13) é agressiva as tintas utilizadas na preparação dos eletrodos impressos, o que torna inviável a utilização desse meio. Nesse sentido, como alternativa a este empecilho, visando o uso dos EI como substratos de modificação, pois consistem em dispositivos com grande versatilidade e baixo custo, propôs-se a formação de AgHCF utilizando as NP-Ag como matriz para o depósito, dessa forma a utilização dos filmes de AgHCF permite trabalhar-se em condições mais brandas.

A preparação do AgHCF sobre a superfície dos eletrodos foi realizada empregado um procedimento galvanostático relatado na literatura para a construção de Ag-HCF. O método galvanostático utilizado consistiu na aplicação de uma corrente anódica de 2,5 μ A por 60 s ao eletrodo contendo nanopartículas de prata em solução contendo ferricianeto de potássio, formando assim, na superfície eletródica o hexacianoferrato de prata (AgHCF). Voltamogramas cíclicos foram obtidos em solução de eletrólito suporte após a formação do Ag-HCF e são apresentados na Figura 1.

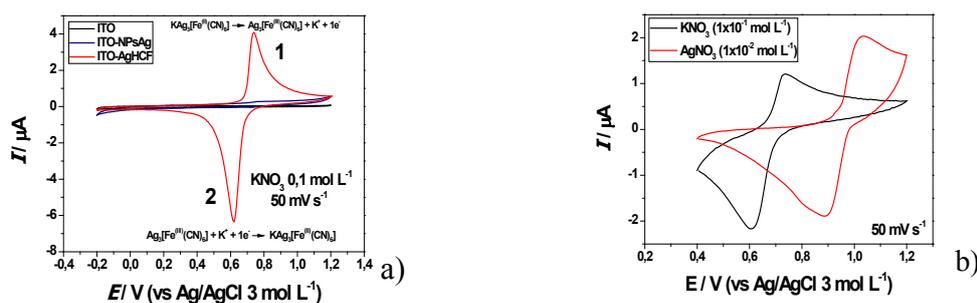


Figura 1: a) Voltamogramas cíclicos dos eletrodos com (—) e sem (— e —) AgHCF na superfície eletródica do Substrato ITO, utilizando KNO₃ 0,1 mol L⁻¹; b) Substrato EI, empregando solução de KNO₃ 0,1 mol L⁻¹ (—) e AgNO₃ 0,01 mol L⁻¹ (—).

Os voltamogramas apresentados na Figura 1 mostram que apenas os eletrodos submetidos à aplicação de uma corrente fixa em meio de K₃[Fe(CN)₆] e contendo as NP-Ag na superfície tanto no ITO (a) quanto nos eletrodos impressos (não mostrado), sendo o processo observado corresponde aos processos de oxi-redução do AgHCF. É observado nos voltamogramas a formação do AgHCF onde é possível verificar a presença do par de picos redox característicos do AgHCF, processo anódico em 0,73 V (1) e catódico em 0,62 V (2)⁵. Na literatura, relatos sugerem que o AgHCF pode ser representado por MAg₃[Fe(CN)₆], onde M é um íon de carga unitária, geralmente Ag⁺ ou K⁺ que participam dos processos de intercalação e saída da estrutura do Ag-HCF. Analisando-se os processos de oxidação e redução do Ag-HCF (Fig1b), é possível observar que há intercalação do íon K⁺ nos interstícios contidos na estrutura. Além dos íons potássio, outros cátions podem realizar este processo de intercalação nos interstícios da estrutura de

AgHCF, como por exemplo o Ag^+ . Quando um EQM é colocado em solução contendo íons Ag^+ , (Fig 1b) é observado claramente substituição de íons K^+ , o que reflete em uma mudança na resposta voltamétrica quando se compara os perfis voltamétricos do AgHCF na presença de íons K^+ e na presença de íons Ag^+ . O processo é deslocado para potenciais mais positivos possivelmente pela diferença de interação deste cátion com a as ligações da estrutura de AgHCF.

Após avaliar o processo de formação do AgHCF sobre a superfície do EI modificado por NP-Ag, verificou-se a potencialidade do eletrodo como sensor eletroquímico para a INZ. Voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 2A foram obtidos na ausência e na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de INZ para um EI não modificado e modificado EI-AgHCF. É possível observar um sinal de pequena intensidade para o EI não modificado referente a oxidação direta da INZ sobre a superfície eletródica. Quando comparado o perfil do eletrodo modificado na ausência e na presença de INZ, é possível verificar um aumento significativo na corrente anódica na presença de INZ, esses resultados sugerem que o EI modificado com AgHCF atua no sentido de promover a oxidação química da INZ, que por sua vez promove a reposição do HCF na forma reduzida que entra no ciclo catalítico e proporciona o aumento do sinal anódico.

O dispositivo proposto foi avaliado como um detector amperométrico para a quantificação de INZ empregando um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA). Diversos parâmetros referentes ao sistema foram investigados e otimizados: potencial aplicado ($E = +0,45 \text{ V vs. } C_{\text{impresso}}$), alça de amostragem (200 μL) e vazão 3,0 mL min^{-1} . Empregando as melhores condições foram obtidas duas curvas analíticas para o EI modificado e não modificado (Fig. 2B).

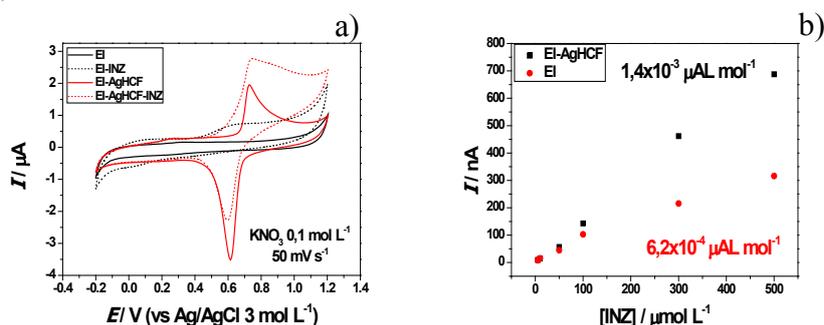


Figura 2: a) Voltamogramas cíclicos comparativos do EI e do EI-AgHCF na ausência e na presença de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de INZ; b) Comparação das sensibilidades obtidas para o EI e EI-AgHCF na determinação de INZ pela técnica em FIA.

Foi observada uma linearidade do aumento da corrente em função da concentração de INZ, uma maior sensibilidade é verificada para o EI modificado quando comparado ao EI não modificado.

CONCLUSÕES

As NP-Ag de aproximadamente 5 nm diâmetro médio apresentaram similaridade e coerência nos perfil voltamétrico comparando ao eletrodo de prata *bulk*. O processo de formação do AgHCF nanoestruturado apresenta boa estabilidade, reprodutibilidade e potencialidade analítica para aplicação como detector amperométrico para a determinação de INZ empregando um sistema FIA, apresentando uma maior sensibilidade em comparação ao eletrodo impresso sem modificação.

AGRADECIMENTOS: CAPES, CNPQ (Proc. 577536/2008-7), Fundação Araucária (219/2010, prot. 15687),

REFERÊNCIAS

- [1] Shahrokhian, S., Ghalkhani, M., Ghorbani, B. F., "Voltammetric studies of sumatriptan on the surface of pyrolytic graphiteelectro de modified with multi-walled carbon nanotubes decorated with silver nanoparticles", *Talanta*, 80, 31–38, 2009.
- [2] Compton, R. G., Wildgoose, G. G., Rees, N. V., Streeter, I., Baron, R. "Design, fabrication, characterisation and application of nanoelectrode arrays", *Chemical Physics Letters*, 459, 1, 2008.
- [3] Karyakin, A. A., "Prussian Blue and Its Analogues: Electrochemistry and Analytical Applications", *Electroanalysis*, 13, nº 10, 813-819, 2001.
- [4] Oliveira, M. M., Ugarte, D., Zauchet, D., Zarbin, A. J. G., "Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles", *J. Colloid Interf. Sci.*, 292, 429-435, 2005.
- [5] Narayanan, S. S., Jayasri, D., "Electrocatalytic oxidation and amperometric determination of BHA at graphite-wax composite electrode with silver hexacyanoferrate as electrocatalyst", *Sens. Actuat., B* 119, 135 - 142, 2006.

ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DE FILMES LbL CONTENDO POLIELETRÓLITOS INORGÂNICOS E GOMA NATURAL DO CAJUEIRO

Rolf de Campos Intema¹, Carla Eiras², Karen Wohnrath¹, Christiana A. Pessoa¹

¹Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Ponta Grossa - PR- Brasil.

²Universidade Federal do Piauí- UFPI, Campus Ministro Reis Velloso- Parnaíba- PI- Brasil.

RESUMO: Gomas naturais têm sido aplicadas na indústria de cosméticos e de alimentos, devido a sua biodegradabilidade e excelentes propriedades mecânicas. Neste estudo, tira-se vantagem do caráter de polieletrólito exibido pela goma do cajueiro (*Anacardium Occidentale*), extraída na região nordeste do Brasil, para produzir nanocompósitos eletroativos. Estes nanocompósitos foram fabricados na forma de filmes LbL combinando-se ftalocianina tetrasulfonada de níquel (NiTsPc) e a goma do cajueiro, em arquiteturas contendo tetracamadas, em conjunto com o polieletrólito SiPy⁺Cl⁻ (cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano) e DABLO2p (cloreto de 3-n-propil-1-azonia-4-azabicyclo[2.2.2] octano silsesquioxano). A influência da goma na arquitetura dos filmes além da sua habilidade como sensor para dopamina foram avaliadas a partir de estudos de voltametria cíclica.

Palavras-chave: Goma do Cajueiro, Filmes LbL, Ftalocianina de níquel

INTRODUÇÃO

Materiais nanoestruturados, em sua grande maioria são formados por partículas nanométricas, porém, também podem ser obtidos na forma de filmes ultrafinos, onde a espessura das camadas é da ordem nanométrica. Dentre as técnicas de formação de filmes, a LbL (*layer-by-layer*) vem se destacando como uma técnica viável de formação de filmes finos orgânicos e inorgânicos, devido a sua simplicidade experimental e baixo custo. Vários são os materiais que podem ser utilizados para a fabricação de filmes LbL, tais como os polímeros, azopolímeros, polissacarídeos, compostos de coordenação e macromoléculas, cujo interesse consiste em crescer filmes em substratos sólidos para modificar eletrodos de modo a criar sensores específicos [1-4].

Os polissacarídeos também podem ser empregados para a construção de filmes nanoestruturados utilizando a técnica LbL, tirando vantagem do caráter de poliânion apresentado por estes, grande capacidade de formação de filmes, solubilidade em água, apesar de não serem eletroativos. Têm-se exemplos de polissacarídeos que já foram utilizados na construção de filmes tais como o quitosana, *Sterculia urens* (caraia), *Anadenanthera macrocarpa Bent* (angico), *Sterculia striata* (chichá). Estes materiais conferem propriedades específicas aos filmes como maior estabilidade além de um aumento na quantidade de material adsorvido por monocamada.

Diversos polieletrólitos comerciais têm sido utilizados na preparação de filmes LbL, dentre eles destacam-se o PAH, POMA, PSS e PVS. Recentemente, polieletrólitos com estrutura do tipo silsesquioxano têm se mostrado atrativos para a formação de filmes LbL com alta estabilidade e propriedades interessantes

Neste trabalho, a técnica LbL foi utilizada para a preparação de filmes ultrafinos em dois sistemas nanoestruturados distintos: (i) filmes com tetracamadas intercalando entre os polieletrólitos o DABLO2p (polication cloreto de 3-n-propil-1-azonia-4-azabicyclo[2.2.2] octano silsesquioxano), a goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) e a NiTsPc, formando a arquitetura (DABLO2p/GOMA/DABLO2p/NiTsPc)_n, onde n é o número de tetracamadas e (ii) os polieletrólitos o SiPy⁺Cl⁻ (cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano), a goma do cajueiro e a NiTsPc, formando a arquitetura (SiPy⁺Cl⁻/GOMA/SiPy⁺Cl⁻/NiTsPc)_n. Para comparação filmes formados por bicamadas sem as gomas formando as arquiteturas (DABLO2p/NiTsPc)_m, e (SiPy⁺Cl⁻/NiTsPc)_n também foram preparados. Visa-se então, empregar estes materiais compósitos nanométricos, na forma de filmes finos para o desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Primeiramente o substrato limpo (FTO) foi imerso na solução aquosa do polication DABLO2p ou SiPy⁺Cl⁻, por 5 minutos. Após este período, este foi colocado na solução aquosa de lavagem de água destilada no mesmo pH da solução do modificador (pH = 3,0), por 1 minutos e seco com auxílio de um jato de ar, sendo então formada a primeira camada. Posteriormente, submergiu-se o substrato na solução aquosa do poliânion, neste caso, a NiTsPc por 5 minutos (pH = 3,0). Feito isso, colocou-se o substrato mais uma vez na solução de lavagem por 1 minuto, e secou-se sob fluxo de ar, formando-se a primeira bicamada. Este processo foi repetido até a obtenção do número desejado de bicamadas. Para crescer os filmes contendo tetracamadas, como a goma tem caráter de polianion, esta foi adicionada entre duas camadas de polication (DABLO2p ou SiPy⁺Cl⁻), formando assim a arquitetura em tetracamadas.

As medidas de espectroscopia de UV-VIS foram realizadas para caracterizar e monitorar o crescimento dos filmes. As medidas foram feitas a cada bicamada ímpar, ou seja: 1, 3, 5, 7, 9 até a décima quinta bicamada. As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio. O crescimento dos filmes foi monitorado a partir da banda-Q da ftalocianina no comprimento de onda entre 620 e 690 nm. Voltamogramas cíclicos foram coletados utilizando um potenciostato μ Autolab pgstat type III. A cela eletroquímica utilizada possuía capacidade de 10 mL, contendo três eletrodos: um eletrodo auxiliar de platina (área=0,592 cm²), eletrodo de referência de Ag/AgCl, e o eletrodo de trabalho, o qual constitui os filmes automontados produzidos sobre FTO (área=0,4 cm²). Foram realizados estudos em HCl 0,1 mol L⁻¹ e em diferentes velocidades de varredura na faixa de 10 a 100 mV.s⁻¹ em uma faixa de potencial de 0,0 V a 1,6 V.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O monitoramento do crescimento dos filmes com as gomas se deu através de espectroscopia de UV-VIS e está ilustrado na Figura 1:

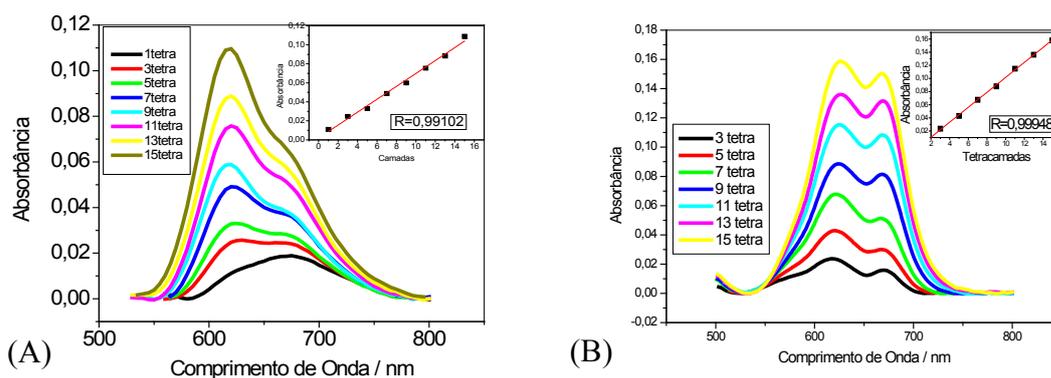


Figura 1: Espectros de absorção no UV-VIS para os filmes automontados de (A) (Dablo2p/GOMA /Dablo2p/NiTsPc), e (B) (SiPy⁺Cl/Goma/SiPy⁺Cl/NiTsPc) com diferentes tetracamadas. Figuras Inseridas: Relação entre absorbância e o número de tetracamadas.

Pode ser observado que para os espectros dos filmes com as gomas já nas primeiras tetracamadas, as bandas relativas às espécies monoméricas apresentam-se mais intensas quando comparadas com os filmes sem a goma (não mostrado). Tal comportamento é mais evidenciado para o filme contendo arquitetura (SiPy⁺Cl/GOMA/SiPy⁺Cl/NiTsPc)_n, no qual as bandas referentes as espécies monoméricas apresentam relativa intensidade para todas as tetracamadas monitoradas. O comportamento distinto observado para o filme com arquitetura (SiPy⁺Cl/GOMA/SiPy⁺Cl/NiTsPc)_n pode estar relacionado a quantidade de sítios positivos disponíveis. A presença da goma que tem caráter de poliânion, entre camadas do polycation SiPy⁺Cl aumenta a disponibilidade de sítios positivos para interação eletrostática. Essa interação aumentada faz com que uma maior quantidade de espécies monoméricas esteja presente no filme automontado. Essa característica é benéfica para a arquitetura do filme, já que uma maior quantidade de espécies monoméricas indica uma melhor organização das camadas do filme LbL, além disso a presença de agregados de ftalocianina dimérica dão lugar a forma monomérica.

Pode-se observar na Figura 2A que as correntes de pico para os filmes contendo a goma foram superiores em relação aos filmes sem as mesmas. Isto indica que uma maior quantidade do material modificador do eletrodo está adsorvida sobre a superfície do eletrodo. Apesar do filme com arquitetura (DABLO2p /GOMA/DABLO2p /NiTsPc)₃ ter apresentado maiores valores de corrente, sua estabilidade se provou menor do que o filme contendo arquitetura (SiPy⁺Cl/GOMA/SiPy⁺Cl/NiTsPc)₃ (Figura 2B), o que impossibilitou o seu uso para determinação de dopamina.

A Figura 3A mostra os voltamogramas cíclicos dos filmes com arquitetura (SiPyCl/GOMA/SiPyCl/NiTsPc)₃, em presença de diferentes concentrações de DA. Pode-se observar um aumento linear da corrente de pico em 1,2 V com o aumento da concentração de DA. A Figura 3B mostra a relação entre a corrente e o aumento da concentração de DA para as arquiteturas (SiPy⁺Cl/NiTsPc)₃ e (SiPy⁺Cl/goma/SiPy⁺Cl/NiTsPc)₃, observa-se que para ambos os sistemas ocorre uma relação linear o que indica que o eletrodo é sensível a diferentes concentrações do analito, podendo assim ser utilizado para determinações qualitativas e quantitativas do mesmo. Obtendo-se um limite de detecção de 8,424 μ mol.L⁻¹ para arquitetura (SiPy⁺Cl/GOMA/SiPy⁺Cl/NiTsPc)₃ e de 7,721 μ mol.L⁻¹ para filmes com arquitetura (SiPy⁺Cl/NiTsPc)₃.

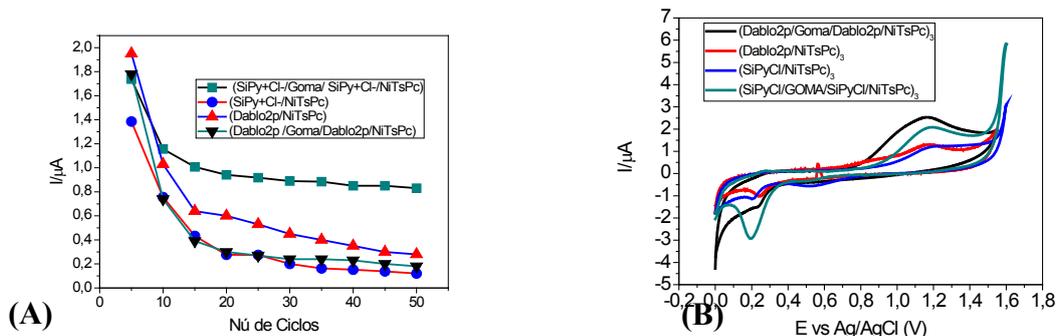


Figura 2: (A) Comparação entre os voltamogramas cíclicos dos filmes (SiPy⁺Cl⁻/GOMA/SiPy⁺Cl⁻/NiTsPc), (DABLO2p/GOMA/DABLO2p/NiTsPc), (SiPy⁺Cl⁻/NiTsPc) e (DABLO2p/NiTsPc) em HCl 0,1 mol/L (pH= 2), v=50mV/s. (B) Valores de corrente em função do número de ciclos para filmes com arquitetura (SiPyCl/GOMA/SiPyCl/NiTsPc)₃ e (SiPyCl/NiTsPc)₃, (Dablo2p/GOMA/DABLO2p/NiTsPc) e (DABLO2p /NiTsPc)

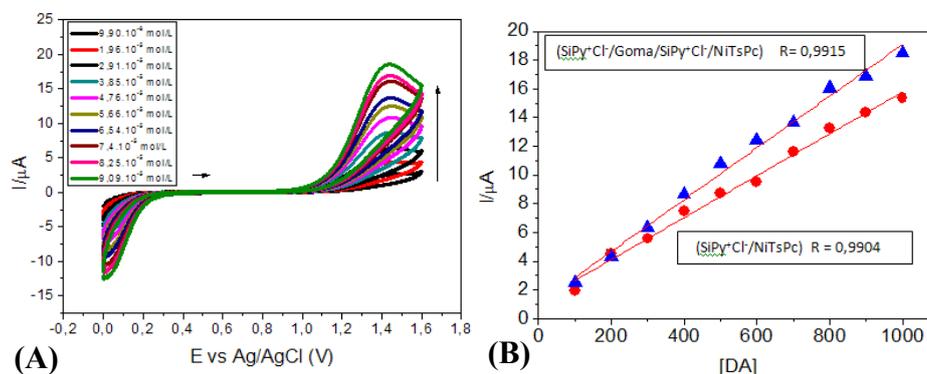


Figura 3: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes concentrações de DA utilizando-se um eletrodo com arquitetura (SiPy⁺Cl⁻/GOMA/SiPy⁺Cl⁻/NiTsPc)₃, em HCl 0,1 mol/L (pH= 2), v=50 mV/s (B) Relação entre a corrente em função do aumento da concentração de DA para os sistemas contendo arquitetura em tetracamadas (▲) e arquitetura em bicamadas (●).

CONCLUSÕES

Através da técnica de UV-VIS, utilizando a banda Q da ftalocianina na faixa de 620 a 690 nm, mostrou uma relação linear entre o número de camadas e absorvância, o que indica que a mesma quantidade de ftalocianina é absorvida a cada bi/tetracamada depositada. Pode-se observar também um comportamento diferente dos demais para o filme contendo arquitetura (SiPyCl/goma/SiPyCl/NiTsPc), onde a banda monomérica da ftalocianina em 670 nm foi mais intensa. Este comportamento das moléculas adsorvidas ao filme é benéfico, pois é uma indicação de que este encontra-se mais organizado tendo em vista que existe uma maior quantidade de monômeros adsorvidos ao filme. Comparando-se a estabilidade dos filmes pode-se averiguar que o filme (SiPyCl/GOMA/SiPyCl/NiTsPc), apresentou uma maior estabilidade. Ao adicionar dopamina ao sistema pode-se observar um aumento linear na corrente em função da concentração de dopamina para os filmes com arquitetura (SiPyCl/NiTsPc) e (SiPyCl/goma/SiPyCl/NiTsPc), indicando que estes podem ser utilizados com sucesso na detecção do analito DA.

AGRADECIMENTOS: CAPES, CNPq, NBioNet/CAPES

REFERÊNCIAS

- [1] ZAGAI, H. J.; GRIVEAU, S.; SILVA, F. J.; et al. **Metallophthalocyanine-based molecular materials as catalysts for electrochemical reactions.** Coord. Chem. Reviews 254, p. 2755-2791, 2010.
- [2] FERREIRA, M., ZUCOLOTO, V., FERREIRA, et al **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**, v.10, p. 1-25, 2004
- [3] ZAMPA, M. F., BRITO A. C. F. de, KITAGAWA, I. L., et al. **Natural Gum assisted Phthalocyanine Immobilization in Electroactive Nanocomposites Physicochemical Characterization and Sensing applications.** Biomacromolecules, v.8, p.3408-3413, 2007.
- [4] EIRAS, C.; SANTOS, A. C.; ZAMPA, M. F.; et al. **Natural polysaccharides as active biomaterials in nanostructured films for sensing.** J. biomater. Cienc. V. 21, p.1533-1544, 2010.

CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DE ELETRODOS MODIFICADOS COM DIFERENTES MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA

Rosana Mossanha, Christiana Andrade Pessoa

Departamento de Química - Universidade Estadual de Ponta Grossa - PR - Brasil.

r.mossanha@hotmail.com

RESUMO: Neste trabalho foram investigados diferentes tipos de modificadores: ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), ácido tioláctico (TLA), cistamina (CYS) e o ácido 11-mercaptoundecanoico para a formação de monocamadas auto-organizadas sobre a superfície do ouro. A eletroatividade, a formação e organização dos filmes foram avaliadas pela molécula sonda ($[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$). Através da espectroscopia de impedância eletroquímica foi possível determinar os parâmetros cinéticos das SAMs, os quais foram consistentes com os obtidos pelos voltamogramas cíclicos. Analisando o desempenho dos sensores para a determinação de dopamina (DA) através da VC, verificou-se que a SAM formada pelo TLA foi a que apresentou resultados mais satisfatórios para a determinação deste analito. A dopamina foi quantificada pela técnica de VC e VOQ, na faixa linear de 1,1 a $6,6 \times 10^{-7}$ mol/L. Utilizando-se a técnica de VOQ, o eletrodo Au-TLA foi capaz de distinguir o ácido ascórbico (AA) e DA quando presentes na mesma solução, com uma diferença de potencial de aproximadamente 340 mV.

Palavras-chave: monocamadas auto-organizadas, dopamina, eletrodos de ouro.

INTRODUÇÃO

Muitos estudos de filmes finos têm sido desenvolvidos nos últimos anos, estas modificações buscam aumentar a aplicabilidade e a eficiência dos sensores eletroquímicos [1]. Os filmes finos nanoestruturados têm sido vastamente explorados em diferentes áreas, as quais englobam compostos orgânicos, poliméricos e biológicos, além dos metálicos e inorgânicos. A montagem destes filmes ultrafinos é essencial para o desenvolvimento de dispositivos moleculares e sensores devido à possibilidade de combinação de diversos materiais.

Um processo comum de modificação consiste na técnica empregando-se SAM (do inglês *self-assembled monolayers*). Esta técnica emprega camadas moleculares que exibem alta organização e que são formadas espontaneamente como consequência da imersão de uma superfície sólida em uma solução constituída de moléculas anfóteras [2]. Compostos alcanotióis com diferentes características são frequentemente estudados: *n*-alcanotióis, alcanoditióis, carboxialcanotióis, aminoalcanotióis e tióis aromáticos [3-4].

Este trabalho tem como objetivo geral o estudo das melhores condições na preparação das diferentes monocamadas auto-organizadas de ácido mercaptopropiônico MPA ($HSCH_2CH_2COOH$), ácido tioláctico TLA ($CH_3CH(SH)COOH$), ácido mercaptoundecanoico MUA ($HS(CH_2)_{10}COOH$) e a cistamina CYS ($NH_2CH_2CH_2(S)CH_2CH_2NH_2$) sobre eletrodos de ouro, com o propósito de aplicar no desenvolvimento de sensores eletroquímicos avaliando a sua influência na presença do analito, dopamina.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de pureza analítica (PA) e foram utilizados sem purificação prévia. As monocamadas auto-organizadas foram obtidas após a limpeza e caracterização dos eletrodos de ouro. O pré-tratamento mecânico consistiu no polimento do eletrodo com solução de alumina $0,5 \mu m$, sonificados em água e etanol por 5 minutos. No pré-tratamento químico, houve a imersão do eletrodo em solução piranha (1:3 H_2O_2 30% - H_2SO_4), durante 10 minutos, sonificados por 1 minuto. O pré-tratamento eletroquímico foi realizado aplicando-se várias varreduras sucessivas entre os potenciais redox do ouro em solução aquosa de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 em 50 mV s^{-1} até obter o perfil voltamétrico característico. Após, procedeu-se a imersão do eletrodo em etanol, durante 30 minutos. A quimissorção da SAM é realizada a partir de soluções alcoólicas dos tióis $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ sobre superfícies oxidadas de ouro. Os experimentos eletroquímicos foram realizados, utilizando uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos: platina como contra eletrodo ($0,5652 \text{ cm}^2$), eletrodo de calomelano saturado (SCE) como referência e o eletrodo de ouro policristalino como eletrodo de trabalho ($0,0401 \text{ cm}^2$). As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato Palm Sens conectado a um microcomputador para a aquisição dos dados. As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizadas no potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT, conectado ao um microcomputador e controlado pelo software FRA, o qual foi utilizado para aquisição e análise dos dados de impedância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As monocamadas utilizadas foram formadas por diferentes arranjos estruturais, tamanho da cadeia carbônica e grupos funcionais. A eletroatividade, formação e organização dos filmes dos diferentes tióis foi avaliada, monitorando o comportamento da molécula sonda, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Estudos em diferentes velocidades de varredura para os eletrodos na presença do ferricianeto mostraram que a corrente de pico anódica aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando que o processo de transferência de elétrons é controlado pela difusão das espécies à superfície do eletrodo.

Os voltamogramas mostraram um decréscimo nas respostas da corrente faradaica com o aumento do tempo de imersão do substrato ouro na solução etanólica dos tióis, sugerindo que o processo de transferência de elétrons ocorre através dos *pinholes* da superfície e também por tunelamento. A Figura 1-A mostra o comportamento das diferentes SAMs, as quais apresentaram um deslocamento do potencial para regiões de valores menos positivos, indicando que as imobilizações das moléculas ocorreram. O Au-MPA e o Au-TLA obtiveram melhor recobrimento da superfície no tempo de imersão de 3 horas. Enquanto que o Au-MUA, sua molécula ser uma cadeia longa e o Au-CYS, depender da quebra de ligação S-S, necessitaram de maior tempo de imersão 24 horas para organização da monocamada.

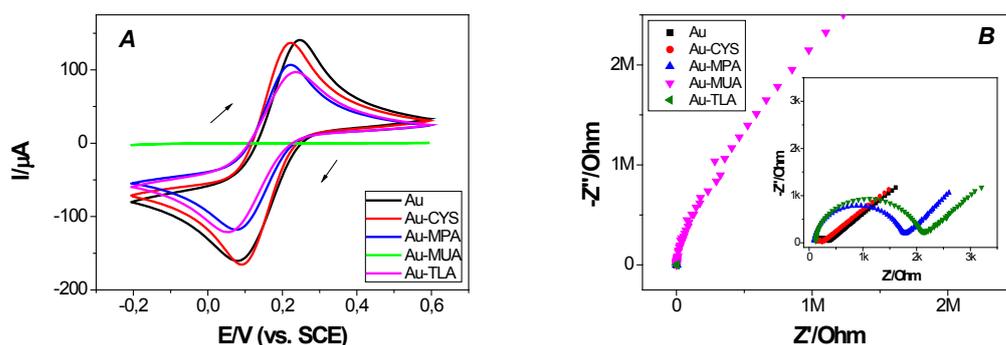


Figura 1: A - Voltamogramas cíclicos do Au, Au-MPA, Au-TLA, Au-MUA e Au-CYS, em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 0,05 mol L⁻¹ (pH=7,0). Velocidade de varredura 100 mV s⁻¹. B – Diagramas de Nyquist de 0,008 mol L⁻¹ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em PBS 0,1 mol L⁻¹ para o eletrodo de ouro limpo e modificado com a monocamada, Eac = 10 mV, Edc = 200 mV e faixa de frequência de 10 KHz a 100 mHz.

Através da EIE o eletrodo de ouro sem modificação e o Au-CYS, o processo de transferência de elétrons através das interfaces é muito rápido, pois os espectros se apresentaram praticamente na forma de uma reta. Diferentemente, no Au-MPA e no Au-TLA, o processo torna-se mais lento, sendo caracterizado pela presença da região semicircular grande. O MUA que contém um número elevado de carbonos na cadeia apresentou um maior recobrimento da superfície, o que ocasionou perda da resposta voltamétrica e alto valor de Rct 1,45.10⁷ Ωcm², conforme Figura 1-A e 1-B. Através da técnica de EIE, pode-se comprovar que o dados obtidos e o comportamento das SAMs foram consistentes com os dados obtidos pelos voltamogramas cíclicos.

As SAMs obtidas foram utilizadas para avaliar a influencia dos grupos carboxílicos e dos grupos amina para a determinação do fármaco. Analisando o desempenho dos sensores para a determinação de dopamina (DA) através da VC (Figura 2-A), verificou que a SAM formada pelo TLA foi a que apresentou resultados mais satisfatórios quanto a sensibilidade e seletividade em relação a este analito.

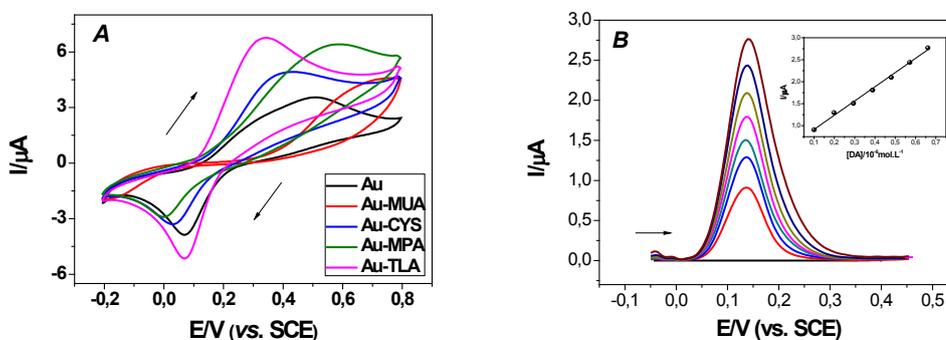


Figura 2: A - Voltamogramas cíclicos dos diferentes eletrodos na presença de dopamina 0,1 mmol L⁻¹, em solução PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹. B - Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo Au-TLA na presença de DA em diferentes concentrações (1,07.10⁻⁷, 1,98. 10⁻⁷, 2,94. 10⁻⁷, 3,88. 10⁻⁷, 4,80. 10⁻⁷, 5,7. 10⁻⁷, 6,6. 10⁻⁷ mol. L⁻¹). Parâmetros utilizados: ΔEs = 4 mV, a = 40 mV e f = 60 Hz

Utilizando-se Au-TLA A dopamina foi quantificada pela técnica de VC e VOQ (Figura 2-B), na faixa linear de $1,1$ a $6,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ com limites de detecção de $1,42 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,77 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. A DA e o ácido ascórbico (AA) coexistem no fluido extracelular do sistema nervoso central e no soro, os quais possuem potenciais de oxidação similares em eletrodos sólidos convencionais, tornando-se difícil separar e determinar estes compostos nestas condições. Ao utilizar o Au-TLA em pH 7,0 o filme encontra-se na sua forma aniônica ($pka = 4,5$), podendo atrair moléculas de DA, que estão em maioria na forma catiônica ($pka = 8,9$) e sofrer repulsão eletrostática das moléculas de AA ($pka = 4,2$), impossibilitando sua chegada à superfície do eletrodo.

Analisando a Figura 3-A pode-se concluir que a presença de AA não interfere significativamente na determinação de dopamina, pois o voltamograma do branco (resposta do eletrólito) não apresentou diferença significativa na sua resposta eletroquímica quando adicionado o AA, na concentração de $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

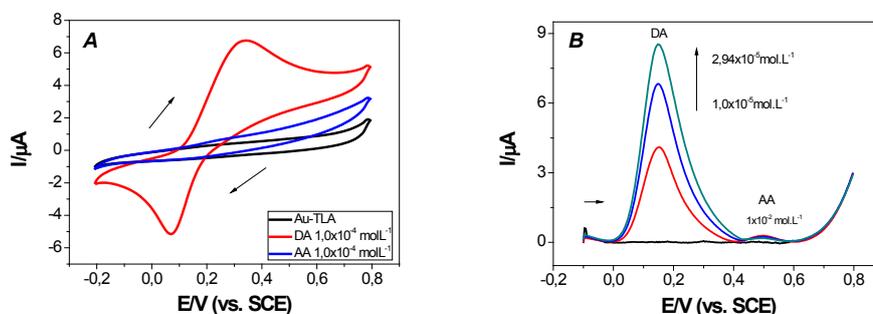


Figura 3: A Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-TLA na presença de AA e DA, velocidade de varredura 100 mV s^{-1} B - Voltamogramas de onda quadrada da DA (na faixa de $1,0$ a $2,94 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de AA ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ - concentração fixa). Parâmetros utilizados: $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $f = 60 \text{ Hz}$. Solução Tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0.

Utilizando-se a técnica de VOQ (Figura 3-B), o eletrodo Au-TLA foi capaz de distinguir o AA e DA quando presentes na mesma solução. Foram observados dois picos de oxidação, em 150 mV e 490 mV (de menor intensidade) relacionados com as reações redox de DA e AA, respectivamente. Esses resultados possibilitam a detecção da DA sem interferência do AA, uma vez que oxidam em potenciais diferentes, com uma separação de pico de 340 mV .

CONCLUSÃO

Medidas de VOQ utilizando o Au-TLA, possibilitaram a determinação de DA com limite de detecção de $4,77 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Este eletrodo Au-TLA apresentou um comportamento seletivo, distinguindo os picos de oxidação para DA ($E_{pa} = 150 \text{ mV}$) e AA ($E_{pa} = 490 \text{ mV}$), com uma separação de 340 mV . Tais resultados indicam que o Au-TLA pode ser aplicado com um possível sensor para a determinação simultânea dessas espécies.

AGRADECIMENTOS: TWAS, UEPG, NBioNet / CAPES

REFERÊNCIAS

- [1] ARIGA K, NAKANISHI T., MICHINOBU, T.; "Immobilization of biomaterials to nanoassembled films (self-assembled monolayers, Langmuir-Blodgett films, and layer-by-layer assemblies) and their related functions." *Journal of Nanoscience and nanotechnology*, v. 6, n. 8, p. 2278-2301, 2006.
- [2] LOVE J. C., ESTROFF L. A., KRIEBEL J. K., "Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology." *Chemical Review*, v. 105, p. 1103-1169, 2005
- [3] MENDES R. K.; CARVALHAL R. F.; KUBOTA L. T.; Effects of different self-assembled monolayers on enzyme immobilization procedures in peroxidase-based biosensor development. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 612, p. 164-172, 2008.
- [4] MOCCELINI S. K., VIEIRA I. C., LIMA F., et al. "Determination of thiocarb using a biosensor based on alfalfa sprout peroxidase immobilized in self-assembled monolayer." *Talanta*, v. 82, p. 164-170, 2010

DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO UTILIZANDO SENSORES DE PASTA DE NANOTUBOS DE CARBONO E AZUL DA PRÚSSIA – ESTUDO DE EFEITO DE INTERFERENTES E ESTABILIDADE EM DIFERENTES pHs

Samantha Husmann, Aldo J. G. Zarbin

Grupo de Química de Materiais (GQM) – Departamento de Química UFPR, Curitiba - PR - Brasil. samanthahus@hotmail.com

RESUMO: Utilizando eletrodos construídos a partir de uma rota inédita descrita pelo grupo para a eletrodeposição de azul da Prússia (AP) sobre nanotubos de carbono (NTCs), apresentamos um estudo da influência do pH, tanto na estabilidade do eletrodo, quanto na determinação de H_2O_2 , assim como um estudo do efeito da presença de diferentes interferentes (frutose, glicose, ácido ascórbico, ácido úrico, ácido glutâmico e ácido cítrico) na determinação de H_2O_2 . Alta estabilidade e resposta eletroquímica do H_2O_2 foram obtidas, inclusive em pH neutro. Com exceção do ácido ascórbico e ácido úrico, erros menores que 1% foram causados pela presença dos interferentes estudados.

Palavras-chave: sensores; nanotubos de carbono; azul da Prússia; interferentes, nanocompósitos.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de sensores e biossensores para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que sejam estáveis, seletivos, sensíveis e livres de interferência é de extrema importância em diversas áreas, principalmente na indústria médica, alimentícia e ambiental. O azul da Prússia (AP) é um hexacianoferrato capaz de reduzir o peróxido de hidrogênio muito rapidamente e a baixos valores de potencial. Devido a esse comportamento redox e suas características semicondutoras, o AP ganhou destaque como material para modificação de eletrodos utilizados no desenvolvimento de sensores de H_2O_2 . Entretanto, a baixa estabilidade eletroquímica e baixa estabilidade em pH neutro de eletrodos modificados com AP dificultam o seu uso para essa aplicação. Como uma alternativa para o aumento da estabilidade do AP, nanocompósitos entre AP e diferentes materiais vêm sendo utilizados, sendo um deles os nanotubos de carbono (NTCs)^[1].

Devido principalmente à condutividade elétrica, estabilidade química e resistência mecânica, os NTCs têm sido empregados na preparação de eletrodos para diferentes aplicações, apresentando a capacidade de diminuir o potencial de trabalho, melhorar a reversibilidade de processos, ter baixa corrente de fundo e possuir superfície facilmente renovável^[2]. Pelas propriedades de ambos os materiais, o compósito NTC/AP apresenta melhor estabilidade eletroquímica, podendo atuar em uma maior faixa de pH, inclusive neutro, e em potenciais de trabalho próximos ou igual a zero, diminuindo, e em muitos casos eliminando, a possibilidade de interferência^[3]. Na maioria das vezes, esse compósito é obtido por ciclagem eletroquímica na presença simultânea de íons $[Fe(CN)_6]^{4-}$ e Fe^{3+} . Nosso grupo de pesquisa desenvolveu recentemente uma rota inédita de preparação desse tipo de compósitos,^[4] através de uma reação eletroquímica heterogênea entre espécies de ferro contidas no interior dos NTCs, e íons ferricianeto em solução aquosa.

Com base nessa rota e na interação formada entre os NTCs e o AP, neste trabalho verificou-se a possibilidade de detecção de H_2O_2 em diferentes pHs, além de se determinar o efeito causado pela adição de interferentes comuns em determinações de H_2O_2 .

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A síntese dos eletrodos de NTCs/AP foi realizada conforme descrita por nosso grupo^[4]. Em resumo, eletrodos de pasta de nanotubos de carbono tipo multi-paredes e preenchidos com ferro e óxidos de ferro (sintetizados de acordo com procedimento descrito previamente em nosso grupo^[5]) foram ciclados 500 vezes em solução aquosa de ferricianeto de potássio, e posteriormente lavados com água. Soluções de tampão fosfato nos pHs 3,10; 4,18; 5,00; 6,10; 7,00 e 8,69 foram utilizadas para as medidas de estabilidade em pH, sendo as voltametrias cíclicas realizadas com uma velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} numa janela potencial de -0.3 a 1.2 V (VS Ag/AgCl). Para as determinações de H_2O_2 na presença de interferentes, medidas cronoamperométricas foram realizadas. Essas medidas foram feitas sob agitação constante com adições sucessivas de $20 \mu\text{L}$ de soluções de H_2O_2 , gerando concentrações finais na ordem de $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, sobre tampão fosfato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,00, contendo cada interferente na concentração $5.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. O intervalo de tempo foi de 500 segundos, com potencial de trabalho igual a 0 V (vs Ag/AgCl). Os interferentes utilizados foram a frutose, glicose, ácido ascórbico, ácido úrico, ácido glutâmico e ácido cítrico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os eletrodos de NTC/AP foram submetidos a sucessivas voltametrias cíclicas em diferentes pHs para se verificar a estabilidade do material. Observou-se que os dois pares redox característicos do azul da Prússia são mais definidos nos pHs 5,00; 6,10 e 7,00, sendo que em pH 8,69 ocorre uma distorção do primeiro par e o desaparecimento do segundo que pode ser atribuída à interação entre as espécies de ferro do AP e os íons hidróxido (OH⁻), formando FeOH₃ em pHs mais elevados^[6]. Apesar de não apresentar pares redox tão definidos em pH 7,00, o material apresenta-se muito estável nessa faixa, como mostrado na Figura 1a, onde foi calculada a porcentagem de sinal do 50º ciclo em relação ao primeiro no pico de redução a 0,8V.

A sensibilidade frente à determinação de H₂O₂ em diferentes pHs também foi avaliada, tanto por voltametria cíclica na presença de H₂O₂ como por cronoamperometria, através da adição de quantidades conhecidas de eróxido de hidrogênio sobre tampão fosfato em pHs distintos. Em todos os voltamogramas, na faixa de pH estudada, observou-se um aumento, da resposta eletroquímica na presença de 5,0.10⁻⁶ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio, indicando uma maior sensibilidade, como pode-se perceber na Figura 1b, onde ocorreu maior aumento de sinal em pH 4,18, apesar de em pHs 6 e 7 o aumento também ser considerável.

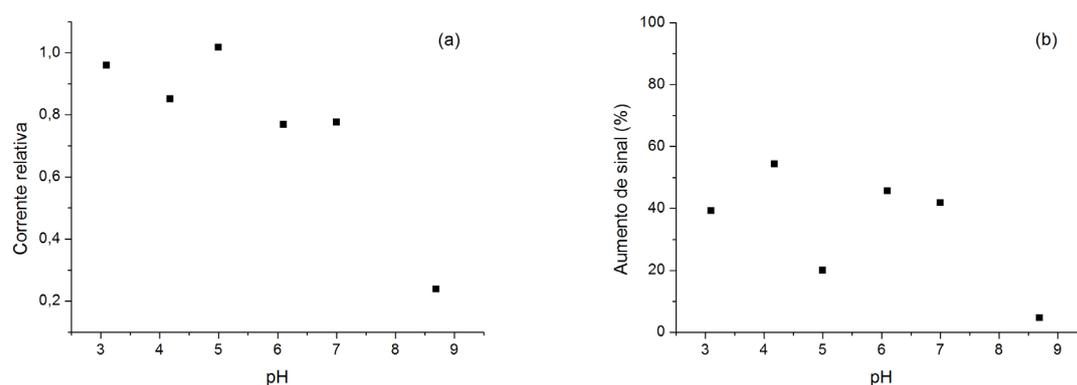


Figura 1: a) Intensidade da corrente do 50º ciclo voltamétrico relativa ao primeiro ciclo, realizado em diferentes pHs; b) porcentagem de aumento de sinal obtida em relação ao branco das voltametrias em presença de 5,0.10⁻⁶ mol L⁻¹ de H₂O₂ em diferentes pHs.

O aumento de estabilidade e sensibilidade, mesmo em pH neutro, pode estar relacionado a uma maior interação do AP com o NTC, associada a metodologia utilizada na formação do AP, que ocorre pela utilização das espécies de ferro contidas no interior dos NTCs, fazendo com que haja um contato mais íntimo entre os dois materiais. Apesar de os melhores resultados não serem obtidos em pH 7, estudos posteriores, inclusive o de interferência, se realizaram neste pH pelo maior potencial de aplicação em sensores e biossensores.

Para os testes de interferência, primeiramente foram realizadas voltametrias cíclicas de soluções 1.10⁻³ molL⁻¹ em tampão fosfato dos interferentes estudados, para se verificar a resposta eletroquímica no potencial utilizado para as medidas de H₂O₂, a zero volt. Conforme a Figura 2a, não se observa a 0 V nenhuma resposta que possa causar sinal de interferência sobre a determinação de H₂O₂.

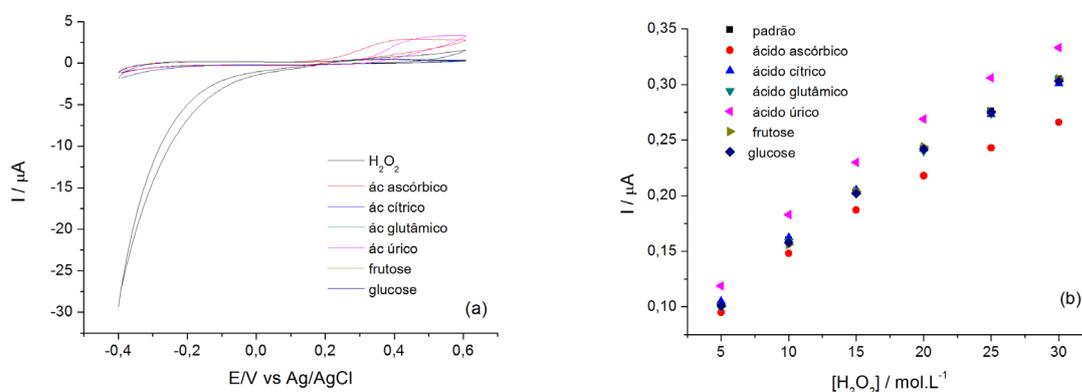


Figura 2: a) Voltametrias cíclicas em tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹, pH 7,00, na presença de 1.10⁻³ mol. L⁻¹ de H₂O₂ e diferentes interferentes (velocidade de varredura igual a 50 mV.s⁻¹); b) curvas analíticas para a determinação de H₂O₂ na presença de 5.10⁻⁶ molL⁻¹ de diferentes interferentes, obtidas por cronoamperometria a 0 V (vs Ag/AgCl).

A partir de uma curva padrão de resposta de intensidade de corrente frente à concentração de H_2O_2 , foram então realizadas cronoamperometrias onde se adicionou sucessivamente quantidades de uma solução de H_2O_2 na ordem de $10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ em tampão fosfato $0,05 \text{ molL}^{-1}$ contendo cada interferente na concentração $5 \cdot 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$. As curvas obtidas para a resposta na determinação de H_2O_2 na presença dos interferentes foram comparadas com a curva padrão, sendo calculado o erro que cada interferente produziu na medida, determinado assim a interferência de cada agente utilizado.

Como mostrado na Figura 2b e na Tabela 1, dos seis interferentes testados, apenas dois geraram interferência significativa na determinação de H_2O_2 , sendo eles o ácido ascórbico e o ácido úrico, enquanto que os demais interferentes apresentaram uma média de erro menor que 1% nas determinações. Esse erro pode estar de alguma forma associado às maiores respostas eletroquímicas desses dois interferentes nas voltametrias cíclicas realizadas, apesar de não apresentarem respostas significativas no potencial igual a zero volt, onde foram realizadas as cronoamperometrias. Por outro lado, é comum o ácido ascórbico e o ácido úrico apresentarem interferência em medidas realizadas com azul da Prússia^[1].

Tabela 1: Erros obtidos pela comparação de curvas de determinação de H_2O_2 na presença de interferentes e a curva padrão.

Interferente	Ácido ascórbico	Ácido cítrico	Ácido glutâmico	Ácido úrico	Frutose	Glucose
Erro médio/ %	10,59	0,22	0,65	11,57	0,25	0,45

CONCLUSÕES

Os eletrodos de NTCs modificados com AP obtidos através da rota descrita por nosso grupo apresentaram alta estabilidade eletroquímica mesmo em pH neutro, sendo que neste mesmo pH observou-se alta sensibilidade frente a detecção de peróxido de hidrogênio. Além disso, esse material mostrou-se até certo ponto seletivo em relação ao H_2O_2 por apresentar baixíssimos erros causados por interferência de 4 dos 6 interferentes testados, sendo o ácido ascórbico e o ácido úrico os causadores de maior interferência. Essas características em conjunto com aplicação de potencial igual a 0 V (vs Ag/AgCl) em pH neutro, além de baixíssimos limites de detecção e quantificação e alta sensibilidade já descritos em trabalhos anteriores, tornam esses eletrodos um grande potencial na utilização como sensores de peróxido de hidrogênio.

AGRADECIMENTOS

CNPq, CAPES, Fundação Araucária, Rede Nacional de Pesquisa em Nanotubos de Carbono, INCT-Nanocarbono.

REFERÊNCIAS

- [1] RICCI, F., PALLESCHI, G., Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p.389-407, 2005.
- [2] RUBIANES, M. D., RIVAS, G. A., Carbon nanotubes paste electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 5, p.689-694, 2003.
- [3] LI, Z., CHEN, J., LI, W., CHEN, K., NIE, L., YAO, S., Improved electrochemical properties of prussian blue by multi-walled carbon nanotubes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 603, p.59-66, 2007.
- [4] NOSSOL, E., ZARBIN, A. J., A Simple and Innovative Route to Prepare a Novel Carbon Nanotube/Prussian Blue Electrode and its Utilization as a Highly Sensitive H_2O_2 Amperometric Sensor. **Advanced Functional Materials**, v. 19, p.3980-3986, 2009.
- [5] SCHNITZLER, M. C., OLIVEIRA, M. M., UGARTE, D., ZARBIN, A. J. G., One-step route to iron oxide-filled carbon nanotubes and bucky-onions based on the pyrolysis of organometallic precursors. **Chemical Physics Letters**, v. 381, p.541-548, 2003.
- [6] KARYAKIN, A. A., KARYAKINA, E. E., GORTON, L., On the mechanism of H_2O_2 reduction at Prussian Blue modified electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 1, p.78-82, 1999.

DETERMINAÇÃO DE BUTILHIDROXIANISOL (BHA) EM ALIMENTOS POR SWV UTILIZANDO UM ELETRODO COMPÓSITO DE CARBONO MODIFICADO COM $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$

Heloizy G. Freitas¹, Orlando Fatibello-Filho²

¹Instituto de Pesquisa Tecnológica de São Paulo - IPT, São Paulo - SP; ²Departamento de Química – UFSCar, São Carlos - SP. heloizy@ipt.br

RESUMO: Foi desenvolvido um novo procedimento para a determinação voltamétrica de BHA por SWV em alimentos (maioneses) empregando-se um eletrodo composto de carbono modificado com $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ imobilizado em resina poliéster. As determinações foram realizadas em nitrato de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e etanol 90/10% v/v (pH condicional 6,7). A corrente de pico anódica foi obtida em potencial $0,42 \text{ V vs. eletrodo de Ag/AgCl (KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1})$, sendo esta proporcional a concentração de BHA no intervalo de $3,4 \times 10^{-7}$ a $4,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ expresso pela equação: $I_{pa}/A = 2,41 \times 10^{-6} + 0,83 [\text{BHA (mol L}^{-1})]$; $r = 0,9989$ e limite de detecção igual a $5,9 \times 10^{-8}$. Os RSDs para o estudo de repetibilidade inter e intra dias foram 0,86% e 2,79 % respectivamente e, as recuperações variaram de 95,8 a 104 %. O método foi aplicado com sucesso na determinação de BHA em maionese.

Palavras-chave: BHA, Eletrodo composto modificado com $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$

INTRODUÇÃO

Segundo a ANVISA [1], “antioxidantes são substâncias que retardam o aparecimento de alterações oxidativa em alimentos”, corroborando assim com a definição da FDA [2]. Segundo essa agência, “antioxidantes são substâncias utilizadas para preservar os alimentos através do retardamento da deterioração, rancidez e descoloração decorrente da autoxidação destes produtos”. Estes compostos aromáticos são classificados em naturais ou sintéticos, como por exemplo, BHA (2-terc-butil-4-hidroxianisol) e BHT (di-terc-butil metil fenol) que são os mais utilizados na indústria de alimentos.

Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de efeito carcinogênico em experimentos com animais, onde o BHA mostrou induzir a hiperplasia gastrointestinal em roedores por um mecanismo ainda desconhecido [3,4]. No Brasil, o uso de antioxidantes sintéticos é controlado pelo Ministério da Saúde [5] que limita em 200 mg/kg para BHA referente ao percentual de gordura contida no alimento, como concentrações máximas permitidas.

Eletrodos de carbono têm sido explorados há vários anos em química eletroanalítica. A utilização de modificadores químicos aumenta a eficiência eletrocatalítica, assim como diminui o potencial aplicado em comparação com os eletrodos de pasta de carbono convencionais [6].

O comportamento eletroquímico de BHA no eletrodo composto de carbono modificado com fosfato de cobre imobilizado em resina poliéster (ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$) foi estudado usando-se as técnicas de voltametria cíclica (CV) e onda quadrada, SWV (Square-Wave Voltammetry). A primeira foi empregada para elucidar as reações eletródicas e a segunda foi empregada por proporcionar limites de detecção (LD) mais favoráveis. O ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ apresentou janela de potencial em meio aquoso e não aquoso entre $-1,0$ e $1,2 \text{ V vs. Ag/AgCl (KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1})$, sendo estudada a janela de potenciais entre $0,1$ a $0,8 \text{ V}$ para o BHA.

Para a elaboração deste trabalho foram estudados: (1) a composição do eletrodo; (2) concentração e pH do eletrólito suporte; (3) parâmetros instrumentais das técnicas eletroquímicas e (4) solubilidade da amostra em diversas soluções.

Neste trabalho é proposta a preparação e aplicação de um ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ para a determinação de BHA em amostras de alimentos (maioneses) por voltametria de onda quadrada (SWV), como um método alternativo simples, preciso, exato e rápido.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As soluções de referência e das amostras utilizadas foram preparadas no dia da análise para evitar processos de hidrólise e/ou oxidação. O eletrólito suporte utilizado para todas as determinações de BHA foi o nitrato de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 10% v/v de etanol (pH condicional 6,7). A solução estoque de BHA foi preparada em eletrólito suporte, após estudo de solubilidade (Tabela 1), sendo as soluções de referência obtidas por diluição da solução estoque em eletrólito suporte.

As amostras de maionese (2g) foram submetida à extração com solvente (5 mL de etanol) em banho ultrassônico (Aqua Wave 9374-Brnstead/Lab-Line) à temperatura ambiente por 15 min e depois centrifugada por 10 min a 3000 rpm. Este procedimento foi repetido duas vezes. O sobrenadante foi coletado em balão volumétrico de 10 mL e seu volume foi completado com etanol. Uma alíquota de 500 μL da solução foi transferida para a cela eletroquímica contendo 5 mL de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ considerando a proporção de 10% v/v de etanol.

O $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ foi imobilizado em resina poliéster (Resapol T-208) de acordo com o método proposto por Pereira & Fatibello-Filho [7]. O modificador químico, $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$, foi misturado manualmente por 30 minutos em um almofariz de ágata com pó de grafite (Fischer Chemical Grade #38) na proporção 20/40% m/m. Esta mistura foi adicionada a 0,20 g (20% m/m) de parafina (Labsynth) fundida a 60°C , antes que a mistura enrijecesse, esta foi inserida na cavidade de uma seringa para insulina contendo uma haste de cobre para fazer o contato elétrico.

Todos os experimentos de CV e SWV foram realizados com o auxílio de um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT12 (Eco Chemie) acoplado a um microcomputador gerenciado pelo software GPES 4.9, em célula eletroquímica de compartimento único com três eletrodos. O eletrodo de trabalho utilizado foi um ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ com área superficial de 8 mm^2 ; o eletrodo de referência utilizado foi um de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e o eletrodo auxiliar foi um eletrodo de placa de platina com área superficial de 20 mm^2 .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi realizado um estudo sistemático para definir os melhores parâmetros para a determinação de BHA em amostras de alimentos. O estudo do eletrólito suporte foi realizado por voltametria cíclica. Neste, as soluções de cloreto de sódio (NaCl); cloreto de potássio (KCl); nitrato de sódio (NaNO_3), nitrato de potássio (KNO_3), tampão fosfato foram investigadas no intervalo de concentração de 0,01 a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, sendo KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}/10\%$ etanol (v/v) selecionado para todas as determinações, os parâmetros de SWV otimizados foram: amplitude 60 mV, frequência de 80 mV s^{-1} e incremento de varredura de 5 mV.

O perfil voltamétrico para BHA obtido por voltametria cíclica indica se tratar de um sistema irreversível devido à ausência de um pico catódico no sentido inverso de varredura e há um deslocamento para potenciais mais positivos com o aumento da velocidade de varredura. Ademais, o efeito da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica de BHA na superfície do eletrodo foi estudado e sugere que o processo de oxidação de BHA na superfície do eletrodo foi controlado por difusão.

A curva analítica foi construída a partir de soluções padrões de BHA no intervalo linear de concentrações de $3,4 \times 10^{-7}$ a $4,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e equação: $I_{pa}/A = 2,41 \times 10^{-6} + 0,83 [\text{BHA} (\text{mol L}^{-1})]$ ($r = 0,9989$), com LD igual a $5,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e RSD menor do que 0,2 %. O desvio padrão relativo calculado para os estudos de repetibilidade inter e intra dias foram 0,86% e 2,79 %, respectivamente.

A Figura 1 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos na construção da curva analítica para BHA no intervalo de concentração estudado.

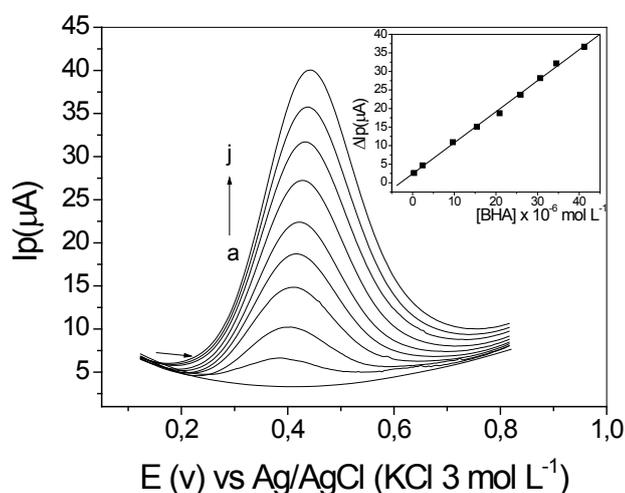


Figura 1 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos com eletrodo composto carbono modificado com $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ em varias concentrações de BHA: (a) eletrólito suporte; (b) $3,4 \times 10^{-7}$; (c) $2,4 \times 10^{-6}$; (d) $9,6 \times 10^{-6}$; (e) $1,5 \times 10^{-5}$; (f) $2,1 \times 10^{-5}$; (g) $2,6 \times 10^{-5}$; (h) $3,1 \times 10^{-5}$; (i) $3,5 \times 10^{-5}$; (j) $4,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; eletrólito suporte: KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}/10\%$ etanol (v/v) (pH 6,7); $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 60 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$). Em detalhe a curva analítica obtida.

Foram avaliadas algumas substâncias presentes em amostras de maionese que podem interferir na determinação de BHA. As substâncias avaliadas foram: ácido cítrico, EDTA, benzoato de sódio, amido, sorbato de potássio e lactose em solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}/10\%$ etanol (v/v) (pH condicional 6,7) na mesma concentração (1:1 interferente: analito) e dez vezes maior (10:1 interferente: analito) sendo a concentração de BHA $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Nenhuma substância investigada apresentou interferência na determinação de BHA em maionese. Também foi realizado o estudo de adição e recuperação de padrão. As recuperações variaram entre 95,8% e 104%. Estes valores obtidos indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de BHA pelo procedimento analítico proposto.

Os teores de BHA determinados em maionese empregando CLAE (método comparativo) e o método proposto foram concordantes a um nível de confiança de 95% e são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Determinação de BHA em maionese por CLAE e pelo método proposto.

Amostras	BHA (mg/100g)		
	CLAE	SWV	E, %
A	2,40 ± 0,05	2,55 ± 0,09	+6,25
B	5,96 ± 0,06	6,10 ± 0,05	+2,35
C	1,60 ± 0,04	1,64 ± 0,09	+2,50

n = 3; nível de confiança de 95%

CONCLUSÕES

O método proposto para a determinação de BHA em amostras de alimentos (maionese) usando um eletrodo compósito de carbono modificado com fosfato de cobre imobilizado em resina poliéster mostrou-se eficiente, de fácil execução, preciso e exato. Ademais, destaca-se o baixo custo do método comparado a outros métodos empregado para determinação de BHA em amostras de alimentos tais como os métodos cromatográficos que são os mais empregados.

AGRADECIMENTOS: FAPESP, CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] FDA – U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health & Human Services Internet site address: www.fda.gov, acessado em 06/05/2011.
- [2] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde Internet site address: WWW.avisa.gov.br, acessado em 06/05/2011.
- [3] Botterweck, A.A.M.; Verhagen, H.; Goldbohm, R.A.; Kleinjans, J. & Van Den Brandt, P.A. “Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the Netherlands cohort study”. *Food Chem. Toxicol.* **38**(7): 599, 2000.
- [4] Cruces-Blanco, C.; Carretero, A.S.; Boyle, E.M. & Gutierrez, A.F. “The use of dansyl chloride in the spectrofluorimetric determination of the synthetic antioxidant butylated hydroxyanisole in foodstuffs”. *Talanta.* **50**(5): 1099, 1999.
- [5] MS, ministério da Saúde. *Resolução, nº 04 de 24 de novembro de 1988. Aditivos Intencionais - Ministério da Saúde.* Brasília, Resolução, nº 04 de 24 de novembro de 1988.
- [6] Freitas, K.H.G.; Fatibello-Filho, O. Simultaneous determination of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in food samples using a carbon composite electrode modified with $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ immobilized in polyester resin *Talanta* 81 (2010) 1102–1108.
- [7] Pereira, A.V. & Fatibello-Filho, O. “Flow injection spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in pharmaceutical formulations with on-line solid-phase reactor containing copper (II) phosphate”. *Anal. Chim. Acta.* **366**(1-3): 55, 1998.

OXIDACIÓN ELECTROQUÍMICA DE SULFITO EN DISOLUCIÓN ACUOSA MEDIADA POR ELECTRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO CON POLI- TETRATIENIL PORFIRINA Co(II).

Jorge H. Vélez¹, María Jesús Aguirre¹, María Angélica del Valle^{2*},

¹Universidad de Santiago de Chile, Facultad de Química y Biología, Av. B. O'Higgins 3363, Santiago, Chile; ²Laboratorio de Electroquímica de Polímeros, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile, Vicuña Mackenna 4860, Santiago de Chile. jorge.velez@usah.cl

RESUMEN: El sulfito, anhídrido sulfuroso, o dióxido de azufre, es sin lugar a dudas, el aditivo más ampliamente usado como conservante de los alimentos, en vinificación y también el más indispensable a nivel industrial, debido a sus propiedades antioxidantes, antioxidásicas y antimicrobianas. Por otro lado, altos niveles de este compuesto produce efectos tóxicos [1], por ejemplo, la presencia de sulfito en agua natural causa una reducción en la concentración de oxígeno, además de un cambio de las características organolépticas del alimento y de las bebidas, cuando este compuesto se utiliza en las altas concentraciones, problema de gran importancia en la industria del vino [2, 3]. Teniendo en cuenta todo lo anterior y, debido a que los límites de su uso son establecidos por la legislación en la mayoría de los países, la determinación de la concentración del ión de sulfito en el ambiente, el alimento y el otro material es de gran interés. Es por esto que el desarrollo de técnicas electroquímicas ha adquirido gran importancia y relevancia, sobre todo en la fabricación de sensores electroquímicos, los cuales tienen gran ventaja como su rápida respuesta, relativamente alta especificidad y bajo costo [1,2].

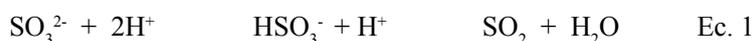
Palabras Claves: Oxidación de sulfito, oxidación electrocatalítica, porfirinas.

INTRODUCCIÓN:

El sulfito, anhídrido sulfuroso, o dióxido de azufre, es sin lugar a dudas el aditivo más ampliamente usado como conservante de los alimentos en vinificación y también el más indispensable a nivel industrial, debido a sus propiedades antioxidantes, antioxidásicas y antimicrobianas. Por otro lado, altos niveles de este compuesto produce efectos tóxicos [1], por ejemplo, la presencia de sulfito en agua natural causa una reducción en la concentración de oxígeno, que puede tener un efecto perjudicial en la vida acuática y se ha encontrado que los niveles de este compuesto pueden producir reacciones adversas en los pacientes con asma [2], además de un cambio de las características organolépticas del alimento y de las bebidas, cuando este compuesto se utiliza en altas concentraciones, problema de gran importancia en la industria del vino [3, 4]. Teniendo en cuenta todo lo anterior y debido a que los límites de su uso son establecidos por la legislación en la mayoría de los países, la determinación de la concentración del ión de sulfito en el ambiente, el alimento y el otro material es de gran importancia.

Se han desarrollado varios métodos para la determinación del ión de sulfito, entre los que se incluyen la amperimetría, la espectrofotometría, así como métodos electroquímicos y técnicas enzimáticas. También se han empleado los métodos de inyección en flujo quimio-luminescentes (FIA-CL). La reducción electroquímica de disoluciones acuosas de sulfito ha sido el tema de numerosas investigaciones que datan de los años 30 y se ha estudiado una gran variedad de materiales del electrodo, incluyendo mercurio, oro, platino, bismuto, cobre, grafito modificado con ftalcianina de hierro.

Por su parte, las técnicas electroquímicas proporcionan resultados plausibles en condiciones de laboratorio. En electroanálisis, los electrodos modificados ofrecen en la actualidad un potencial capaz de satisfacer los requisitos de un sensor que sea rápido y exacto. Los métodos de preparación de estos electrodos incluyen las capas monomoleculares fijadas por adsorción y electropolimerización, entre otros. Una modificación eficiente de la superficie del electrodo requiere una especie electroactiva como las porfirinas, capaces de formar complejos estables con una variedad grande de metales. La presencia de un metal de transición coordinado en el anillo porfirínico (metaloporfirinas) favorece las características catalíticas y electro-catalíticas de la misma, donde los grupos periféricos pueden también ser utilizados para controlar la interacción. Ahora, para que los resultados electro-analíticos sean confiables y acertados es de vital importancia tener completamente claros los aspectos mecánicos del proceso electro-químico y ese ha sido el foco de muchas anteriores investigaciones. Se sabe que el anión sulfito (SO_3^{2-}) en disolución acuosa establece un equilibrio entre las distintas formas moleculares de esta especie, bisulfito (HSO_3^-) y con dióxido de azufre (SO_2) Ec. 1. Una parte reacciona con compuestos que presentan grupos carbonilo y se llama bisulfito enlazado, la otra parte se llama SO_2 libre, en donde sus respectivas concentraciones dependerán principalmente del pH [23].



PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Síntesis de la meso-tetrakis (2-tienil)porfirina H_2TTP

El monómero fue sintetizado de acuerdo a lo descrito en la literatura, *Método de Adler* (Esquema 1) [24].

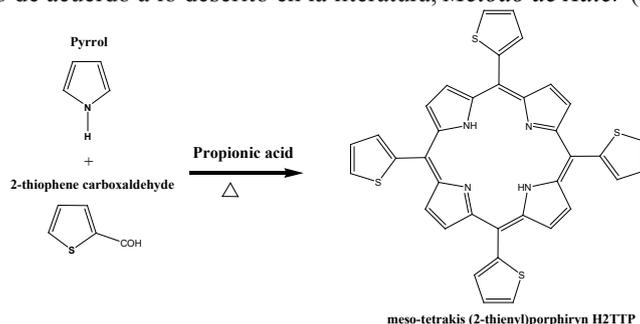


Figura 1: Síntesis de la meso-tetrakis (2-tienil)porfirina H_2TTP , método de Adler

2-tiofencarboxialdehído (1,9 mL, $2,1 \times 10^{-2}$ mol) y pirrol (1,5 mL, $2,1 \times 10^{-2}$ mol) en 150 mL de ácido propiónico fue calentado a reflujo. Sobre el curso de 30 min la formación de un precipitado negro fue observada. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se agrega metanol, dejando enfriar en un baño de hielo a 0°C por 15min, para luego filtrar. El filtrado es lavado con agua destilada y metanol, secado y posteriormente purificado por columna cromatográfica (sílica/ CH_2Cl_2). Un precipitado sólido y cristalino de color púrpura fue obtenido, con un rendimiento de 21%.

Procedimiento para la preparación del electrodo modificado

La electropolimerización de Co(II)TTP fue realizada a partir de disoluciones 0,001 M del complejo $[\text{Co(II)TTP}]$ y 0,1M de perclorato de tetrabutilamonio (TBAP) como electrólito de soporte en diclorometano (CH_2Cl_2), *Figura 2*. El aumento en la corriente de la oxidación observada en barridos sucesivos es atribuido al *doping*, que ocurre simultáneamente con el crecimiento de la película. Además, se observa una disminución del potencial de oxidación, que se ha atribuido al alargamiento de las cadenas del oligómero que disminuye su potencial oxidante debido a un aumento en la conjugación, lo que también da cuenta de la formación del depósito sobre el electrodo de carbón vítreo.

Los límites catódico y anódico de potencial fueron 0,0 y 1,5 V respectivamente, el potencial límite catódico seleccionado representa el sobre-potencial necesario para producir la oxidación del monómero y la subsecuente polimerización sin alterar el perfil voltamétrico. El aumento gradual de la corriente sobre 1,3 V representa el proceso de la oxidación de los grupos de tienil y el incremento en su valor indica que cierta cantidad de pCoTTP ha sido depositada en el electrodo.

En cuanto al comportamiento de transferencia del tiofeno para la electro-polimerización y de las polimerizaciones electroquímicas relacionadas como en el Co(II)TTP , su polimerización muy probablemente ocurriría en sus grupos meso-tienil, sobretodo su posición 5. Por su parte, el pico de la oxidación en el intervalo de 0,90-1,05 V se puede asignar a la oxidación de anillo de la porfirina .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El electrodo químicamente modificado GC/pCo(II)TTP ha demostrado su capacidad catalítica, donde la oxidación del sulfito se ve facilitada y catalizada por la presencia del macrociclo en la superficie del electrodo, proveyendo a éste de un sitio alternativo de reacción para los procesos de transferencia electrónica del sulfito.

Debido a que el comportamiento de las porfirinas depende en gran medida del pH, además de ser un factor importante en el equilibrio que presenta el sulfito con las diferentes formas moleculares [6], se determinó el pH 7,0 como el óptimo para la determinación del analito. El electrodo de GC/poly TTP(CoII) reconoce el analito sulfito por medio de una respuesta electro-química e interpreta la concentración de éste como una señal eléctrica. El gráfico de corriente de pico I_p vs concentración, muestra un intervalo lineal entre $1,0 \times 10^{-7}$ y $5,0 \times 10^{-3}$. Para concentraciones superiores a este valor, dicha linealidad como es de esperar, se pierde para soluciones relativamente concentradas (ver *figura 2*).

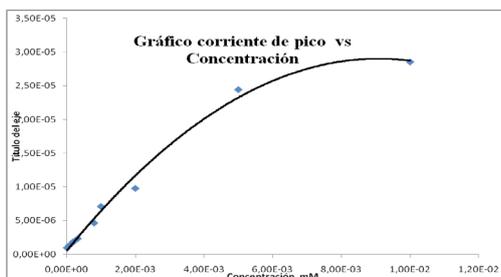


Figura 2: Determinación de sulfito a diferentes concentraciones

Para determinar este margen de linealidad se preparon disoluciones de difentes concentraciones de sulfito de sodio en presencia de perclorato de sodio como electrólito de soporte en una concentración aproximadamente 100 veces la del analito y se ajustó el pH a 7,0 adicionando pequeñas cantidades de hidróxido de sodio y ácido clorhídrico diluido, según fuera la necesidad y según lo discutido previamente en este documento y se realizó un barrido de potencial en condiciones previamente establecidas.

El gráfico de linealidad se realizó con los valores potencial de pico I_p (0,94 mV) de las respuestas voltamétricas del electrodo modificado *versus* concentración del analito, donde se encontró una muy buena linealidad en la respuesta (ver figuras 2) y, por consiguiente, se propone para su uso como sensor amperométrico.

CONCLUSIONES:

El electrodo modificado presento además de una preparación sencilla, una gran estabilidad en el tiempo, pudiéndose reproducir mediciones tres semanas posteriores a la preparación del mismo.

El gráfico de linealidad se realizó con los valores potencial de pico I_p (0,94 mV) de las respuestas voltamétricas del electrodo modificado *versus* concentración del analito, donde se encontró una muy buena linealidad en la respuesta, por lo que se propone para su uso como sensor amperométrico.

AGRADECIMENTOS: SE agradece el financiamiento otorgado por Fondecyt 3100066.

REFERENCIAS

- [1] Streeter I., Wain A. J., Davis J., and Compton R. G.. *J. Phys. Chem. B*, (109), 18500-18506, **2005**
- [2] Schwartz H., Allergy J. Clin. Immunol. 71, 487. **1983**
- [3] Montenegro M., Araujo A., Couto C., Lima J., *J. Agric. Food Chem.*, (46), 168. **1998**
- [4] Agnes L., Azevedo C., Araki K., Toma H., *Anal. Chim. Acta* (387), 175. **1999**
- [5] Casella I. G., Marchese R., *Anal. Chim. Acta*, (311), 199. **1995**
- [6] Benov V. P., Atanasov B. P., *Anal. Lett.* (26), 2061. **1993**

BIOSSENSOR A BASE DE LACASE IMOBILIZADA SOBRE NANOTUBO DE CARBONO OXIDADO MODIFICADO COM AZUL DE MELDOLA PARA A DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Arnaldo César Pereira^{1,2}(PQ), Cesar Ricardo Teixeira Tarley³, Nelson Durán² (PQ) e Lauro Tatsuo Kubota² (PQ)

¹DCNAT/Universidade Federal de São João Del Rei, São João del Rei – MG, ²Instituto de Química / UNICAMP; Campinas – SP, ³Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Departamento de Química arnaldocsp@yahoo.com.br

RESUMO: Neste trabalho desenvolveu-se um biossensor para a detecção de compostos fenólicos baseado em nanotubo de carbono multi parede oxidado (MWCToxi) contendo Azul de Meldola imobilizado e enzima lacase. As variáveis que exercem influência no desempenho deste, incluindo: o processo de imobilização e a quantidade da enzima, pH e potencial de trabalho foram investigados. A resposta amperométrica para catecol usando o biossensor proposto apresentou amplo intervalo de resposta linear (1 a 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$), boa sensibilidade (57,1 $\mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{mol L}$), excelente estabilidade operacional (após 200 determinações a resposta mantém 97 % da resposta inicial) e muito boa estabilidade de estocagem. Estes resultados foram comparados com lacase imobilizada sobre nanotubo de carbono puro (MWCT), realçando as excelentes características do MWCToxi. De acordo com estas características, é possível afirmar que o biossensor desenvolvido é promissor para a detecção de fenóis devido a sua boa resposta eletroquímica e estabilização da enzima.

Palavras-chave: Biossensor amperométrico, nanotubo de carbono multiparede oxidado, lacase, Azul de Meldola e compostos fenólicos.

INTRODUÇÃO

Devido aos riscos para a saúde e para o meio ambiente causados pela exposição aos compostos fenólicos tóxicos, existe um consenso universal a respeito da necessidade de monitoramento contínuo destes contaminantes nos cursos de águas naturais e nos inúmeros efluentes industriais descarregados nestes recursos hídricos [1]. O tempo e o custo envolvidos com a detecção de poluentes ambientais (por exemplo, aquisição e preparação da amostra, análise de laboratório) têm imposto limitações quanto ao número de amostras que podem ser analisadas para um determinado projeto de monitoramento ambiental [1]. O aumento da quantidade de dados analíticos (maior número de informações a cerca de um determinado processo) tende a melhorar a eficiência na caracterização dos compostos poluentes “*in situ*” e caracterizar melhor os riscos ou ainda a eficiência dos procedimentos de descontaminação. A limitação no número das análises tem criado uma demanda por tecnologias analíticas em um menor tempo e com custos mais acessíveis.

A determinação de compostos fenólicos é efetuada principalmente por meio de técnicas espectrofotométricas e cromatográficas (incluindo as modalidades de cromatografia líquida de alta eficiência e gasosa). No entanto, a versatilidade das técnicas eletroquímicas e os menores limites de detecção comumente obtidos em relação às espectrométricas, bem como seus baixos custos de aquisição quando comparados às técnicas cromatográficas fazem com que sejam amplamente aplicadas na determinação de compostos fenólicos. Assim, devido as suas características únicas, tais como: seletividade; relativo baixo custo de construção e estocagem; potencial para miniaturização; facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para uma análise rápida de monitoramento “on line”, os sensores eletroquímicos representam uma ferramenta promissora para complementar as técnicas existentes. Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias visando melhorar ainda mais o desempenho das técnicas eletroquímicas se mostra promissor. Em especial, nos últimos anos muita atenção vem sendo dada ao emprego de materiais nanoestruturados para o desenvolvimento de biossensores amperométricos, tais como nanotubos de carbono [2]. O uso de NTCs é relevante devido ao seu caráter metálico, tornando possível a melhora na transferência de electrons entre as enzimas e as superfícies dos eletrodos, trabalhando neste caso como mediadores de elétrons e suporte para a imobilização da enzima.

Visando obter um novo biossensor para a detecção de compostos fenólicos, este trabalho ilustra a oxidação de MWCT e a imobilização do corante orgânico Azul de Meldola. Posteriormente, procede-se à imobilização de lacase sobre as paredes dos nanotubos de carbono, visando aumentar a estabilidade e seletividade dos biossensores desenvolvidos.

Parte Experimental

A preparação dos nanotubos de carbono carboxilados ocorreu através da adaptação do método publicado na literatura [3]. Assim, o nanotubo de carbono foi refluxado com solução de HNO_3 3 mol L^{-1} a 120°C por 2 horas. O nanotubo de carbono carboxilado foi filtrado e lavado com água deionizada até que o pH do filtrado tornou-se praticamente neutro. Após esta etapa, o material foi seco a 80°C. O material obtido foi denominado como MWCToxi.

Adsorção do Azul de Meldola na matriz de MWCT_{oxi}

Para a adsorção do Azul de Meldola na superfície da matriz de MWCT oxidado e não oxidado, 200 mg deste material foram adicionados a 20 mL de uma solução $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ de Azul de Meldola, permanecendo em contato durante 3 horas sob agitação. Após este período o material foi lavado com água destilada e seco a temperatura ambiente, o produto final desta reação foi denominado de MWCT-AM ou MWCT_{oxi}-AM.

Medidas Eletroquímicas, Construção do Biossensor e Imobilização da Enzima

As medidas eletroquímicas foram realizadas num potenciostato modelo PGSTAT30 da Pensalab com o emprego de uma célula eletroquímica de 3 eletrodos. O eletrodo saturado de calomelano foi empregado como referência, e uma espiral de platina como o eletrodo auxiliar.

O eletrodo de trabalho utilizado foi construído no próprio laboratório. Este dispositivo é basicamente um tubo de vidro de 15 cm de comprimento contendo uma cavidade inferior com 4 mm de diâmetro interno e 1 mm de profundidade. A enzima lacase foi imobilizada na superfície do MWCToxi-AM empregando-se 10 mg da matriz de nanotubo, e 100 µL de solução aquosa contendo 1 mg de lacase. Esta mistura foi agitada mecanicamente por 30 minutos e seca em geladeira. Posteriormente adicionou-se 1 mg de grafite em pó e 30 µL de óleo mineral misturando bem até completa homogeneização da pasta. Esta pasta foi introduzida na cavidade inferior do tubo de vidro descrito acima, obtendo o eletrodo de pasta de nanotubo de carbono oxidado modificado com lacase, a qual foi denominado de MWCT_{oxi}-AM/lacase.

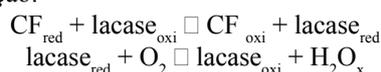
De modo a avaliar o melhor desempenho obtido com o emprego de MWCToxi-AM na preparação do biossensor, uma pasta contendo apenas MWCT ou MWCT-AM como material carbonáceo foi preparada. Estas pastas foram preparadas da mesma forma como descrita para o biossensor a base de MWCToxi.

1.

2. Resultados e Discussão

Mecanismo do biossensor contendo Lacase

Na natureza, a enzima lacase na forma nativa (oxidada) quando reage com um composto fenólico na forma reduzida apresenta o seguinte mecanismo de atuação:

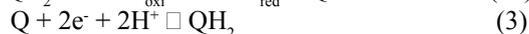
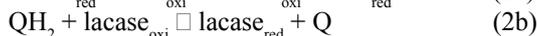
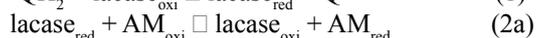
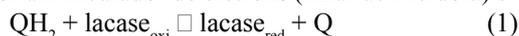


onde x pode ser 1 formando água, ou 2, formando peróxido de hidrogênio. Alguns estudos ainda são necessários para a completa elucidação deste mecanismo.

Este mecanismo ilustra que a enzima oxidada reage com o composto fenólico e é regenerada pelo oxigênio, então, seguindo esta proposta, nós imobilizamos a enzima lacase sobre a superfície do nanotubo de carbono oxidado e fizemos as medidas amperométricas para catecol em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 na presença de oxigênio.

A partir do amperograma obtido, foi possível observar que após algumas medidas, o sinal (corrente elétrica) sofria uma perda muito significativa de intensidade e este comportamento pode ser atribuído à dificuldade experimental encontrada na manutenção da concentração de oxigênio dentro da cela eletroquímica.

Assim, a partir de estudos já realizados na literatura a cerca do comportamento da enzima lacase no desenvolvimento de biossensores para compostos fenólicos, nós propusemos neste trabalho, a substituição do oxigênio molecular, na etapa de regeneração da enzima, por um mediador de elétrons (Azul de Meldola) e o mecanismo proposto é o seguinte:



Na equação (1) a lacase é reduzida pelo composto fenólico e após esta, ocorrem simultaneamente as etapas 2a e 2b, sendo que na equação 2a a enzima reduzida é regenerada pelo mediador de elétrons ao seu estado nativo (oxidada), a qual reage prontamente com outra molécula reduzida de um composto fenólico (QH₂). A molécula oxidada de composto fenólico (Q) é então eletroquimicamente reduzida onde o mecanismo da reação proposto é apresentado na equação 3.

Otimização da Preparação do Biossensor

A Figura 1 mostra os efeitos da matriz de imobilização (MWCT, MWCT-AM e MWCToxi-AM) sobre a resposta amperométrica do biossensor para catecol empregando a enzima lacase. Estas medidas ocorreram em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. A curva analítica obtida empregando o eletrodo com pasta de nanotubo puro contendo lacase apresentou a sensibilidade mais baixa quando um potencial de -50 mV foi aplicado em relação a um eletrodo de calomelano saturado. Entretanto, eletrodos baseados em MWCT-AM/EDC/lacase e MWCToxi-AM/EDC/lacase, no qual a enzima foi ligada ao suporte por ligação peptídica empregando EDC como agente acoplador, um considerável aumento na sensibilidade foi observada, sendo maior quando o biossensor foi desenvolvido com MWCToxi-AM

Estes resultados indicam que o procedimento experimental proposto para a oxidação de MWCT é viável e este aumento da quantidade de grupos (-COOH), causa um aumento no número de sítios livres sobre a matriz de NTC para a imobilização de enzima, os quais são ativados pelo EDC.

Estes dados confirmam a eficiência do método de imobilização enzimática, o qual atua na melhoria da transferência de elétrons na superfície do eletrodo e também do mediador de elétrons em substituição ao oxigênio, o qual permite a obtenção de um amperograma melhor definido, uma vez que neste caso a concentração de mediador na cela eletroquímica (imobilizado sobre a matriz de nanotubo de carbono oxidado) é constante, e com excelente sensibilidade

devido ao aumento da quantidade de grupos (-COOH), causando um aumento no número de sítios livres sobre a matriz de nanotubo de carbono para o processo de imobilização da lacase, os quais são ativados pelo EDC.

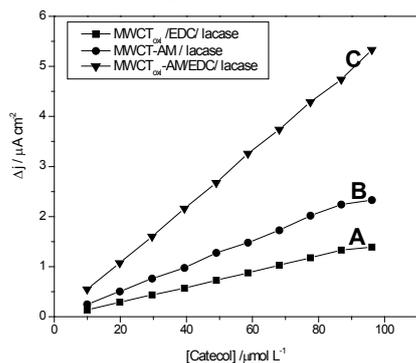


Figura 1. Curvas analíticas para catecol obtidas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 e potencial aplicado de -50 mV vs SCE, sendo (A) MWCT_{oxi}/EDC/lacase, (B) MWCT-AM/lacase e (C) MWCT_{oxi}-AM/EDC/lacase.

Outro ponto importante no desenvolvimento de um biossensor é o conhecimento da melhor quantidade de enzima a ser utilizada. Foram preparadas várias pastas de NTC com quantidades de lacase no intervalo de 12 a 100 U de enzima por mg de pasta de NTC e a melhor sensibilidade foi obtida com 60 U mg⁻¹. Outros parâmetros estudados foram: efeito da quantidade de EDC, estudo de pH, efeito tampão e potencial aplicado.

O biossensor proposto apresentou uma sensibilidade excelente em um amplo intervalo de resposta (1 a 150 μmol L⁻¹), a qual foi ajustada pela equação: $\Delta j \text{ (nA cm}^{-2}\text{)} = 0,7 (\pm 0,2) + 57,1 (\pm 0,4) [\text{catecol}] \text{ (}\mu\text{mol L}^{-1}\text{)}$, $r = 0,9998$ para $n = 17$, limite de detecção em torno de $4,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e limite de quantificação de $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ considerando $10\sigma_B/\text{slope}$. Além disso, o biossensor mostrou uma excelente repetibilidade, com um desvio padrão relativo de 1,8 % para uma série de 7 medidas sucessivas de solução de catecol 80 μmol L⁻¹. Este biossensor era muito estável, permitindo cerca de 200 determinações de catecol sem mudança significativa da resposta. O tempo de resposta é muito curto, atingindo 95 % de sua resposta máxima em 0,6 s. Em comparação com outros biossensores reportados na literatura, o sensor desenvolvido neste trabalho exibe melhor performance e tempo de vida maior. A Tabela 1 ilustra o efeito de diferentes substratos fenólicos empregando o biossensor desenvolvido, nas seguintes condições experimentais: $E_{\text{ap}} = -50 \text{ mV vs SCE}$, solução tampão fosfato 0.1 mol L⁻¹ pH = 6.5.. A melhor resposta foi obtida para catecol seguida por hidroquinona e fenol. Estes resultados indicam que apesar deste dispositivo responder para vários compostos fenólicos, verificou-se um aumento na seletividade destes compostos em relação a outros trabalhos reportados na literatura.

Tabela 1. Resposta relativa empregando o biossensor MWCT_{oxi}-AM/EDC/lacase obtida para diferentes substratos fenólicos.

Analito	Resposta Relativa (%)
Catecol	100
Hidroquinona	94
Guaiacol	83
p-cresol	47
Resorcinol	38
Fenol	26
4-cloro-3-metilfenol	22

CONCLUSÃO

O material MWCToxi-AM/EDC/lacase foi avaliado para o desenvolvimento de um biossensor amperométrico estável, sensível e reprodutível visando a determinação de compostos fenólicos para uso prático. Uma excelente sensibilidade, 57,1 μA cm⁻² μmol⁻¹ L, para a detecção de catecol foi observada e pode ser atribuída a amplificação de sinal promovida pela eficiente imobilização da enzima por ligação covalente com grupos carboxílicos via EDC. Resposta relativa empregando o biossensor MWCT_{oxi}-AM/EDC/lacase obtida para diferentes substratos fenólicos, a qual pode diminuir a probabilidade da transferência eletrônica direta entre a HRP e a superfície da eletrodo devido a grande quantidade de proteína imobilizada. Finalmente estes resultados sugerem a viabilidade da utilização do dispositivo desenvolvido como suporte para a detecção de fenóis de forma muito simples.

AGRADECIMENTOS

FAPESP (Proc nº 06/59785-3), FAPEMIG, CAPES, CNPq

REFERÊNCIAS

- [1] Stuart, EJE; Pumera, M, *J. Phys. Chem. C* (2011) 115 5530.
- [2] Liu XG, Peng YH, Qu XJ, Ai SY, Han RX, Zhu XB, *J Electroanal. Chem.* (2011), 654, 72.
- [3] Lee, Y-M; Kwon, O-Y; Yoon, Y-J; Ryu, K. *Biotechnol. Lett* (2006), 28, 39.

BIOSSENSOR UTILIZANDO FILMES LbL COM NANOPARTÍCULAS DE PLATINA PARA DETECÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Monalisa dos Santos¹, Vagner dos Santos¹, Andressa Galli¹, Sergio T. Fujiwara², Jarem Raul Garcia¹, Cliciane G. de Jesus¹, Valtecir Zucolotto³, Christiana A. Pessoa¹, Karen Wohnrath¹

¹ Departamento de Química - Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Ponta Grossa - PR - Brasil; ² Departamento de Química - Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, Guarapuava - PR - Brasil; ³ Instituto de Física de São Carlos - USP, Brasil.

monaquimica@hotmail.com

RESUMO: O presente trabalho descreve a imobilização da enzima glicose oxidase (GOX) na superfície de eletrodos modificados. A modificação destes foi realizada a partir da técnica de preparação de filmes LbL (do inglês *Layer by Layer*). Para isto, utilizou-se o híbrido (Pt-SiPy⁺Cl⁻) contendo nanopartículas de platina (NpPt) na matriz polimérica SiPy⁺Cl⁻ (cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano) como polycation alternado com o poliânion poli-p-fenilenovinileno sulfonado (PPV) na deposição sobre óxido de estanho dopado com flúor (FTO). Os filmes LbLs foram aplicados como sensores voltamétricos e amperométricos de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Diferentes arquiteturas de filmes foram testadas por voltametria cíclica e pulso diferencial revelando o filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ com as melhores respostas para detecção de H₂O₂. Neste filme, foi imobilizada a enzima glicose oxidase (GOX) obtendo-se a arquitetura (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ GOX. Este foi usado como biossensor amperométrico de glicose em tampão fosfato salino (PBS) pH = 7.

INTRODUÇÃO

A versatilidade da técnica LbL (do inglês *Layer by Layer*), permite que materiais de diversas classes sejam imobilizados na superfície de substratos distintos, como exemplo a sílica, vidro, vidro recoberto por óxidos (FTO - óxido de estanho dopado com flúor, ITO - óxido de estanho dopado com índio), e quartzo. Se o substrato for condutor, a deposição dos filmes LbLs pode fornecer eletrodos seletivos a determinados analitos. Dentre estes, destaca-se o peróxido de hidrogênio[1], pois como é produzido em reações enzimáticas de oxidases, quando imobilizados proporciona biossensores enzimáticos muito vantajosos devido às enzimas interagirem com um substrato específico promovendo a amplificação da resposta durante a transdução do sinal.

Exemplos de biossensores para detecção de glicose através de medidas espectroscópicas ou eletroquímicas são os filmes automontados contendo glicose oxidase (GOX)[2]. O processo é reversível, de maneira que os eletrodos contendo as enzimas podem ser utilizados mais de uma vez. Com a oxidação da glicose pela enzima GOX, a polarização do eletrodo pode gerar uma corrente devido à oxidação do peróxido de hidrogênio e o sinal amperométrico produzido é diretamente proporcional à concentração de glicose presente na amostra a ser analisada. Baseado nos resultados da literatura o presente trabalho destaca a utilização do filme LbL contendo o nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻, obtido pela incorporação de nanopartículas de platina nas cavidades do polímero cloreto de 3-n-propilpiridíniosilsesquioxano alternado com poli-p-fenilenovinileno sulfonado (PPV) como sensores amperométrico de glicose em tampão PBS (pH = 7).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os filmes LbL do nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ foram construídos pela imersão alternada do substrato de FTO por 3 minutos nas soluções de Pt-SiPy⁺Cl⁻ 2 mmol L⁻¹ e PPV 2,5 g L⁻¹, e por 10 segundos na solução de lavagem. Os valores de pH das soluções foram de 2,9 e 5,5 para Pt-SiPy⁺Cl⁻ e PPV, respectivamente. Foram produzidos filmes com as seguintes arquiteturas: Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV e PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻. Para caracterização das soluções dos polieletrólitos e do monitoramento do crescimento dos filmes depositados em substratos de FTO, foram realizadas medidas de espectroscopia na região do UV-vis em um espectrofotômetro Cary 50 Bio. As medidas de UV-Vis foram realizadas para os filmes PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻ e Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV, monitorando-se a absorbância das bandas do PPV referentes à transição dos elétrons π de conjugação em função do número de bicamadas. Com o objetivo de analisar morfológicamente a superfície dos filmes foram realizadas imagens de AFM obtidas no equipamento Shimadzu SPM - 9600 (*modo de contato*).

Voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial foram obtidos em filmes LbL contendo diferentes números de bicamadas de PPV/ Pt-SiPy⁺Cl⁻ e Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV depositadas sobre substrato FTO. As medidas amperométricas foram realizadas em um potenciostato μ-autolab tipo III (autolab/Ecochemie) utilizando solução de tampão PBS 0,1 mol . L⁻¹ em pH 7 como eletrólito suporte. Utilizou-se como referência o eletrodo normal de hidrogênio e como auxiliar uma placa de Pt (0,6 cm²). Os voltamogramas foram obtidos com velocidade de varredura de 50 mV.s⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) possibilitou o monitoramento do crescimento dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n a partir do aumento de absorbância das bandas características do PPV (295 nm, 369 nm e 427 nm), que foram atribuídas à transição dos elétrons π de conjugação. Com a relação entre a banda em 293 nm a cada bicamada formada no filme confirmou-se a adsorção dos políons precursores na superfície do substrato FTO. Isto é evidenciado, pois à medida que são depositadas as camadas, verifica-se um crescimento linear da absorção em função da quantidade de bicamadas (Figura 1 A). A análise morfológica superficial dos filmes foi realizado por AFM onde verificou-se que quando se compara a rugosidade média dos grãos, nota-se que o substrato FTO se apresenta com maior rugosidade (14,86 nm). É perceptível que a deposição dos precursores PPV e Pt-SiPy⁺Cl⁻ diminuem essa rugosidade média, pois esses se depositam nos espaços existentes entre os grãos diminuindo assim a altura destes. À medida que são depositadas as bicamadas a rugosidade tende a aumentar novamente devido à auto-organização que ocorre entre os políons como mostra a Figura 1B.

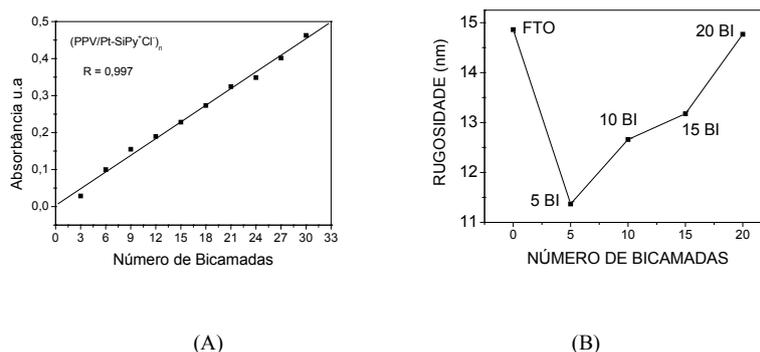


Figura 1 – (A) Relação entre a absorbância da banda em 293 nm por bicamadas do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n; (B) Relação entre a valores de rugosidade vs. número de bicamadas para o filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n.

Obtiveram-se filmes LbLs contendo diferentes bicamadas de PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻ e Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV. Estes filmes foram testados na presença de H₂O₂ utilizando as técnicas de voltametria cíclica, pulso deiferencial e cronoamperometria. Foram preparados filmes contendo 3, 6, 10 e 15 bicamadas das duas arquiteturas. A análise dos voltamogramas revelaram que os filmes que apresentaram melhores respostas frente ao H₂O₂ foram os filmes contendo 6 bicamadas tanto na arquitetura (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n como (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n, conforme mostra a Figura 2A e 2B.

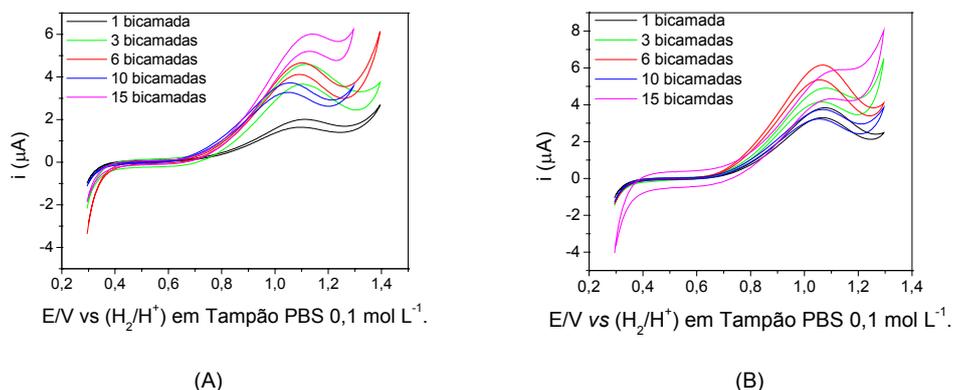


Figura 2 – Voltamogramas cíclicos dos filmes LbLs (A) PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻ e (B) Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV, em tampão fosfato salino (PBS) pH = 7 na presença de H₂O₂ 1,0 . 10⁻⁴ mol.L⁻¹.

No filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ imobilizou-se a enzima GOX e este filme foi testado eletroquimicamente na presença de glicose. Este foi escolhido, devido as melhores respostas eletroquímicas observadas na detecção de peróxido. As medidas de cronoamperometria mostradas na Figura 3A revelaram a eficiente detecção indireta da glicose pelas correntes de picos de oxidação geradas pela formação de peróxido. A faixa de concentração de glicose estudada foi entre 8,7 . 10⁻⁵ à 9,9 . 10⁻⁵ mol L⁻¹. As adições foram realizadas num intervalo de 50 segundos. Verificou-se a partir da curva analítica (Figura 3B) um limite de detecção de 1,7 . 10⁻⁶ mol L⁻¹.

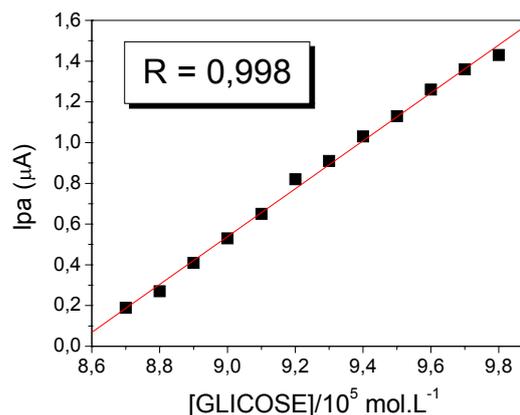
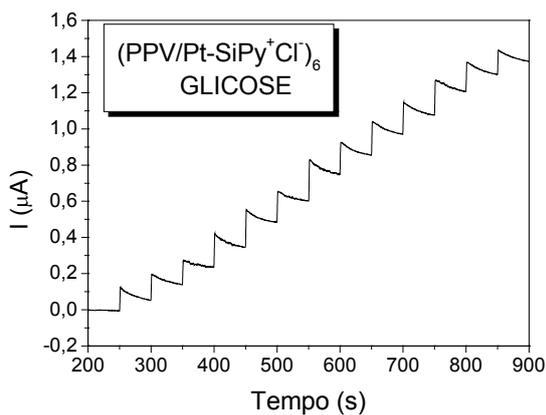


Figura 3 – (A) Cronoamperometria do filme $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$ em Tampão PBS pH = 7 em glicose com concentrações distintas (B) gráfico de $[\text{Glicose}] \times I_{pa}$ (Curva Analítica).

CONCLUSÕES

Os filmes contendo 6 bicamadas de $\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV}$ foram os que forneceram melhores respostas frente à oxidação do peróxido. A presença dos modificadores PPV e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ auxiliaram a determinação deste analito. Verificou-se a possibilidade de construção de biossensores para detecção de analitos como a glicose através da detecção indireta verificando a oxidação do peróxido de hidrogênio.

AGRADECIMENTOS: CNPq, Fundação Araucária, Rede N-Bionet/CAPES.

REFERÊNCIAS

- [1] CRESPILO, F. N. et al; “Enzyme immobilization on Ag nanoparticles/polyaniline nanocompósitos”. *Biosensors and Bioelectronics*. (24), 3073–3077, 2009.
- [2] FERREIRA, M. et at. “Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnoly”, 10, p. 1-25, 2004 .

FILMES LbL COM NANOPARTÍCULAS DE PLATINA UTILIZADOS NA DETECÇÃO DE DOPAMINA EM MEIO À INTERFERENTES

Vagner dos Santos¹, Monalisa dos Santos¹, Andressa Galli¹, Sergio T. Fujiwara², Jarem Raul Garcia¹, Cleverson S. Santos¹, Valtecir Zucolotto³, Christiana A. Pessoa¹, Karen Wohnrath¹

¹ Departamento de Química - Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Ponta Grossa - PR - Brasil; ² Departamento de Química - Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, Guarapuava - PR - Brasil; ³ Instituto de Física de São Carlos - USP, Brasil.

vagner_quimica@hotmail.com

RESUMO: Este trabalho descreve a formação de filmes LbL de nanopartículas de Pt estabilizadas com o polímero inorgânico cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano (SiPy⁺Cl⁻). O híbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ foi utilizado como polication alternado com o poliânion poli-p-fenilenovinileno sulfonado (PPV), de forma a obter filmes com diferentes arquiteturas ((PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n). No monitoramento da deposição das bicamadas realizado por UV-Vis observou-se um crescimento linear a cada bicamada depositada no filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻) (R = 0,997) e menor linearidade no (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n (R = 0,992). Medidas eletroanalíticas para a detecção de dopamina (DA) em meio aos interferentes ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU) em solução foram realizadas e observou-se que o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ oxidou a dopamina com uma diferença de 600 mV para os potenciais de oxidação dos demais analitos.

INTRODUÇÃO

O grande desafio da nanociência nos últimos anos é a exploração das novas propriedades existentes na escala nanométrica, por isso tem se buscado produzir novos dispositivos nanoestruturados. Para a construção destes, é muito importante a imobilização das nanopartículas (NP) em um substrato. Porém, neste processo é imprescindível incorporar as NP sem prejudicar seu caráter nano e impedir sua aglomeração. Uma técnica de imobilização que tem apresentado grande destaque em relação às outras técnicas é a de automontagem ou camada por camada (do inglês *Layer by Layer*). Entre as várias técnicas desenvolvidas recentemente, a técnica LbL tem se mostrado promissora e capaz de produzir filmes ultrafinos e organizados em nível nanométrico em diferentes tipos de materiais, com simplicidade experimental e baixo custo^[1].

C. G. Jesus et al^[2], produziram filmes LbL com o polímero cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano (SiPy⁺Cl⁻) e ftalocianina sulfonada de cobre e utilizaram os filmes na detecção simultânea de dopamina (DA) e ácido ascórbico (AA) com baixos valores de LD (1,0 .10⁻⁵ mol.L⁻¹). A importância da detecção de DA se dá pelos baixos níveis de dopamina em tecidos cerebrais pois estão associados às doenças como o “Mal de Parkinson” e a “[Esquizofrenia](#)”. Por esse motivo, parâmetros como sensibilidade e seletividade são de grande importância para a sua detecção. A presença de interferentes é um dos principais fatores que complica a determinação eletroquímica da DA. Entre os interferentes estão o ácido ascórbico (AA) e o ácido úrico (AU) que acompanham a DA em amostras biológicas. A DA e os interferentes são oxidados em potenciais bem próximos tornando difícil a determinação simultânea dessas substâncias. Com o intuito de analisar a sensibilidade do eletrodo LbL/SiPy⁺Cl⁻, neste trabalho utilizou-se o nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ formado por Np de Pt, como polication, e o poli-p-fenilenovinileno sulfonado (PPV) como poliânion. As potencialidades sensoras dos filmes Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV e PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻ foram analisadas na detecção simultânea de DA, AA e AU.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os filmes LbL do nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ foram construídos pela imersão alternada do substrato de FTO por 3 minutos nas soluções de Pt-SiPy⁺Cl⁻ 2 mmol L⁻¹ e PPV 2,5 g L⁻¹, e por 10 segundos na solução de lavagem. Os valores de pH das soluções foram de 2,9 e 5,5 para Pt-SiPy⁺Cl⁻ e PPV, respectivamente. As medidas de espectroscopia na região do UV-Vis dos filmes PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻ e Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV depositados sobre FTO e dos respectivos polieletrólitos, foram realizadas em um espectrofotômetro Cary 50 Bio. As medidas de UV-Vis foram realizadas para os filmes, monitorando-se a absorbância das bandas do PPV (295 nm, 369 nm e 427 nm) referentes à transição dos elétrons π de conjugação em função do número de bicamadas.

Voltamogramas Cíclicos (VC) e de Onda Quadrada (VOQ) foram obtidos em filmes LbL contendo diferentes números de bicamadas de PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻ e Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV depositadas sobre substrato FTO (0,6 cm²). As medidas foram realizadas em um potenciostato μ-autolab tipo III (autolab/Ecochemie) utilizando solução de nitrato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7 como eletrólito suporte. Utilizou-se como referência o eletrodo normal de hidrogênio e como auxiliar uma placa de Pt (0,6 cm²). Os voltamogramas foram obtidos com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Os parâmetros

instrumentais da VOQ, frequência de aplicação de pulso de potencial (f), amplitude do pulso de potencial (a) e incremento de potencial (ΔE_s) foram otimizados de modo a permitir a construção de curvas analíticas e, a partir destas, foi possível calcular os limites de detecção e de quantificação. Utilizando-se os parâmetros otimizados, os filmes foram aplicados como sensores voltamétricos na determinação de DA, numa faixa de concentração de $2,0 \cdot 10^{-6}$ a $1,0 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença tanto do poliânion PPV quanto do polication Pt-SiPy⁺Cl⁻ nas duas arquiteturas dos filmes LbL ((PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)₃₀) pode ser evidenciada nos espectros de UV-Vis ilustrados na Figura 1A. As bandas em 295 nm, 369 nm e 427 nm são atribuídas à transição dos elétrons π de conjugação do PPV e a banda em 258 nm é atribuída à transição π dos elétrons do SiPy⁺Cl⁻. As bandas mais intensas ocorrem no filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀ devido à melhor organização no filme o que acarreta uma adsorção mais efetiva. Nos espectros obtidos do monitoramento do crescimento dos filmes quando as bicamadas são depositadas foi observada uma maior adsorção dos polieletrólitos precursores quando o polication se encontra na superfície externa do substrato, indicando um crescimento linear da absorção em função da quantidade de bicamadas ($R=0,997$) (Figura 1B).

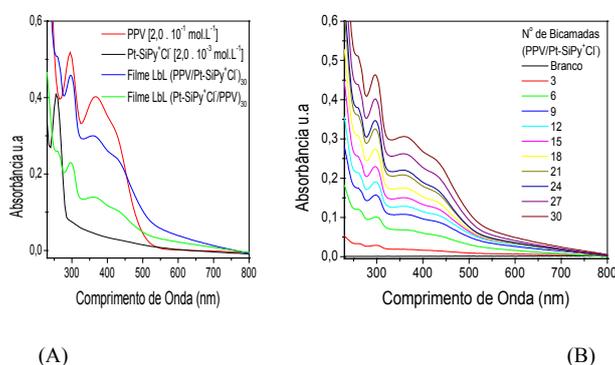


Figura 1 – Espectros de absorção na região do UV-Vis de (A) PPV $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹, Pt-SiPy⁺Cl⁻ $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹, filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀ e filme LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)₃₀ depositados sobre lâmina de quartzo; (B) filmes LbL PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻ em diversos número de bicamadas.

Medidas de VC e VOQ dos filmes LbLs contendo contendo 3, 6, 10, 15 e 25 bicamadas das duas arquiteturas PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻ e Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV foram realizadas na presença de DA 10^{-4} mol L⁻¹ (Figura 2A, 2B e 2C; 3A e 3B).

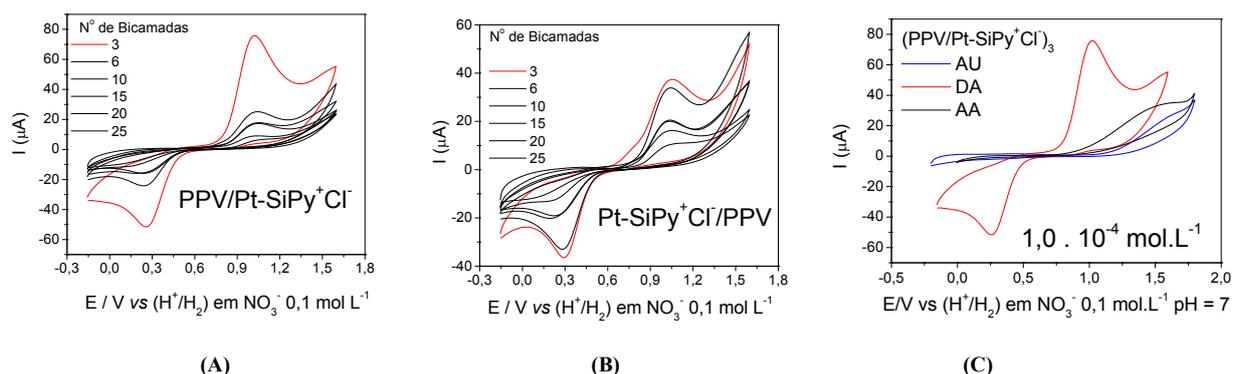


Figura 2 – Voltamogramas cíclicos dos filmes: (A) (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n na presença de DA; (B) (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n na presença de DA; (C) (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de DA, AU e AA, todos $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, sobre FTO em solução de nitrato $0,1$ mol L⁻¹ em pH 7, para velocidade de 50 mV s⁻¹.

A análise dos VC revelaram que os filmes que apresentaram melhor resposta de corrente frente à DA foram os contendo 3 bicamadas com as duas arquiteturas, como observado na Figura 2A e 2B. A DA oxidou em $0,9$ V enquanto os potenciais de oxidação dos analitos AA e AU se sobrepõem em $1,5$ V como ilustrado na Figura 2C.

Utilizou-se a VOQ com o objetivo de obter maior sensibilidade de corrente. Os parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada otimizados para a oxidação de DA foram: $f = 90$ Hz, $a = 80$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV. A partir destes resultados, a detecção simultânea da dopamina juntos dos interferentes apresentou uma diferença de potencial em torno de 600 mV (Figura 3A). Essa separação foi próxima a obtida no trabalho de Jesus, C. G. et al [2] (500 mV).

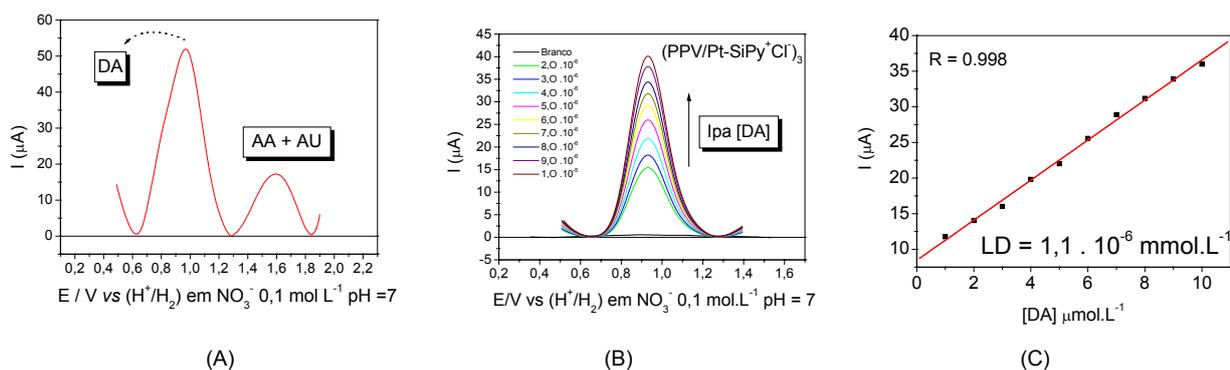


Figura 3 – Voltamogramas de onda quadrada do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl)₃ (A) na presença de DA, AU e AA todos $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (B) em diferentes concentrações ($2,0 \cdot 10^{-6} - 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e (C) curva analítica para DA.

Utilizando-se os parâmetros voltamétricos otimizados, a partir da curva analítica (Figura 3B e 3C) verificou-se o limite de detecção e limite de quantificação para a DA respectivamente igual a $1,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

CONCLUSÕES

Os filmes LbL preparados com o nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ forneceram excelentes respostas frente ao processo de detecção simultânea de DA e os interferentes AA e AU em pH fisiológico. Embora os potenciais de picos dos interferentes tenham se sobrepostos, verificou-se uma excelente separação dos picos de oxidação destes para o analito de interesse dopamina que oxidou em torno de 0,9 V. A presença das NP de Pt na parte externa dos filmes se mostrou importante para uma eficiente eletrocatalise no processo de oxidação da DA principalmente para o filme contendo 3 bicamadas que forneceu as melhores respostas eletroquímicas.

AGRADECIMENTOS: CNPq, FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA, INEO/INCT.

REFERÊNCIAS

- [1] DECHER, G. et al. "Build of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces". *Thin Solid Films*, v. 21, p. 831, 1992.
- [2] C. G. JESUS; V. Santos; C. D. Canestraro; V. Zucolotto; S. T. Fujiwara; Y. Gushikem; K. Wohnrath and C. A. Pessoa. "Silsequioxane as a New Building Block Material for Modified Electrodes Fabrication and Application as Neurotransmitters Sensors". *Journal of Nanoscience Nanotechnology*, Vol. 11, 3499–3508, 2011.

INFLUÊNCIA DO SOLVENTE NA ETAPA DE ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO COMPLEXO Ni(II)-EMHBM

Yuri A. Oliveira (IC), Cibely S. Martin (PG), Marcos F. S. Teixeira (PQ)

Grupo de Pesquisa em Eletroanalítica e Sensores (GPES) - Departamento de Química, Física e Biologia, Faculdade e Ciências e Tecnologia - UNESP, Presidente Prudente, SP, Brasil

RESUMO: O efeito do solvente no processo de eletropolimerização do complexo *N,N'*-etilenobis(α -metil-2-hidroxibenzenometanimine) de níquel(II) (Ni-EMHBM) sobre a superfície do eletrodo de platina foi realizado por voltametria cíclica. O comportamento eletroquímico do filme polimérico sobre o substrato de platina foi estudado em solução aquosa, observando que os melhores perfis voltamétricos e maiores magnitude de correntes foram obtidos com filmes formados em solvente de acetonitrila e acetona. O processo redox observado no processo de eletropolimerização e no comportamento eletroquímico são atribuídos ao par redox Ni^{II}/Ni^{III} presente no complexo de salen. Uma relação com a viscosidade e constante dielétrica dos solventes também foi realizada.

Palavras-chave: Eletropolimerização, Complexo de Níquel(II), Efeito do Solvente, Filme Nanoestruturados.

INTRODUÇÃO

As bases de Schiff derivadas de salicilaldeído são ligantes polidentados que formam diversos complexos estáveis com diferentes cátions metálicos de transição. Os ligantes do tipo *N,N'*-etilenobis(salicilidenoiminato), têm sido utilizados extensivamente na formação de complexos com os principais grupos metálicos [1]. Diante da capacidade de polimerização e da potencialidade dos complexos metálicos a base de Schiff como mediadores de elétrons, tornam-se interessantes investigar os processos eletroquímicos dos eletrodos modificados com filmes poliméricos derivados dos complexos metálicos com o ligante *N,N'*-etilenobis(salicilidenoaminato). Recentemente, estudamos a formação de filmes poliméricos nanoestruturados do complexo de tipo *N,N'*-etilenobis(salicilidenoiminato) de cobre(II) sobre substrato de platina e sua atividade eletrocatalítica. Dessa forma, um estudo do efeito do tipo de solvente na etapa eletropolimerização de um novo complexo *N,N'*-etilenobis(α -metil-2-hidroxibenzenometanimine) de níquel(II) (Ni-EMHBM) demonstra importância para compreensão da formação do filme polimérico.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O complexo *N,N'*-etilenobis(α -metil-2-hidroxibenzenometanimine) de níquel(II) (Ni-EMHBM) foi obtido pela reação do ligante *N,N'*-etilenobis(α -metil-2-hidroxibenzenometanimine) (Sigma-Aldrich) e acetato de níquel(II) em etanol na proporção de 1:1 ($\frac{mmol}{mol}$). As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma cela eletroquímica convencional de 25 mL, contendo três eletrodos: eletrodo de calomelano saturado (ECS) como referência, eletrodo de fio de platina como eletrodo auxiliar e eletrodo de platina de área 0,071 cm² como eletrodo de trabalho, conectados a um potenciostato/galvanostato μ -Autolab type III (Eco Chimie). Antes do processo de eletropolimerização, o eletrodo de trabalho de platina foi submetido a um polimento com solução de alumina e lavado com etanol absoluto. Os filmes poliméricos foram obtidos por voltametria cíclica utilizando o substrato condutor de platina imerso em diferentes solventes orgânicos, contendo 3 mmol do complexo Ni-EMHBM em eletrólito suporte de perclorato de tetrabutilamônio (TBPA) 0,1 mol/L. Os solventes utilizados no estudo foram: dimetil sulfoxido (DMSO), acetona, diclorometano (DCM), acetonitrila (CH₃CN) e dimetil acetamida (DMA). Na solução de trabalho foi borbulhado nitrogênio por 30 minutos para eliminação do oxigênio eletroativo. Após a eletropolimerização, o eletrodo modificado foi lavado com água destilada e a caracterização eletroquímica em solução aquosa (KCl 0,5 mol/L) por voltametria cíclica na ausência de oxigênio foi realizada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de investigar a influência dos solventes durante o processo de eletropolimerização foi selecionado alguns solventes como: acetona, CH₃CN, DCM, DMSO e DMA. A eletropolimerização foi realizada na janela de potencial de 0 a 1,4 V vs. ECS com velocidade de varredura de 100 mV/s. A Figura 1 ilustra os voltamogramas cíclicos obtidos durante o processo de eletropolimerização dos complexos de níquel nos solventes CH₃CN, acetona e DCM, respectivamente. O aumento consecutivo de corrente de pico anódico e catódico (ver Figura 1A) indica a formação do filme polimérico na superfície do eletrodo de platina. Os primeiros ciclos de eletropolimerização apresentam dois picos anódicos e um único pico catódico, devido a formação do cátion radicalar. Após o segundo ciclo de potenciais apenas um processo redox é observado, o qual é atribuído ao par redox Ni(II)/Ni(III). Esse processo ocorre pela interação do cátion metálico com os anéis aromáticos das moléculas adjacentes, formando um filme polimérico na forma de coluna [2]. A interação entre as moléculas é facilitada devido à estrutura “*umbrella*” do complexo de Ni-EMHBM, possibilitando uma formação

organizada do filme polimérico na superfície do substrato condutor. Como observado pelas Figuras 1A, 1B, e 1C, o número máximo de ciclagem para esses solventes foram de 7 ciclos de varredura de potenciais, observando-se uma diminuição no valor de corrente de pico a partir de varreduras maiores e conseqüentemente uma perda da atividade da membrana polimérica. Esse comportamento pode estar relacionado com a espessura e a condutividade do material polimérico na superfície do eletrodo.

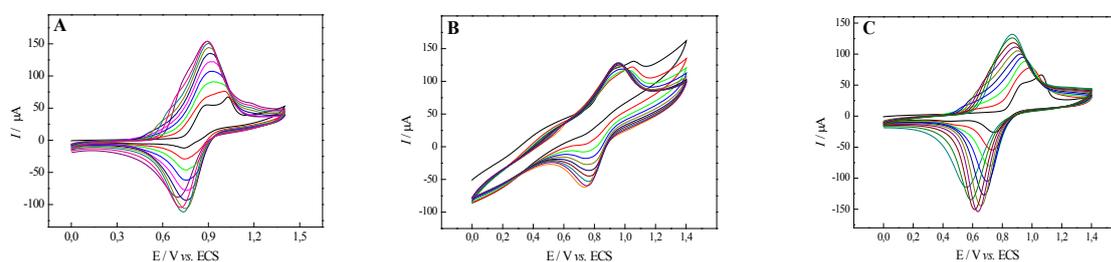


Figura 1: Voltamogramas cíclicos para a eletropolimerização de 5 mmol/L de complexo de Ni-EMHBM em 0,1 mol/L TEAP/solvente sobre a superfície do eletrodo de platina, com velocidade de varredura de polimerização de 100 mV/s. Solvente: (A) CH₃CN, (B) acetona e (C) DCM.

A Tabela 1 apresenta os valores dos potenciais de ativação observados para o processo de eletropolimerização do complexo de Ni-EMHBM para cada solvente estudado com seus respectivos valores de viscosidade, momento dipolo e constante dielétrica. Como representado na Tabela 1, observa-se que a formação do filme polimérico está relacionada com a viscosidade do solvente. Solventes com alto valor de viscosidade como DMA e DMSO não formam membrana polimérica devido a maior dificuldade do movimento dos contra-íons em solução durante a formação do polímero, como também, afeta no processo de difusão das espécies monoméricas na superfície do eletrodo. De acordo com os resultados de potencial de pico de oxidação foi possível observar uma relação entre o potencial de ativação e o momento dipolo, demonstrando que quanto menor o potencial de ativação menor o momento dipolo do solvente utilizado na etapa de eletropolimerização. A influência do momento dipolo do solvente na reação de eletropolimerização ocorre devido a formação do cátion radical de meia vida curta, tendo assim diferencial de carga no estado de transição durante a formação do polímero. Além do momento dipolo, o solvente deve apresentar uma alta constante dielétrica para assegurar a condutividade iônica do meio eletrolítico e a diminuição da resistência eletroquímica contra decomposição no alto potencial requerido para oxidar o metal durante o processo de eletropolimerização.

Tabela 1: Valores de potenciais de ativação na formação do poli[Ni-EMHBM] e as propriedades dos solventes de acordo com a literatura [3].

Solvente	Viscosidade (cP)	Momento Dipolo (D)	Constante Dielétrica (ϵ)	Número máximo de Ciclos	E_p (mV)
CH ₃ CN	0,341	3,53	37,5	7	1,01
Acetona	0,303	2,70	20,7	7	1,06
DCM	0,393	1,55	9,08	7	0,98
DMA	0,927	3,79	37,8	0	-
DMSO	1,990	4,06	46,7	0	-

A Figura 2A apresenta as correntes de pico anódica (I_{pa}) na etapa de eletropolimerização em função do número de ciclos de varreduras de potenciais aplicados. Para comparação dos resultados, a Figura 2B apresenta a relação de I_{pa} obtido em solução aquosa KCl 0,5 mol/L para os eletrodos modificados em diferentes ciclos aplicados na eletropolimerização. A corrente de pico anódica no processo de eletropolimerização para o solvente diclorometano apresentou valores satisfatórios com o aumento da ciclagem de potenciais, porém em solução aquosa o filme polimérico formado apresentou baixa magnitude de corrente, indicando a formação de um filme polimérico pouco condutor e/ou uma formação não organizada do filme. Para os solventes DMA e DMSO, as respostas eletroquímicas não foram satisfatórias na etapa de eletropolimerização, como também, o comportamento eletroquímico do eletrodo em solução aquosa. Dessa forma, os melhores resultados em ambas as etapas foram observadas para o filme polimérico formado em acetonitrila e acetona.

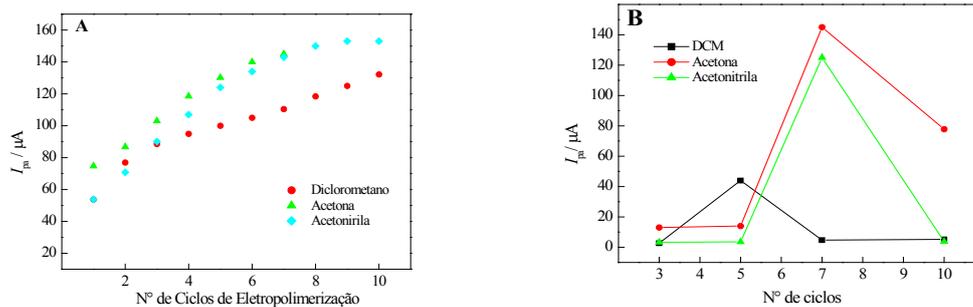


Figura 2. Corrente de pico anódica obtidas para cada um dos solventes utilizados em função do número de ciclos aplicados: (A) Etapa de eletropolimerização e (B) Solução aquosa de KCl 0,5 mol/L, $v = 25$ mV/s.

CONCLUSÕES

A partir de uma análise detalhada da Tabela 1 e relacionando-se com o modelo teórico de eletropolimerização pode-se concluir que o solvente deve ser um fraco-doador, interferindo o mínimo possível durante a eletropolimerização, por isso deve ser um solvente com baixa viscosidade e com momento dipolo pequeno. Os melhores solventes para executar a eletropolimerização do complexo de Ni-EMHBM são o acetonitrila e acetona por possuírem, baixa viscosidade, alta constante dielétrica e menor momento dipolo, além de alcançarem o maior número de ciclos de polimerização.

AGRADECIMENTOS: FAPESP (nº proc. 2010/12524-6) e CNPq (504218/2010-7)

REFERÊNCIAS

- [1] M.D. Hobday, T.D. Smith, *N, N'-ethylenebis(salicylideneiminato) transition metal ion chelates*, **Coord. Chem. Rev.** 9, 311 (1973).
- [2] T.R.L. Dadamos, M.F.S. Teixeira, *Electrochemical sensor for sulfite determination based on a nanostructured copper-salen film modified electrode*. **Electrochim. Acta.**, 54, 4552, (2009).
- [3] K. Izutsu, *Electrochemistry in Nonaqueous Solutions*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co (2002).

ELETRODEPOSIÇÃO DO HÍBRIDO POLIPIRROL-NANOTUBOS DE CARBONO NA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE E SUA APLICAÇÃO COMO BIOCSENSOR PARA CATECOLAMINAS

Heloisa V. Galesco, Ivana Cesarino, Fernando C. Moraes, Sergio A.S. Machado

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos – SP – Brasil.

heloisagalesco@iqsc.usp.br

RESUMO: O híbrido polipirrol (PPy) e nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) foi eletrodepositado sobre a superfície do eletrodo de platina (Pt) para imobilização da enzima lacase no desenvolvimento de um biossensor para catecolaminas. A caracterização e as vantagens da utilização do material híbrido foram examinadas por espectroscopia no infravermelho (IR), microscopia eletrônica de varredura (AFM) e voltametria cíclica (CV). A imobilização da lacase na superfície do eletrodo de Pt foi amplamente melhorada devido ao efeito sinérgico do composto PPy/MWCNT. O biossensor Pt/PPy/MWCNT/Lacase desenvolvido foi avaliado para a determinação de dopamina usando voltametria de pulso diferencial (DPV).

Palavras-chave: Biossensor, Polipirrol, Nanotubos de Carbono, Dopamina.

INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, diversas pesquisas sobre a utilização de enzimas em bioeletrocatalise relacionados com o desenvolvimento de biossensores, biorreatores e células biocombustíveis têm sido realizadas [1-3]. No entanto, apesar do considerável número de publicações disponíveis sobre o assunto, há poucos estudos sobre o comportamento eletroquímico de enzimas imobilizadas na superfície de eletrodos não modificados. Enzimas normalmente têm baixo tempo de vida e perdem atividade em eletrodos não modificados [4]. Além disso, existem problemas no transporte de massa associado aos longos caminhos entre os sítios do biocatalisador (enzima) e o transdutor. Para superar tais limitações, os estudos concentraram-se em diferentes estratégias de imobilização de enzimas sobre superfícies de eletrodo [5,6]. Uma estratégia recente nesta área é a preparação de superfícies híbridas, contendo nanotubos de carbono (CNTs) e outros materiais capazes de facilitar a imobilização eficiente de biomoléculas. Neste contexto, filmes híbridos formados com CNTs e polímeros condutores têm demonstrado um efeito sinérgico melhorando significativamente as propriedades eletrônicas e mecânicas de cada componente [7,8]. Dentre os polímeros condutores mais estudados, o polipirrol (PPy) tem recebido muita atenção em função de ser facilmente sintetizado via química ou eletroquímica e por possuir excelentes características condutoras. A condutividade do PPy devido a sua labilidade em alternar os estados isolante/condutor por meio de processos de dopagem/desdopagem eletroquímica. Em particular, o polipirrol dopado exibe alta condutividade e estabilidade ambiental apresentando também a possibilidade de formar homopolímero ou compósitos com ótimas propriedades mecânicas. Para imobilização de enzimas o polipirrol é excelente, pois esse polímero pode ser eletropolimerizado em pH neutro juntamente com a enzima em solução.

Catecolaminas desempenham um papel importante como neurotransmissores no sistema nervoso central [9]. A detecção seletiva de catecolaminas como a dopamina, epinefrina, noradrenalina e serotonina em amostras biológicas são importantes tanto para o diagnóstico clínico como no estudo patológico de certas doenças.

Assim, o objetivo desse estudo é a formação de um filme híbrido de PPy e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) para a fabricação de biossensores eletroquímicos com maior sensibilidade para a detecção de dopamina. O biossensor foi preparado pela simples eletropolimerização de uma determinada relação de PPy/MWCNT/Lacase sobre eletrodos de platina e o nano-biocompósito formado apresentou excelentes propriedades através de efeitos sinérgicos dos materiais componentes.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Instrumentação e métodos.

Experimentos de voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV) foram realizados utilizando um sistema eletroquímico modelo PGSTAT30 Autolab (Eco Chemie, Utrecht, Holanda), equipado com o PGSTAT-12 e software GPES (Eco Chemie, Utrecht, Holanda). A célula eletroquímica foi montada com um sistema convencional de três eletrodos: eletrodos Pt modificados com PPy/MWCNT/Lacase como eletrodo de trabalho, um Ag/AgCl/KCl (3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência e uma placa de Pt como eletrodo auxiliar. Todos os experimentos foram realizados à temperatura controlada (25 ± 1 °C). As medidas de DPV foram realizadas com uma amplitude de pulso de 100 mV, incremento de potencial de 2 mV, ao longo de um intervalo relevante potencial, em solução tampão fosfato (PBS) 0,2 mol L⁻¹ pH 6,0. A morfologia da superfície do nano-biocompósito foi caracterizada por espectros no infravermelho (IR) que foram obtidos em um espectrômetro Nicolet 55XC na faixa de 500-4000 cm⁻¹.

Produtos químicos e soluções.

Todas as soluções foram preparadas com água purificada em sistema Milli-Q Millipore (resistividade $\geq 18 \text{ M } \Omega \text{ cm}$). Pirrol e enzima lacase (*Trametes versicolor* 0.72 U/mg) foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Uma mistura constituída de 100 mg de MWCNT (90% pureza, Sigma-Aldrich, Germany) com 500 mL de solução 1:3 $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ foi agitada por 12 horas, a fim de promover a funcionalização dos MWCNT. Após, a mistura foi filtrada através de um filtro de membrana 0,45 μm Millipore Nylon. Os MWCNT resultantes foram continuamente lavados com água ultrapura e secos em estufa a vácuo por 12 horas a 70 °C.

Preparação dos eletrodos de platina modificados.

O eletrodo Pt foi imerso em 25,0 mL de solução NaCl 0,5 mol L⁻¹ contendo 443 μL de pirrol, 5,0 mg MWCNT e 2,5 mg de lacase. A etapa de eletropolimerização consistiu em 10 voltamogramas no intervalo de potencial de -0,2 a +0,8 V, com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. O biossensor foi retirado da solução e estocado em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 6,0 a 4 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para analisar a interação entre MWCNT e PPy, análises espectroscópicas na região do infravermelho do PPy(a) e do compósito PPy/MWCNT(b) foram realizadas e são apresentadas na Figura 1. O espectro IR do PPy apresentou picos característicos em 1630, 1447, 1043 e 670-530 cm⁻¹, do C-C conjugado e do estiramento C-N, o simétrico C-H no plano, e a deformação do anel C-H, respectivamente [10]. Além disso, os picos em 2922 e 2853 cm⁻¹ foram associados ao estiramento dos cinco membros do anel C-H. O movimento de esticar e dobrar da ligação N-H do PPy apareceu em 3451 cm⁻¹. Já o híbrido PPy/MWCNT apresentou maior intensidade das bandas em 3451, 2922, 2853 cm⁻¹ e o aparecimento das bandas características do MWCNT em 1738, 1542, 1374, e 1173 cm⁻¹. Em particular, o pico em 1738 cm⁻¹ foi causado pelo estiramento dos grupos funcionais OH, C=O, C-C-O introduzido pelo tratamento ácido (Seção Experimental) [11]. Estas características espectrais mostram que o MWCNT foi introduzido com sucesso no polímero condutor.

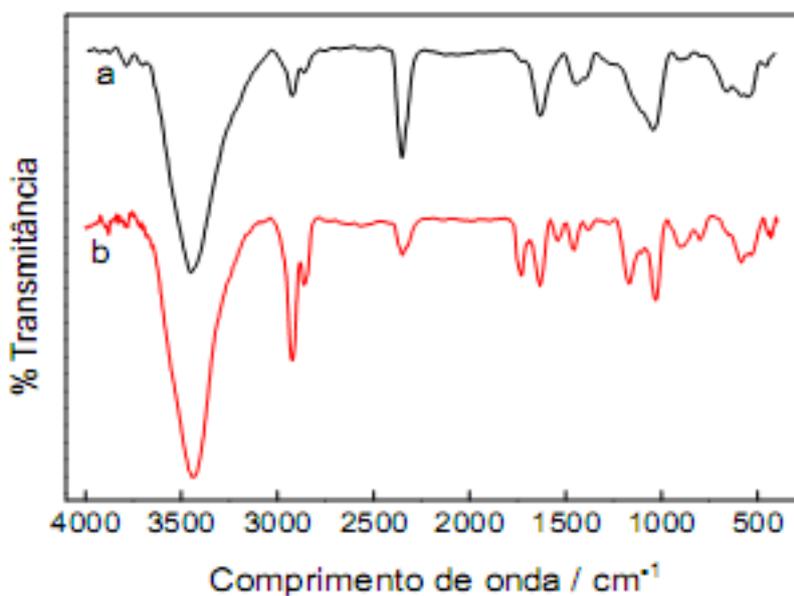


Figura 1: Espectro IR para: (a) PPy e (b) híbrido PPy/MWCNT.

A caracterização eletroquímica do eletrodo de Pt à base de PPy/MWCNT/Lacase foi realizada em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 6,0 contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de dopamina e comparada com o eletrodo de Pt sem modificação (Figura 2A). Observa-se que o biossensor apresentou uma melhoria na reversibilidade dos processos redox da dopamina ($\Delta E_p = 120$ mV) sendo este valor 70 mV menor que o apresentado para o eletrodo de Pt ($\Delta E_p = 190$ mV). A melhor imobilização da enzima lacase nos sítios tridimensionais do híbrido PPy/MWCNT e o aumento da área superficial do biossensor gerou um incremento de três vezes tanto nas correntes de pico anódica quanto catódica. A presença de MWCNT no biossensor casou um efeito eletrocatalítico no sistema redox, observando um deslocamento de 92 mV para valores mais negativos no potencial de oxidação, ou seja, E_{pa} para o biossensor Pt/PPy/MWCNT/Lacase foi 280 mV e para o eletrodo de Pt sem modificação um E_{pa} de 372 mV. Já a Figura 2B apresenta os voltamogramas de pulso diferencial em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 6,0 contendo $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de dopamina para os eletrodos de Pt modificado somente com PPy, modificado com o híbrido PPy/MWCNT e modificado com PPy/MWCNT/Lacase. Observa-se que os três eletrodos apresentaram picos de redução em aproximadamente 265 mV, porém o biossensor exibiu uma maior intensidade da corrente catódica, em comparação as correntes observadas nos outros eletrodos, mostrando a eficiente imobilização da enzima lacase no híbrido PPy/MWCNT.

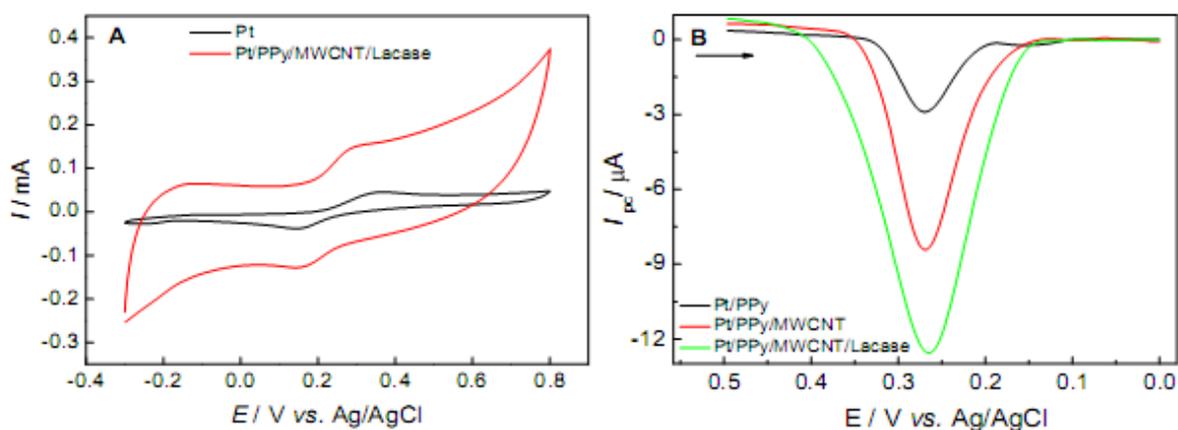


Figura 2: Voltamogramas cíclicos (A) e voltamogramas de pulso diferencial (B) para os eletrodos de Pt com e sem modificações em PBS 0,2 mol L⁻¹ pH 6,0 na presença de dopamina.

CONCLUSÕES

A eletropolimerização do híbrido PPy/MWCNT sobre o eletrodo Pt foi aplicada com sucesso na imobilização da enzima lacase, sem requerer ao uso de mediadores redox ou agentes de reticulação (gluteraldeído). O biossensor mostrou-se promissor para detecção de catecolaminas em amostras biológicas devido ao seu excelente desempenho para a redução de dopamina.

AGRADECIMENTOS: fapesp (Processos nº 2010/11567-3 e 2010/11049-2) e CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] De La Garza, L., Jeong, G., Liddell, P.A., Sotomura, T., Moore, T.A., Moore, A.L. AND Gust, D., “Enzyme-Based Photoelectrochemical Biofuel Cell”, *J. Phys. Chem. B* 107(37): 10252-10260, 2003.
- [2] Simon, E., Halliwell, C.M., Toh, C.S., Cass, A.E.G. AND Bartlett, P.N., “Immobilisation of Enzymes on Poly(Aniline)-Poly(Anion) Composite Films. Preparation of Bioanodes for Biofuel Cell Applications”, *Bioelectrochem.* 55(1-2): 13-15, 2002.
- [3] Akers, N.L., Moore, C.M. AND Minteer, S.D., “Development of Alcohol/O₂ Biofuel Cells Using Salt-Extracted Tetrabutylammonium Bromide/Nafion Membranes to Immobilize Dehydrogenase Enzymes”, *Electrochim. Acta* 50(12): 2521-2525, 2005.
- [4] Wen, Z., Ye, B. AND Zhou, X., “Direct Electron Transfer Reaction of Glucose Oxidase at Bare Silver Electrodes and its Application in Analysis”, *Electroanalysis* 9(8): 641-644, 1997.
- [5] Barton, S.C., Gallaway, J. AND Atanassov, P., “Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices”, *Chem. Rev.* 104(10): 4867-4886, 2004.
- [6] Takahashi, H., Li, B., Sasaki, T., Miyazaki, C., Kajino, T. AND Inagaki, S. “Catalytic Activity in Organic Solvents and Stability of Immobilized Enzymes Depend on The Pore Size and Surface Characteristics of Mesoporous Silica”, *Chem. Mater.* 12(11): 3301-3305, 2000.
- [7] Wang, J. AND Musameh, M., “Carbon-nanotubes Doped Polypyrrole Glucose Biosensor”, *Anal. Chim. Acta* 539(1-2): 209-213, 2005.
- [8] Agüí, L., Peña-Farfal, C. AND Yáñez-Sedeño, P., “Poly-(3-Methylthiophene)/Carbon Nanotubes Hybrid Composite-Modified Electrodes”, *Electrochim. Acta* 52(28): 7946-7952, 2007.
- [9] Bergquist, J., Sciubisz, A., Kaczor, A. AND Silberring, J., “Catecholamines and Methods for their Identification and Quantitation in Biological Tissues and Fluids”, *J. Neurosci. Methods* 113(1): 1-13, 2002.
- [10] Lee, Y-K., Lee, K-J., Kim, D-S., Lee, D-J. AND Kim, J-Y., “Polypyrrole-carbon Nanotube Composite Films Synthesized Through Gas-phase Polymerization”, *Synth. Metals* 160: 814-818, 2010.
- [11] Zou, H., Wang, K., Zhang, Q. AND Fu, Q., “A Change of Phase Morphology in Poly(P-Phenylene Sulfide)/Polyamide 66 Blends Induced by Adding Multi-walled Carbon Nanotubes”, *Polymer* 47(22): 7821, 2006.

EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS DE NÍQUEL NA CONSTRUÇÃO DE UM SENSOR AMPEROMÉTRICO PARA PERÓXIDO EM MEIO ALCALINO

Amábile de C. Muller¹, Eduardo G. C. Neiva², Aldo J. G. Zarbin², Marcio F. Bergamini¹, Luiz H. Marcolino Jr.¹.

¹ Laboratório de Sensores Eletroquímicos (LabSensE), Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR; ² Grupo de Química de Materiais (GQM), Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR. amabilemuller@ufpr.br

RESUMO: O desenvolvimento de um sensor amperométrico para a determinação de peróxido de hidrogênio em meio alcalino é proposto utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de níquel (Ni-NP). De acordo com dados da literatura, eletrodos de níquel metálico quando submetidos a varreduras cíclicas de potenciais, utilizando soluções altamente alcalinas como eletrólito suporte, promovem a formação de Ni(III) na superfície do eletrodo, uma espécie bastante catalítica em reações redox. Diversos parâmetros experimentais, tais como: eletrólito suporte, composição do material eletrodico e potencial aplicado foram investigados. Os melhores resultados foram obtidos para eletrodos preparados com EPC contendo 10% de Ni-NP utilizando uma solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ como eletrólito suporte e um potencial fixo de +0,6 V vs. Ag/AgCl. Após otimizadas as condições experimentais, foram realizadas adições sucessivas de uma solução padrão de peróxido de hidrogênio à cela eletroquímica gerando uma curva analítica no intervalo de concentração de $4,4 \times 10^{-4}$ a $4,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

Palavras-chave: Nanopartículas de Níquel, eletrodo de pasta de carbono, peróxido de hidrogênio.

INTRODUÇÃO

A eletroanálise certamente recebeu, e continua recebendo, as maiores contribuições do uso de nanomateriais dentro da química analítica. Em geral, a presença de materiais nanoestruturados como modificadores na construção de sensores eletroquímicos melhora consideravelmente o transporte de massa devido à contribuição da difusão radial, além da diminuição da razão sinal/ruído por apresentar baixa resistência interna [1] e promover efeito electrocatalítico para oxidação ou redução de diversos analitos.

O uso de eletrodos metálicos como sensores eletroquímicos já é bastante difundido na comunidade científica, entretanto, o uso de nanopartículas metálicas como material catalítico utilizado neste tipo de sensores é relativamente recente e ainda pouco explorado. A escolha de nanopartículas de níquel (Ni-NPs) como modificador para o desenvolvimento de um sensor para H₂O₂ vai em encontro com a tendência observada na literatura no que se refere o uso de eletrodos de níquel metálico para a determinação de compostos orgânicos, principalmente carboidratos, alcoóis e aminoácidos. Em geral, a resposta é baseada na formação de espécies de Ni(III) na superfície do eletrodo em meio fortemente alcalino, esta espécie é altamente reativa e promove a oxidação química de uma série de analitos de interesse.

Dentre as várias aplicações do peróxido de hidrogênio, pode-se citar o uso na indústria têxtil para alvejar o algodão. Normalmente, o processo exige o uso em excesso de peróxido em meio alcalino para obtenção de uma fibra extremamente branca. No entanto, o resíduo de H₂O₂ contido no tecido ou na malha branqueada precisa ser removido para garantir um bom tingimento. Caso contrário, o peróxido em contato com pigmentos sensíveis à oxidação podem gerar pequenas alterações na tonalidade, diminuindo a eficiência do processo (quantidades de 15 mg L⁻¹ de peróxido residual causam redução na cor). Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de um sensor capaz de monitorar o nível de H₂O₂, em meio alcalino, a fim de minimizar os problemas na etapa de tingimento de tecidos.

No presente trabalho descreve-se o comportamento eletroquímico de um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de níquel para a determinação amperométrica de peróxido de hidrogênio em meio alcalino. Os principais parâmetros referentes à resposta eletroquímica do eletrodo modificado foram avaliados a fim de se obter os melhores resultados em termos de sensibilidade e seletividade.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As nanopartículas de níquel (Ni-NP) utilizadas neste trabalho foram sintetizadas pelo Grupo de Química de Materiais a partir de uma modificação no método poliol [3]. Os eletrodos de pasta de carbono foram preparados da seguinte forma: 5,0 mg de nujol, 13,0 mg de carbono grafite e 2,0 mg de NP's de níquel, correspondendo a 25,0%, 10,0% e 65,0% respectivamente, totalizando uma massa de 20,0 mg. Toda a massa foi adicionada em um almofariz e macerada durante alguns minutos até a total homogeneização da pasta. Uma parte desta foi colocada na cavidade de

um suporte de plástico em forma de cilindro com 2,5 mm de diâmetro. O contato elétrico foi estabelecido através de um fio de cobre com a secção transversal previamente limpa, aplainada e polida.

Uma solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹, foi utilizada como eletrólito suporte para a realização das medidas eletroquímicas e uma solução de H₂O₂ foi preparada utilizando-se uma solução de peróxido a 30% (m/V) que foi diluída com água 1:10, apresentando assim, uma concentração de 0,882 mol L⁻¹.

As medidas amperométricas foram realizadas por um Potenciostato/Galvanostato µAutolab® Type III, gerenciado pelo software GPES 4.9 EcoChemie® empregando uma célula de três eletrodos. O eletrodo de referência utilizado em todas as medidas foi o de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e um eletrodo de platina como eletrodo auxiliar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização química e eletroquímica

As nanopartículas obtidas foram caracterizadas por difratometria de raios X (DRX), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), análises termogravimétricas (TGA) e microscopia eletrônica de transmissão. Os métodos de caracterização revelaram que as nanopartículas de níquel apresentaram fase cristalina cúbica de face centrada. A porcentagem de metal na amostra foi de aproximadamente 50 % com tamanho médio das partículas de 3,38 nm.

O eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de níquel foi submetido a estudos prévios utilizando voltametria cíclica a fim de elucidar seu comportamento eletroquímico em meio alcalino. Os ciclovoltamogramas obtidos são mostrados na Figura 1..

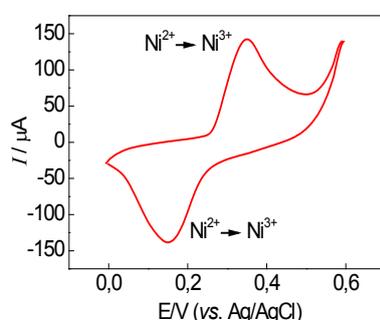


Figura 1. Voltamograma cíclico obtido para um EPC modificado com Ni-NP. Eletrólito suporte: NaOH 1,0 mol L⁻¹, velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.

Podem ser observados picos de correntes em 0,35V (E_{pa}) e 0,15V (E_{pc}) atribuídos à oxidação e redução do par redox Ni²⁺/Ni³⁺ respectivamente. Esse comportamento é característico de um processo quasi-reversível. De acordo com dados da literatura, eletrodos de níquel metálico quando submetidos a varreduras cíclicas de potenciais utilizando soluções fortemente básicas como eletrólito suporte, promovem a formação de óxido-hidróxido de níquel, uma espécie bastante catalítica em reações redox. Sua formação se dá de acordo com as reações [2]: Ni(OH)₂ + OH⁻ ⇌ NiOOH + H₂O + e⁻.

Posteriormente, foi investigado o efeito da composição da pasta de carbono sobre a resposta voltamétrica do EPCM. Nesse estudo a quantidade do modificador (nanopartículas de níquel) na pasta de carbono, foi variada de 5 a 25% m/m. Foi observado um aumento na intensidade das correntes de pico para pastas preparadas com até 20% de Ni-NP. Entretanto, o melhor perfil voltamétrico foi verificado para pasta de composição: 25 % Nujol, 65 % grafite e 10 % NiNP. Sendo assim, essa composição foi adotada para estudos posteriores.

O efeito do pH do eletrólito suporte foi avaliado no intervalo de 10 a 14 para um eletrodo de pasta de carbono modificado com 10% (m/m) de nanopartículas de níquel. Os valores de corrente aumentaram significativamente com o aumento do pH indicando a participação dos íons OH⁻ no processo de transferência eletrônica. Optou-se então por utilizar uma solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ (pH 14) por apresentar um perfil voltamétrico de melhor resolução.

Potencialidade analítica e Desenvolvimento do método

A Figura 2 apresenta o comportamento eletroquímico do EPC modificado com Ni-NPs na ausência (A) e na presença (B) de uma solução de H₂O₂ 1,5 x 10⁻³ mol L⁻¹. Na presença de H₂O₂, observa-se um aumento significativo da corrente de pico anódico seguido da diminuição da corrente de pico catódico, comportamento característico de um processo electrocatalítico.

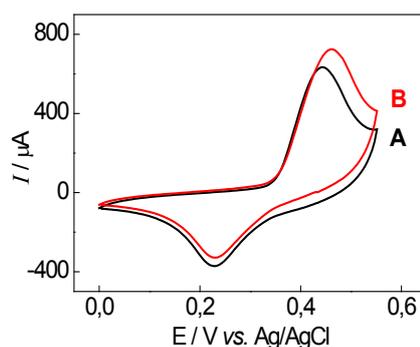


Figura 2. Voltamogramas cíclicos obtidos para um EPC modificado com Ni-NP. Eletrólito suporte: NaOH 1,0 mol L⁻¹ na ausência (A) na presença (B) de H₂O₂ 1,5 x 10⁻³ mol L⁻¹ velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.

Observando os resultados obtidos, fica evidente que o uso do EPCM possibilita a determinação de peróxido em meio alcalino e em potenciais mais convenientes se comparado com a oxidação dessa espécie em um eletrodo não modificado, o que justifica plenamente a sua aplicação. Depois de otimizadas as condições operacionais para o procedimento proposto, medidas cronoamperométricas foram realizadas utilizando-se soluções de H₂O₂ em diferentes concentrações a fim de se obter uma curva analítica. A Figura 3 apresenta o cronoamperograma obtido, bem como a curva analítica.

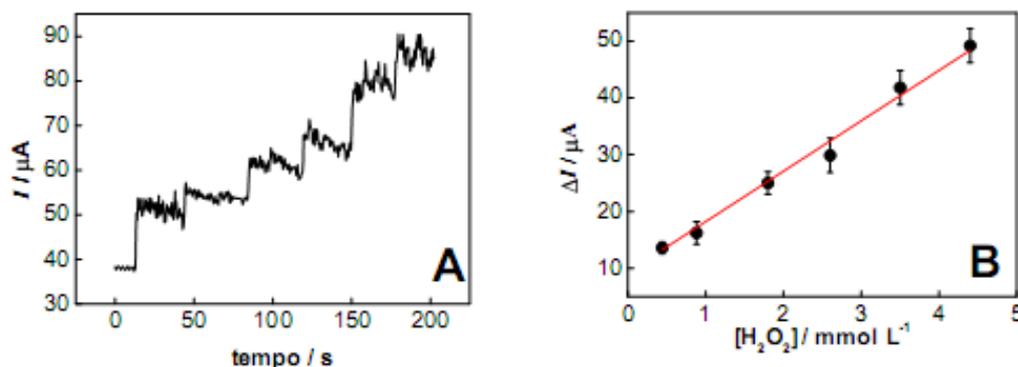


Figura 3. (A) Cronoamperograma obtido para um EPC modificado com Ni-NP e eletrólito suporte NaOH 1,0 mol L⁻¹ na ausência e na presença de diferentes concentrações de H₂O₂ (B) Curva analítica.

Os registros dos valores de corrente (a +0,60 V) geraram uma relação linear com as concentrações de peróxido no intervalo de 4,4 x 10⁻⁴ a 4,4 x 10⁻³ mol L⁻¹. representada pela equação ($I_a / \mu A$) = 9,33 + 8881C onde C é a concentração de peróxido em mol L⁻¹ com um coeficiente de correlação de 0.9948. O limite de detecção foi de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹.

CONCLUSÕES

O uso de eletrodos de pasta de carbono modificados com Ni-NPs mostrou ser um procedimento simples, barato e reproduzível quando aplicado na determinação de peróxido. Em comparação com o EPC não modificado, os resultados obtidos em termos de magnitude de corrente e perfil voltamétrico são significativamente melhores.

AGRADECIMENTOS

CNPq (Proc. 577536/2008-7), Fundação Araucária (219/2010, prot. 15687), NENNAM, UFPR.

REFERÊNCIAS

- [1] Compton, R. G. *et al.*, *Chemical Physics Letters*, 459, 1, 2008.
- [2] Wang, S. *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 933, 2008.
- [3] Couto G. G. *et al.*, *Journal of Colloid and Interface Science*, 311, 461, 2007.

CONSTRUÇÃO DE UM SENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE HIDRAZINA EM BAIXO POTENCIAL DE OXIDAÇÃO A BASE DE NANOTUBOS DE CARBONO E FTALOCIANINA DE COLBALTO

Ana Beatriz Ferreira Vitoreti, Flávio Santos Damos, Rita de Cássia Luz

Departamento de Química – Grupo GEOPIDS - UFVJM, Diamantina - MG - Brasil;
aninhavitoreti@yahoo.com.br

RESUMO: O presente trabalho descreve o desenvolvimento de um método eletroquímico para a determinação de hidrazina em meio neutro empregando um potencial de 0,20V vs Ag/AgCl. A oxidação eletrocatalítica de hidrazina foi conduzida usando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono (NTC) e ftalocianina de cobalto (CoPc). O sensor apresentou um melhor desempenho em tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 6,5. O disco rotatório mostrou-se um bom estudo dos parâmetros cinéticos.

Palavras-chave: Eletrocatalise, Hidrazina, Nanotubos de Carbono, CoPc.

INTRODUÇÃO

Por ser um forte agente redutor, a hidrazina é utilizada como removedor de oxigênio, para controle de corrosão em caldeira e sistemas de aquecimento de água [1]. Outro uso comum da hidrazina é como matéria prima de muitas substâncias usadas na obtenção de plásticos, antioxidantes, polímeros, pesticidas, reguladores de crescimento de plantas e produtos farmacêuticos [2]. A hidrazina também foi reconhecida como uma neurotoxina, agente carcinogênico, e substância de hepatotóxica que afeta fígado bem como os níveis de glutatona no cérebro [3]. Com isso, o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis, sensíveis e robustos para a determinação de hidrazina é de extrema importância atualmente.

Neste sentido, inúmeros métodos analíticos têm sido desenvolvidos para determinação da hidrazina, incluindo métodos espectrofotométricos [4], fluorimétricos [4], quimioluminescentes [5] e cromatográficos [6]. Porém, a maioria destes exige a derivatização de moléculas, apresentam baixa sensibilidade e/ou exigem um tempo elevado durante as medidas limitando a utilização destes métodos. Em geral os métodos eletroquímicos apresentam algumas vantagens sobre os métodos citados anteriormente, incluindo simplicidade, alta sensibilidade e alta frequência analítica. Neste contexto, as técnicas eletroquímicas têm sido exploradas na detecção de inúmeros compostos, incluindo hidrazina. Contudo, o maior problema relacionado com a hidrazina é que ela necessita de um grande sobrepotencial para ser oxidada sobre eletrodos confeccionados nos mais vários materiais, tornando difícil sua eletro-oxidação sobre eletrodos não-modificados [7]. Deste modo, o uso de eletrodos quimicamente modificados que contenham mediadores redox imobilizados sobre suas superfícies tem por propósito diminuir o sobrepotencial de oxidação da hidrazina.

Existe uma larga variedade de combinações de substâncias que tem sido usadas como mediadores de elétrons. Contudo, na maioria dos casos estes sistemas apresentam baixa sensibilidade, e uma pequena resposta linear o que abre espaço para o desenvolvimento de novos materiais de eletrodo para eletro-oxidação de hidrazina em baixos sobrepotenciais.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Um eletrodo de carbono vítreo com área geométrica de 0,071 cm² foi usado na construção do sensor. Após a limpeza do eletrodo com solução de Alumina, 1 mg de nanotubos de carbono (NTC) foi disperso em 1 mL de dimetilsulfóxido usando-se ultra-som para auxiliar o processo de dispersão. Em seguida adicionou-se à dispersão de nanotubos, 1,0 mg de CoPc. Após esta etapa, 10 µL desta dispersão foi adicionada à superfície do eletrodo, deixando o mesmo secar ao ar. As medidas voltamétricas foram conduzidas em uma célula eletroquímica (com capacidade para 5 mL) contendo os eletrodos de Ag/AgCl (eletrodo de referência), platina (eletrodo auxiliar) e carbono vítreo (eletrodo de trabalho).

Os estudos eletroquímicos foram realizados com intuito de otimizar os parâmetros experimentais para identificação da hidrazina. O estudo da influência entre as quantidades de nanotubos de carbono e da ftalocianina de cobalto na resposta do sensor é um fator de fundamental importância uma vez que os mesmos interferem diretamente na resposta do mesmo. Neste sentido, variou-se as proporções de NTC e CoPc, respectivamente, nas composições 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg para os nanotubos e 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg para a ftalocianina de cobalto. A quantidade fixada para o outro composto que não está sendo estudado no caso, foi de 1,0mg e o volume total da solução foi sempre de 1,0mL de DMSO.

Adicionalmente foi feito um estudo da influência da natureza do tampão sobre a resposta do sensor. Assim foram testados quatro diferentes soluções tampão MacIlvaine, Fosfato, Briston-Robnson com concentração 0,1 mol L⁻¹.

Para medidas amperométricas o potencial aplicado tem uma importante influência sobre a resposta do sensor; sendo assim empregou-se os potenciais 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,15; 0,2V com o melhor resultado foi construída uma curva analítica.

Outro estudo realizado foi o de disco rotatório. Neste caso, variou-se o número de giros (rpm) e, posteriormente, a concentração da solução de hidrazina. As rotações variaram em 25, 100, 225, 400, 625 e 900 rpm. Já as concentrações de hidrazina variaram em 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0mM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Influência das condições experimentais na resposta do sensor para hidrazina.

O estudo da influência entre as quantidades de nanotubos de carbono e da ftalocianina de cobalto na resposta do sensor é um fator de fundamental importância, uma vez que os mesmos interferem diretamente na resposta do mesmo. Neste sentido, variou-se as proporções de NTC e CoPc, respectivamente, nas composições 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg mL⁻¹ para os nanotubos e 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg mL⁻¹ para a ftalocianina de cobalto.

As melhores respostas para a hidrazina foram obtidas empregando-se a composição de 2,0 mg de CoPc e 0,5 mg de NTC. As outras proporções forneceram menores correntes de pico.

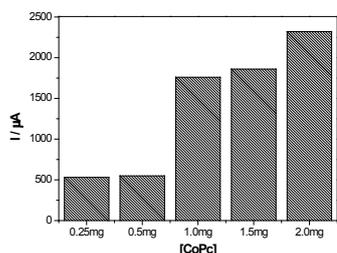


Figura 1: Estudo da quantidade de CoPc quando fixado a quantidade de NTC em 1,0mg.

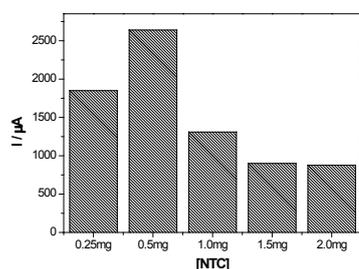


Figura 2: Estudo da quantidade de NTC quando fixado a quantidade de CoPc em 1,0mg.

Foi feito um estudo da influência da natureza do tampão sobre a resposta do sensor. Assim, foram testados três diferentes soluções tampão (MacIlvaine, Fosfato e Briston-Robnson) com concentrações 0,1 mol L⁻¹ e indicou que a solução tampão Fosfato apresentou a melhor resposta.

A influência da concentração do tampão sobre a resposta do sensor foi analisada testando cinco diferentes concentrações do tampão Fosfato de 0,01; 0,025; 0,05; 0,10; 0,25 mol L⁻¹, onde a melhor resposta foi para a concentração de 0,05 mol L⁻¹. Quanto a influência do pH do tampão sobre a resposta sensor, foram testados cinco diferentes pH's do tampão Fosfato de 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 3 8,0, sendo a melhor resposta obtida em pH = 6,5.

Para medidas amperométricas o potencial aplicado tem uma importante influência sobre a resposta do sensor, devido o mesmo contribuir para o aumento da sensibilidade do sistema. Sendo assim empregou-se os potenciais 0,01; 0,025; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20V e foi claramente observado que o sensor apresentou melhor resposta em 0,20 V. Então o potencial 0,20 V foi escolhido como o melhor potencial a ser empregado para a construção da curva analítica.

O estudo cinético foi realizado através da técnica de disco rotatório. Tal estudo foi realizado em diferentes concentrações de Hidrazina separadamente. A rotação variou entre 25rpm, 100rpm, 225rpm, 400rpm, 625rpm e 900rpm (Figura 3). Outro estudo realizado foi da influência da concentração de hidrazina na resposta do sensor. Para isso, fixou-se uma rotação e variou-se a concentração de hidrazina. Como esperado, quanto maior a concentração de hidrazina em solução, maior a corrente (Figura 4).

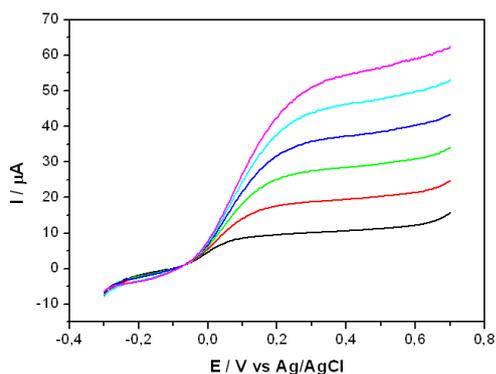


Figura 3: Estudo Rotatório em solução de Hidrazina 0,25mmol. As linhas em preto são referentes à rotação de 25rpm, em vermelho 100rpm, em verde 225rpm, em azul escuro 400rpm, em azul claro 625rpm e em rosa 900rpm.

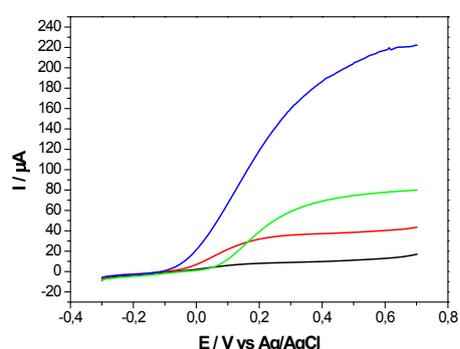


Figura 4: Estudo Rotatório de 400rpm em diferentes concentrações de Hidrazina. Em preto 0,1mmol; em vermelho 0,25mmol; em verde 0,5mmol e em azul 1,0mmol de hidrazina

CONCLUSÕES

Mediante os estudos eletroquímicos e através da variação de alguns parâmetros como: solução tampão, concentração do analito e modificador, rotação do eletrodo, foi possível obter informações importantes sobre a detecção da hidrazina. Verificou-se que a detecção da hidrazina torna-se inviável em baixos potenciais de oxidação se o eletrodo de trabalho não estiver modificado com substâncias eletrocatalíticas; já que a hidrazina oxida somente em potenciais acima de 1 volt.

Um fator importante foi a escolha do eletrocatalisador, após varios testes foi possível concluir que a ftalocianina de cobalto sozinha na superfície do eletrodo, não se dispersa defasando assim a resposta eletroquímica. Contudo uma solução de 0,5 mg de NTC, 2,0mg de CoPc em 1mL de DMSO é uma excelente alternativa para detecção de hidrazina em baixos potenciais de oxidação pois a união destes compostos dispersam o modificador na superfície do eletrodo e apresentam alta sensibilidade.

O método eletroquímico de modificação de eletrodo é um método simples e estável para a determinação deste analito. Adicionalmente, o uso dos nanotubos de carbono mostrou ser de fundamental importância na melhoria da dispersão e atividade do eletrocatalizador.

AGRADECIMENTOS: FAPEMg e CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] Ensafi AA, Rezaei B (1998) Talanta 47: 645
- [2] Song ZH, Wang L, Lu JL, Zhao TZ (2001) Chim Chem Lett 12: 799
- [3] Mori M, Tanaka K, Xu Q, Ikedo M, Taoda H, Hu W (2004) J Chromatogr A 1039: 135
- [4] Li X, Zhang S, Sun C (2003) J Electroanal Chem 553: 139
- [5] <http://pt.wikipedia.org/wiki/Hidrazina>
- [6] Abbaspour, A., Kamyabi, M.A., J. Electroanal. Chem. 576 (1): 73-83, 2005.
- [7] Choudhary, G., Hansen, H., Chemosphere 37 (5) : 801-843, 1998

APLICAÇÃO DE ELETRODO COMPÓSITO À BASE DE NANOTUBOS DE CARBONO E BORRACHA DE SILICONE NA DETERMINAÇÃO DE HIDROCLOROTIAZIDA

Sidney Xavier dos Santos¹ (PG), Priscila Cervini¹ (PQ), Éder Tadeu Gomes Cavalheiro¹ (PQ)

¹ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil;
cavalheiro@iqsc.usp.br

RESUMO: Um eletrodo compósito à base de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) e borracha de silicone foi utilizado na determinação de hidroclorotiazida, uma droga pertencente à classe dos diuréticos tiazídicos. O eletrodo compósito foi preparado misturando-se proporções adequadas de nanotubos de carbono e borracha de silicone, de maneira a obter um compósito com 70% de MWCNT (m/m). O comportamento voltamétrico da hidroclorotiazida foi avaliado por voltametria cíclica em tampão Britton-Robinson pH 7,0. Após otimização dos parâmetros instrumentais amplitude de pulso e velocidade de varredura, o analito foi quantificado por voltametria de pulso diferencial (DPV). Foram obtidas curvas analíticas para definição de intervalos lineares de resposta e limites de detecção. Posteriormente, os procedimentos foram aplicados na determinação de hidroclorotiazida em formulações farmacêuticas utilizando-se o método da adição de padrão. Os resultados foram comparados ao procedimento padrão descrito na farmacopeia brasileira para determinação de hidroclorotiazida.

Palavras-chave: nanotubos de carbono, hidroclorotiazida, eletrodo compósito, borracha de silicone

INTRODUÇÃO

Desde sua obtenção, em 1991 por Iijima [1], os nanotubos de carbono têm sido utilizados em diversas áreas das ciências devido às suas propriedades interessantes. Uma aplicação que tem atraído considerável atenção é o uso do nanotubos de carbono como material de eletrodo, uma vez que apresentam elevada área superficial, alta condutividade elétrica, resistência mecânica, estabilidade química e são capazes de mediar reações de transferência eletrônica com espécies eletroativas em solução.

Os eletrodos compósitos são definidos, de acordo com Tallman e Petersen [2], como um material constituído de pelo menos, uma fase condutora misturada a pelo menos uma fase isolante (solventes orgânicos ou polímeros). Neste caso, a borracha de silicone representaria a fase isolante, enquanto os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) fariam o papel da fase condutora. As principais vantagens dos eletrodos compósitos são a facilidade de preparação do material, possibilidade de incorporação de modificadores, relativa facilidade de renovação de superfície e repetibilidade de área efetiva [3].

Este trabalho descreve a aplicação do eletrodo compósito MWCNT/SR 70% (MWCNT, m/m) na determinação de hidroclorotiazida (HCTZ), ou 6-cloro-3,4-dihidro-7-sulfonamida-2H-1,2,4-benzotiadiazina 1,1-dioxido, em formulações farmacêuticas. A HCTZ é uma droga pertencente à classe dos diuréticos tiazídicos, que são amplamente utilizados como agentes terapêuticos para tratamento da hipertensão arterial e de outras desordens resultantes da retenção de líquidos no corpo. O termo diurético abrange uma série de medicamentos que aumentam a excreção renal de água e eletrólitos [4]. A HCTZ também pode ser administrada em conjunto com outros anti-hipertensivos como β -bloqueadores e inibidores da enzima conversora de angiotensina, potencializando suas ações farmacológicas e diminuindo sua dosagem à níveis que não causem efeitos secundários.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Preparação do eletrodo compósito

Os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT, Aldrich), foram tratados antes da preparação dos eletrodos, a fim de remover carbono amorfo, resíduos metálicos provenientes do processo de produção e também ativar a superfície através da inserção de grupos funcionais e/ou defeitos em suas paredes. No tratamento, os MWCNT foram submetidos à temperatura de 550 °C por 30 min, em seguida foram suspensos em uma mistura de HNO₃/HClO₄ (7:3), agitados em ultrassom por 30 min, refluxados por 2h a 100 °C, filtrados e lavados com água até meio neutro. Após isso, foram secos à 70 °C em estufa à vácuo[5].

Os eletrodos foram preparados misturando-se MWCNT (diam. × length 110-170 nm × 5-9 μ m), após tratamento químico e borracha de silicone comercial (Pulvitec), de maneira a obter os compósitos na proporção de 70% (MWCNT, m/m).

A mistura foi homogeneizada por 10 minutos em almofariz de vidro e inserida em tubos de vidro (ϕ = 3,0 mm). Uma vez inserido no tubo de vidro o compósito foi comprimido com o auxílio de uma barra de cobre (ϕ = 3,0 mm),

em uma prensa hidráulica por 24 h. Após a cura, o contato elétrico foi estabelecido conectando-se um fio de cobre ao compósito com o auxílio de cola de prata (EPO-TEK 410E, Epoxy Technology).

2.2 Equipamentos e procedimento

Os experimentos voltamétricos foram realizados utilizando-se um potenciostato BAS CV-50W, acoplado a um microcomputador e controlado pelo software BAS 2.3.

Uma célula convencional de vidro com capacidade total para 25,0 mL, uma placa de Platina (1 x 0,5 cm) como eletrodo auxiliar e um eletrodo de referência de calomelano saturado (SCE) foram utilizados nos experimentos. Como eletrodos de trabalho, foram utilizados os eletrodos compósitos preparados.

Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente, desaerando-se a solução por borbulhamento de nitrogênio. Foram realizados estudos de otimização de pH e de otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de pulso diferencial (DPV). Em seguida foram obtidas curvas analíticas em triplicata, e posteriormente o método da adição de padrão foi utilizado na quantificação de HCTZ em amostras de medicamentos. Os resultados foram comparados àqueles obtidos pelo método oficial descrito na farmacopeia brasileira [6].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em voltametria cíclica, a HCTZ apresentou apenas um pico de oxidação irreversível em aproximadamente 0,8 V vs. SCE, no intervalo de 0,5 a 1,1 V. O estudo do efeito do pH foi realizado entre 4,0 e 10,0 utilizando-se DPV, sendo pH 7,0 o valor otimizado. Na otimização dos parâmetros instrumentais, o valores escolhidos para velocidade de varredura e amplitude de pulso foram 25 mV s⁻¹ e 50 mV, respectivamente.

Curva analítica

Após a otimização das condições experimentais, as medidas voltamétricas foram realizadas em solução tampão B-R pH 7,0, em diferentes concentrações de HCTZ a fim de se obter uma curva analítica (em triplicata). Os voltamogramas obtidos estão apresentados na Figura 1.

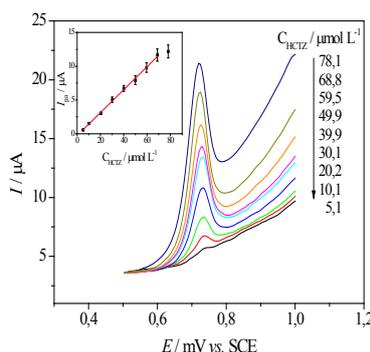


Figura 1: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodo compósito MWCNT/SR em solução tampão B-R pH 7,0. No detalhe, a curva analítica obtida. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de pulso = 50 mV.

A curva analítica foi obtida medindo-se as correntes de pico de três medidas sucessivas em DPV para cada concentração. Os resultados apresentaram uma região linear, no intervalo de 5,0 a 70,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 8$), no potencial de pico +0,73 V (vs. SCE) obedecendo à Equação 1:

$$I_p = -0,45801 \mu\text{A} + 0,17401 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L} \times C_{\text{HCTZ}}, \quad (r = 0,9987, n = 8) \quad (1)$$

em que I_p é a corrente de pico (μA) e C_{HCTZ} é a concentração total de hidroclorotiazida (mol L^{-1}). O limite de detecção (LOD) obtido foi de 2,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Também foi obtida uma curva analítica utilizando o eletrodo grafite borracha de silicone (GSR) 70% (grafite, m/m) para comparação. As condições empregadas foram as mesmas aplicadas ao eletrodo MWCNT/SR. Neste caso, foram observadas duas regiões lineares, a primeira apresentou a seguinte Equação de reta:

$$I_p = 0,06683 \mu\text{A} + 0,03214 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L} \times C_{\text{HCTZ}}, \quad (r = 0,9946, n = 4) \quad (2)$$

com LOD calculado como sendo igual a 4,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A segunda região linear apresentou a seguinte Equação de reta:

$$I_p = 0,7489 \mu\text{A} + 0,01173 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L} \times C_{\text{HCTZ}}, \quad (r = 0,9963, n = 5) \quad (3)$$

A Tabela 1 compara as figuras de mérito obtidas para as curvas analíticas obtidas, sob as mesmas condições, com os eletrodos MWCNT/SR e GSR. O eletrodo MWCNT/SR apresentou maior sensibilidade, como pode ser observado pelos coeficientes angulares descritos nas Equações 1 e 2, e menor limite de detecção.

Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos a partir das curvas analíticas

Eletrodo	Região linear / $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Sensibilidade/ $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$
MWCNT/SR	5,0 a 70,0	2,6	0,17
GSR	1 ^a) 5,0 a 30,0	4,6	0,034
	2 ^a) 40,0 a 80,0	-	0,012

Análise de hidroclorotiazida em formulações farmacêuticas

O método da adição de padrão foi utilizado para a determinação de HCTZ nas formulações farmacêuticas Clorana[®] e Tenadren[®] utilizando a técnica DPV. Os resultados obtidos foram comparados àqueles obtidos pelo método HPLC, descrito como método oficial na farmacopéia brasileira [6] e estão apresentados na Tabela 2. Os resultados obtidos por DPV concordaram com o obtido pelo procedimento HPLC com 95% de confiança, de acordo com o teste *t*-Student.

Tabela 2: Análises de HCTZ (mg/comprimido) em amostras comerciais

	HCTZ (mg/comprimido)		Erro relativo / %
	DPV	HPLC	EI
Clorana ^{® a}	29,5	27,8	+6,0
Tenadren ^{® b}	15,0	14,7	+2,0

^a Rótulo: 25 mg/comprimido

^b Rótulo: 12,5 mg/comprimido

EI: Erro do método DPV em relação ao método HPLC. (DPV-HPLC)/HPLC x 100.

Os testes de adição e recuperação para HCTZ no intervalo de 10,0 a 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ resultaram em recuperações entre 92,1 a 104,2% para Clorana[®] e entre 95,8 e 100,4% para Tenadren[®]. Assim, o método de adição de padrão foi eficiente para determinação de HCTZ sem interferência de outros componentes das formulações farmacêuticas.

CONCLUSÕES

O eletrodo MWCNT/SR foi aplicado com sucesso na determinação de HCTZ, sendo sua principal vantagem, a possibilidade de determinação rápida sem necessidade de renovação de superfície. Foram obtidos resultados comparáveis aos obtidos pelo método oficial descrito na farmacopéia brasileira, com 95 % de confiança de acordo com o teste *t*-Student.

AGRADECIMENTOS: FAPESP, CAPES, CNPq e Procontes/USP.

REFERÊNCIAS

- [1] IJIMA, S. Helical microtubes of graphitic carbon. *Nature*, 354:56-58, 1991.
- [2] TALLMAN, D.E.; PETERSEN, S.L. Composite electrodes for electroanalysis-principles and applications. *Electroanalysis*, 2:499-510, 1990.
- [3] KALCHER, K.; KAUFFMANN, J.M.; WANG, J.; SVANCARA, I.; VYTRAS, K.; NEUHOLD, C.; YANG, Z. Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: A review with particular emphasis on the period 1990-1993. *Electroanalysis*, 7:5-22, 1995.
- [4] MARTIN, M.E.; HERNANDEZ, O.M.; JIMENEZ, A.I.; ARIAS, J.J.; JIMENEZ, F. Partial least-squares method in analysis by differential pulse polarography. Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations. *Analytica Chimica Acta*, 381:247-256, 1999.
- [5] LIN, X.Q.; HE, J.B.; ZHA, Z.G. Simultaneous determination of quercetin and rutin at a multi-wall carbon-nanotube paste electrodes by reversing differential pulse voltammetry. *Sensors and Actuators B*, 119:608-614, 2006.
- [6] FARMACOPÉIA Brasileira. 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 33.

APLICAÇÃO DE UM ELETRODO COMPÓSITO IMPRESSO À BASE DE GRAFITE E POLIURETANA NA DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL

Thalita Rocha Saciloto¹ (PG), Priscila Cervini¹ (PQ), Éder Tadeu Gomes Cavalheiro¹(PQ)

¹Instituto de Química de São Carlos- USP, São Carlos - SP - Brasil.
cavalheiro@iqsc.usp.br

RESUMO: Este trabalho apresenta uma aplicação de um eletrodo compósito impresso à base de grafite e poliuretana, na determinação de paracetamol. Após otimização dos parâmetros, o comportamento voltamétrico do paracetamol no eletrodo impresso foi avaliado por voltametria cíclica em tampão fosfato pH 6,0. Foram obtidas curvas analíticas para definição de intervalos lineares de resposta e limites de detecção. Posteriormente, os procedimentos foram aplicados na determinação de paracetamol em formulação farmacêutica utilizando-se o método da adição de padrão, com um erro de 0,4%. O APAP foi usado como modelo devido ao seu comportamento voltamétrico conhecido e pela sua estrutura química relativamente simples.

Palavras-chave: eletrodo impresso, compósito, poliuretana, paracetamol.

INTRODUÇÃO

A crescente demanda por sensores descartáveis e equipamentos portáteis para a descentralização de análises químicas exige o emprego de tecnologias de produção em massa. Embora nenhuma tecnologia tenha sido ainda aceita como única, ou ao menos preferencial, na elaboração de eletrodos descartáveis, o uso de “*screen-printing*” vem crescendo em popularidade e pode se tornar uma técnica padrão, particularmente devido à sua simplicidade e adequação a laboratórios em geral. A tecnologia de “*screen-printing*”, também conhecida como “*silk-screen*”, tem sido empregada com grande sucesso na fabricação de eletrodos nesta última década. Ao mesmo tempo em que possibilita a produção em massa de eletrodos a um custo extremamente baixo, é simples e pode ser praticada em qualquer laboratório, sendo apropriada para produção de eletrodos descartáveis [1].

Um dos principais aspectos dos EIs, que os tornam extremamente atrativos quando se busca o desenvolvimento de sensores comerciais, é a possibilidade de total automação na fabricação de um sistema completo contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, todos impressos e contidos no mesmo suporte. Esta característica, associada à simplicidade de elaboração e às inúmeras possibilidades de modificação dos EIs, promete colocar a técnica em uma posição privilegiada entre as demais [1].

O eletrodo impresso (EI) é simplesmente um filme depositado sobre um suporte inerte, geralmente de PVC ou cerâmica. Em geral, este filme é parcialmente coberto por uma segunda camada de um isolante para definir uma área de contato elétrico numa extremidade e outra área para ser a superfície do eletrodo na outra extremidade.

Neste trabalho, o eletrodo compósito impresso à base de grafite e poliuretana (EIGPU), que foi desenvolvido e caracterizado anteriormente, foi utilizado na determinação de paracetamol (APAP) em uma formulação farmacêutica, usando voltametria cíclica, para avaliar a resposta voltamétrica do eletrodo compósito. O APAP foi usado como modelo devido ao seu comportamento voltamétrico conhecido e pela sua estrutura química relativamente simples.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Equipamento

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se um potenciostato-galvanostato AUTOLAB PGSTAT-30 (Ecochemie), acoplado a um microcomputador e controlado com um programa GPES (Ecochemie).

Medidas Voltamétricas

Uma curva analítica foi obtida utilizando o compósito EIGPU, em voltametria cíclica, com velocidade de 25 mVs⁻¹, variando a concentração de APAP de 1 a 100 µmol L⁻¹, em tampão fosfato pH 6,0, e em seguida, o método da adição de padrão foi utilizado na quantificação de APAP em amostra do medicamento Tylenol[®] 750 mg.

Preparação do eletrodo

Aplicação de uma tinta à base de PU[3] sobre uma placa de PVC de 0,3 mm de espessura, através de uma máscara plástica. Em seguida, aplicou-se uma cola de prata para definir o eletrodo de referência e um isolante de resina PU.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O voltamograma cíclico apresentado na Figura 1 mostra o comportamento voltamétrico do APAP, utilizando o eletrodo composto impresso à base de grafite e poliuretana. Pode-se observar que o pico de oxidação do APAP ocorre em aproximadamente 340 mV, no intervalo de -0,4 a 0,8 V.

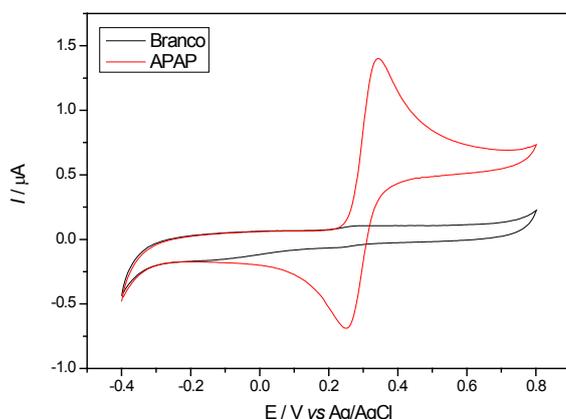


Figura 1: Voltamograma cíclico obtido para o EIGPU em solução 1,0 mmol L⁻¹ de APAP em tampão fosfato pH 6,0 v = 25 mV s⁻¹.

Uma curva analítica foi obtida para o APAP, sem necessidade de renovação de superfície entre determinações sucessivas, em um intervalo de concentração de 1 a 100 μmol L⁻¹ (Figura 2).

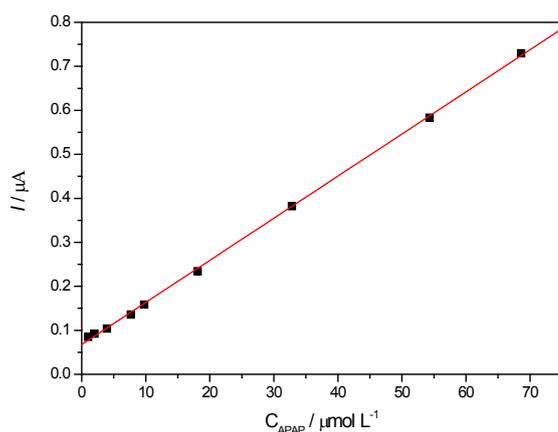


Figura 2: Curva analítica obtida para o composto EIGPU, utilizando solução de APAP entre 1 a 100 μmol L⁻¹ em tampão fosfato pH 6,0, em voltametria cíclica, com v = 25 mV s⁻¹.

A curva analítica foi obtida medindo-se as correntes de pico para cada concentração. Os resultados apresentaram uma região linear em todo o intervalo estudado, obedecendo à Equação 1:

$$I_p = 6,8 \times 10^{-2} \mu\text{A} + 9,6 \times 10^{-3} \mu\text{A} \mu\text{mol}^{-1} \text{L} \times C_{\text{APAP}} \quad (r = 0,9997, n = 9) \quad (1)$$

em que I_p é a corrente de pico (μA) e C_{APAP} é a concentração total de paracetamol (μmol L⁻¹). O limite de detecção (LOD) encontrado foi de $8,18 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, determinado como $\text{LOD} = 3 S_d/b$ [2].

A aplicabilidade do composto EIGPU foi verificada analisando uma formulação farmacêutica. Os resultados estão descritos na Tabela 1:

Tabela 1: Determinação de paracetamol em uma formulação farmacêutica utilizando o composto EIGPU em voltametria cíclica

Amostra	Paracetamol (mg /tablete)		^a E %
	Rotulado	Cíclica	
Tylenol	750	753 ± 0,91	0,4

^aE = Cíclica vs. rotulado (Cíclica-rotulado/rotulado) x 100%

As adições de APAP padrão à solução da formulação farmacêutica mostraram recuperações entre 98 e 102%, para adições de 10 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que o compósito EIGPU apresenta desempenho satisfatório na determinação voltamétrica de APAP em formulações farmacêuticas.

AGRADECIMENTOS: FAPESP (2010/05913-6, 2010/06485-8, 2010/11080-7), CAPES, CNPq e PROCONTES/ USP.

REFERÊNCIAS

- [1] VALBERES, B. N.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por Silk-Screen. *Química Nova*, v.21,n.5, p.614 – 626, 1998.
- [2] LONG, G.L.; WINEFORDNER, J.D. “Limit of Detection”, *Anal. Chem.*, 55:712A–724A, 1983.
- [3] MENDES, R.K.; CLARO-NETO, S.; CAVALHEIRO, E.T.G. Evaluation of a new rigid carbon-castor oil polyurethane composite as an electrode material. *Talanta*, v. 57, 909-917, 2002.

OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS GEOMÉTRICOS EM ELETRODOS COMPÓSITOS IMPRESSOS DESCARTÁVEIS À BASE DE GRAFITE E POLIURETANA

Fellipy Ferreira¹ (IC), Thalita Rocha Saciloto¹ (PG), Priscila Cervini (PQ), Éder Tadeu Gomes Cavalheiro¹ (PQ)

¹Instituto de Química de São Carlos- USP, São Carlos - SP - Brasil. cavalheiro@iqsc.usp.br

RESUMO: Este trabalho apresenta um estudo das diferentes formas geométricas dos eletrodos compósitos impressos descartáveis à base de grafite e resina poliuretana, a fim de avaliar de que forma essas diferenças interferem na resposta voltamétrica dos eletrodos. Nesses estudos foi utilizado em Ferricianeto de Potássio em meio de KCl e Hidroquinona em meio de tampão acetato pH 4,0, em voltametria cíclica, como sonda eletroquímica. Os resultados mostram que não há diferença significativa entre os eletrodos com as diferentes geometrias, em termos de intensidade de corrente (I_p) e diferença de potencial (ΔE).

Palavras-chave: screen-printed electrodes, eletrodos compósitos, ferricianeto de potássio, hidroquinona

INTRODUÇÃO

A reprodutibilidade da área ativa de eletrodos sólidos representa forte limitação ao seu uso, apesar das potencialidades inclusive comerciais desse tipo de eletrodo em áreas como medicina, indústria, farmacêutica e ambiental. Em adição, deve-se considerar que não há procedimentos únicos ou definitivos para essa regeneração, que depende fortemente da atuação do operador. Os eletrodos impressos representam uma alternativa promissora na solução desse problema. A tecnologia de “screen-printing” é uma técnica frequentemente utilizada na fabricação desses eletrodos para o desenvolvimento de sensores e/ou biossensores eletroquímicos descartáveis[1].

O eletrodo impresso (EI) é simplesmente um filme depositado sobre um suporte inerte, geralmente de PVC ou cerâmica. Em geral, este filme é parcialmente coberto por uma segunda camada de um isolante para definir uma área de contato elétrico numa extremidade e outra área para ser a superfície do eletrodo na outra extremidade, formando um sistema completo, contendo o eletrodo de trabalho, o eletrodo auxiliar e o eletrodo de referência todos contidos e impressos em um mesmo suporte[1].

Neste trabalho, um eletrodo compósito impresso à base de grafite e poliuretana (EIGPU), foi preparado com diferentes geometrias, a fim de avaliar o efeito na resposta voltamétrica, usando voltametria cíclica. Esses estudos foram feitos em Ferricianeto de Potássio em meio de KCl e em Hidroquinona em meio de tampão acetato, como sondas eletroquímicas. Em seguida, avaliou-se também o efeito do tratamento com ultrassom na resposta voltamétrica do eletrodo.

A hidrofobicidade deste tipo de material eletródico aliada às diversas vantagens desse tipo de eletrodo, como simplicidade, versatilidade, portabilidade, baixo custo e capacidade de produção em massa, explicam seu uso em diversos campos da química analítica.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Equipamento

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se um potenciostato-galvanostato AUTOLAB PGSTAT-30 (Ecochemie), acoplado a um microcomputador e controlado com um programa GPES (Ecochemie) e a fonte de ultrassom utilizada foi um banho Unique USC-1400.

Fabricação dos eletrodos impressos

Os eletrodos foram preparados em com quatro geometrias diferentes. Três em relação ao contra eletrodo e uma em relação ao eletrodo de referência, como mostra a Figura 1:

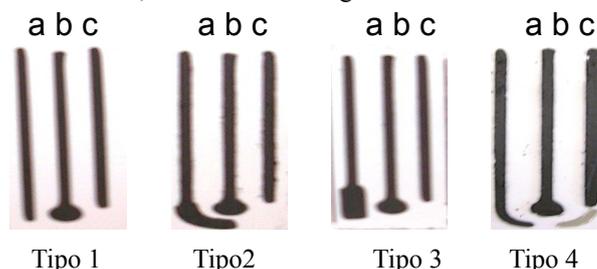


Figura 1: Eletrodos impressos com as diferentes geometrias. Eletrodos: (a) auxiliar; (b) trabalho; (c) referência

Medidas Voltamétricas

Foram analisados quatro eletrodos, cada um com uma geometria, e os voltamogramas cíclicos foram obtidos em solução $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em meio de $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e em solução de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de hidroquinona (HQ) em tampão acetato pH 4,0. Para efeito comparativo foi utilizado um eletrodo à base de carbono comercial da DropSens®.

No estudo com ultrassom, um eletrodo foi submetido a 10, 20 e 30 minutos, sendo metade do tempo em álcool isopropílico e metade em água destilada. Em seguida, foram obtidos voltamogramas cíclicos dos mesmos em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, para as diferentes geometrias e para o eletrodo comercial.

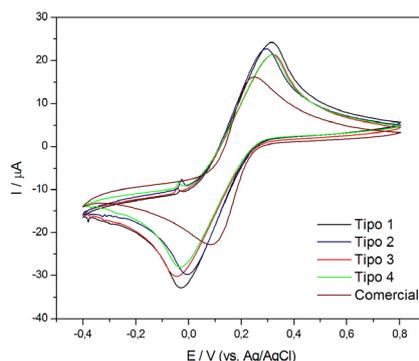


Figura 2: Voltamogramas cíclicos obtidos em $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, para os 4 tipos de geometrias e para o eletrodo comercial, no intervalo de $-0,4$ a $0,8 \text{ V}$ e $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$

A Tabela 1 apresenta os valores de corrente (I_{pa} e I_{pc}) e a diferença de potencial (ΔE_p) obtida nas medidas voltamétricas.

Tabela 1: Valores de corrente e diferença de potencial obtidos com solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol L^{-1} em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$

	$I_{pa} / \mu\text{A}$	$I_{pc} / \mu\text{A}$	$\Delta E_p / \text{mV}$
Tipo 1	24,1	-33,1	345
Tipo 2	22,8	-30,1	300
Tipo 3	21,4	-30,5	361
Tipo 4	21,3	-28,4	347
Comercial	16,2	-23,0	160

Os voltamogramas cíclicos obtidos em Hidroquinona $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,0, para as diferentes geometrias e para o eletrodo comercial estão apresentados na Figura 3. Nota-se que no eletrodo comercial os picos de oxidação e redução da HQ aparecem em potenciais menores que nos EIGPU's.

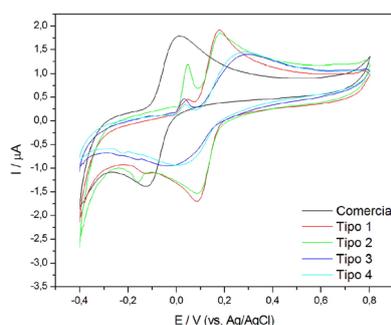


Figura 3: Voltamogramas cíclicos obtidos em $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de hidroquinona em meio de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0, para as 4 geometrias e para o eletrodo comercial, no intervalo de $-0,4$ a $0,8 \text{ V}$ e $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

A **Tabela 2** apresenta os valores de corrente (I_{pa} e I_{pc}) e a diferença de potencial (ΔE) obtida nas medidas voltamétricas.

Tabela 2: Valores de corrente e diferença de potencial obtidos com solução Hidroquinona

	$I_{pa} / \mu\text{A}$	$I_{pc} / \mu\text{A}$	$\Delta E_p / \text{mV}$
Tipo 1	1,59	-1,50	0,079
Tipo 2	1,35	-1,29	0,091
Tipo 3	0,88	-0,70	0,327
Tipo 4	0,99	-0,81	0,278
Comercial	1,44	-0,99	0,144

O efeito do ultrassom está apresentado na Figura 4:

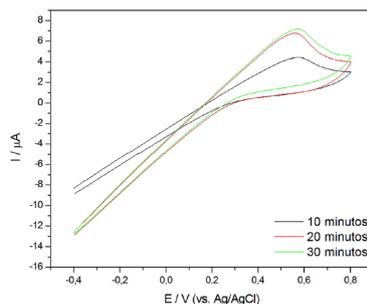


Figura 4: Voltamogramas cíclicos obtidos com 10, 20 e 30 minutos no ultrassom, em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

Nota-se que a aplicação do ultrassom causa perda de resposta voltamétrica, com perfil resistivo da curva I vs E .

CONCLUSÕES

As diferenças geométricas não provocam alterações significativas em termos de intensidade de corrente e diferença de potencial, porém esses parâmetros são melhores quando comparados com o eletrodo comercial. O tratamento do eletrodo no ultrassom provoca proporcional piora na resposta voltamétrica. Isso pode ser explicado por um possível descolamento do material polimérico com consequente ruptura do compósito, causando perda de contato elétrico.

AGRADECIMENTOS: FAPESP (2010/05913-6, 2010/06485-8, 2010/11080-7), CAPES, CNPQ

REFERÊNCIAS

- [1] VALBERES, B. N.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por Silk-Screen. *Química Nova*, v.21,n.5, p.614 – 626, 1998.

DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA EMPREGANDO BIOSSENSOR ENZIMÁTICO BASEADO EM NANOTUBO DE CARBONO MULTI PAREDE E EXTRATO BRUTO DE ABOBRINHA

Fabiola Araújo S. Ribeiro¹, Arnaldo César Pereira¹(PQ)

¹ Departamento de Ciências Naturais - UFSJ, São João del Rei - MG – Brasil.

fabiolaribeirog@yahoo.com.br

RESUMO: Um biossensor enzimático é proposto para a determinação de dopamina, usando pasta de nanotubo de carbono modificada com peroxidase obtida a partir do extrato bruto de abobrinha. Parâmetros analíticos que influenciam na performance do biossensor como quantidade de enzima, concentração de peróxido de hidrogênio, pH e tipo de tampão foram avaliados. A melhor resposta do biossensor foi obtida utilizando 1,10 U mg⁻¹ de enzima na pasta de nanotubo de carbono, tampão fosfato 0,1 M (pH=7,0), contendo 50 µM de H₂O₂. Sob condições experimentais otimizadas a faixa linear de resposta de 20 a 1700 µmol L⁻¹ para a dopamina foi obtida com sensibilidade de 220 µA/µmol L⁻¹ e limite de detecção de 5,86x10⁻⁷ mol L⁻¹.

Palavras-chave: dopamina, biossensor, extrato bruto de abobrinha

INTRODUÇÃO

A dopamina é um neurotransmissor que pertence ao grupo das catecolaminas e exerce uma grande importância para o sistema nervoso, por ser a forma de comunicação entre os neurônios. Baixo nível de dopamina tem sido associado a patologias de síndrome neurológica como a Doença de Parkinson e Esquizofrenia [1]. A Doença de Parkinson é uma síndrome neurodegenerativa, a qual apresenta como principal característica patológica a perda seletiva de neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra cerebral [2]. Neste sentido a determinação quantitativa deste neurotransmissor é importante para diagnóstico, monitoramento e intervenção farmacológica.

Vários métodos, dentre eles os cromatográficos, espectrofotométricos e fluorimétrico, tem sido utilizado para a detecção e quantificação deste neurotransmissor tanto em amostras farmacêuticas quanto em análise clínica. Entretanto, esses métodos exigem um longo tempo de análise, altos custos e não possibilitam medidas diretas *in vivo* e em tempo real. Dessa forma, os biossensores enzimáticos estão se tornando muito úteis em aplicações analíticas, devido à possibilidade de se combinar a seletividade e a sensibilidade da enzima com a simplicidade dos transdutores eletroquímicos [3].

O uso de biossensores baseado em materiais nano-estruturados como nanotubos de carbonos (NTCs) vem sendo amplamente investigado devido ao comportamento desse material. O uso de NTCs é relevante devido ao seu potencial elétrico, químico, mecânico e suas propriedades estruturais [5].

A enzima peroxidase tem sido amplamente usada na construção de biossensores para determinação de compostos fenólicos e catecólicos, uma vez que esses melhoram a taxa de transferência de elétrons entre o eletrodo e a enzima imobilizada. Baseada neste contexto é proposto a determinação de dopamina a partir de um biossensor enzimático utilizando como fonte enzimática o extrato bruto de abobrinha (*Curcubita pepo*), obtida a partir do método proposto por Fatibello [6], a qual foi imobilizada na pasta de nanotubo de carbono, buscando avaliar o desempenho do biossensor na detecção da dopamina.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Preparação do Extrato Bruto de abobrinha

O extrato bruto de abobrinha (*Curcubita pepo*), fonte de peroxidase, foi obtido a partir do seguinte procedimento: uma massa de 25,0 g do vegetal descascado, foi picado e homogeneizados em um liquidificador com 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH=6,5) e 2,5 g de agente protetor (PVPs). O homogenato foi filtrado em 4 camadas de gaze e centrifugado a 25000xg (18000 r.p.m) durante 15 min, a 4 °C. A solução sobrenadante foi armazenada em refrigerador a 4 °C e usadas como fonte enzimática [6].

Determinação da atividade da enzima.

A atividade da enzima foi determinada a partir do método de Fatibello, onde a atividade foi determinada medindo-se a variação de absorbância em 470 nm do tetraguaiacol formado na reação enzimática. Nessa determinação foram utilizados 0,2 mL da solução sobrenadante (homogenato), 2,7 mL da solução de guaiacol 0,05 mol L⁻¹ e 0,1 mL da solução de peróxido de hidrogênio 10,3 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH=6,5), a 25 °C. Uma unidade de atividade (unidades/mL) é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto nas condições mencionadas[6].

Preparação do biossensor.

A enzima foi imobilizada no CNTs por adsorção empregando 10 mg de NTC, 1 mg de grafite, 30 μL de óleo mineral e 100 μL de extrato vegetal de abobrinha. Depois que este sistema foi manualmente misturado a pasta foi colocada dentro da cavidade de um tubo de vidro. Na parte interior do tubo foi colocado um fio de platina e conectado com um fio de níquel/cromo para fazer o contato elétrico.

Medida Eletroquímica

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando um AUTOLAB PGSTAT302N interfaciado com um computador contendo o software GPES 4.9. Todas as medidas eletroquímicas foram feitas utilizando um sistema convencional de uma célula com três eletrodos: eletrodo de referencia Ag/AgCl, fio de platina como contra eletrodo e o biossensor como eletrodo de trabalho. As medidas voltamétricas foram feitas em solução de 5,0 mL de tampão contendo H_2O_2 usando medidas de corrente-tempo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos relacionados ao processo de oxidação da dopamina

O processo de oxidação eletrocatalítico da dopamina foi obtido através da análise da corrente de pico anódico (I_{pa}) dos voltamogramas cíclicos. De acordo com o modelo teórico de Andrieux e Sev ant um sistema se comporta como um processo catalítico e totalmente irreversível controlado por difusão quando é possível estabelecer uma relação linear entre a I_{pa} e a raiz quadrada da velocidade de varredura. A partir dessa informação e da análises de voltamogramas, um gráfico da I_p versus a raiz quadrada de v foi construído (Figura 1), que mostra que o processo de oxidação da dopamina sobre o biossensor é controlado por difusão.

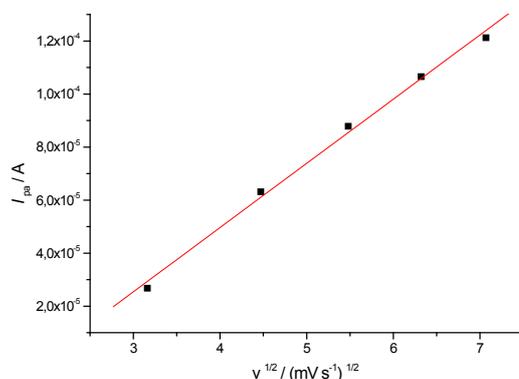


Figura 1: Relação entre I_{pa} versus a raiz quadrada da velocidade de varredura

Otimização da quantidade de enzima no biossensor

A Figura 2 mostra que a quantidade de enzima utilizada influencia na performance do biossensor, sendo que a intensidade de corrente obtida aumenta com a quantidade da enzima imobilizada até 1,10 unidades de peroxidase adicionada a pasta, decrescendo para concentrações superiores, escolhendo portanto essa quantidade para o preparo do biossensor.

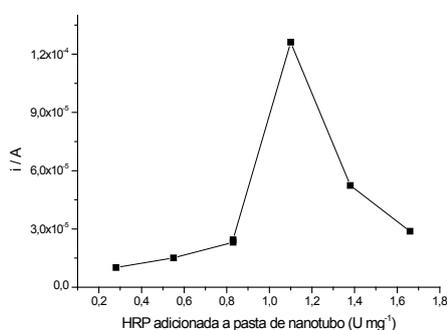


Figura 2. Efeito da quantidade de HRP adicionada a pasta de carbono para a resposta da dopamina. Medidas foram feitas em tampão fosfato ($\text{pH} = 6,5$) contendo 20 μM H_2O_2 .

Influência do pH e tipo de tampão

A melhor resposta do biossensor foi obtida em pH = 7,5 em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹. Medidas feitas para diferentes soluções tampão (Tris, Hepes, Pipes, acetato e fosfato) em concentração de 0,1 M evidenciou que a melhor resposta foi obtida em tampão fosfato. Assim, essas condições foram adotadas para estudos subseqüentes.

Avaliação da concentração de peróxido de hidrogênio.

O substrato natural da peroxidase (peróxido de hidrogênio) é essencial para a resposta do biossensor e sabe-se que altas concentrações de peróxido podem causar inativação da enzima [7]. A concentração de 50 µM foi escolhida por apresentar uma melhor resposta do biossensor como visto na (Figura 3).

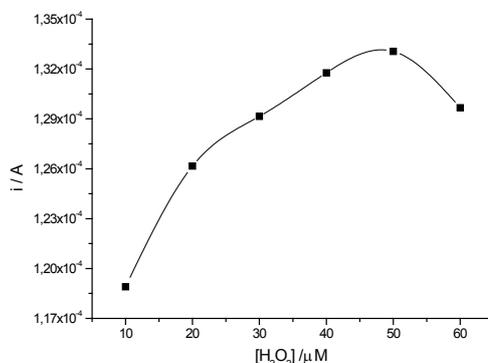


Figura 3. Efeito da concentração de peróxido na resposta do biossensor, em tampão fosfato (pH = 7,5; 0,1 M)

Características do biossensor

A curva de calibração para a dopamina com o biossensor proposto foi obtida, empregando-se as condições de trabalho previamente otimizadas e apresentou uma faixa linear de resposta no intervalo de concentrações entre 20 a 1700 µ mol L⁻¹ de dopamina, ajustado pela equação da reta $\Delta i = 2.99 + 0.02119$ [dopamina], com coeficiente de correlação, $R = 0,99879$ (n=22), onde a variação da corrente, Δi , é dada em 1×10^{-5} A e a concentração da catecolamina em 1×10^{-5} mol L⁻¹. A sensibilidade foi 220 µA/ µmol L⁻¹ e o limite de detecção estimado para este intervalo foi $5,86 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

Comparando a faixa de resposta e o LOD encontrados pelo dispositivo aqui proposto com trabalhos relatados na literatura como, por exemplo, o de Lupetti e colaboradores [8] os quais utilizando um sistema de análise por injeção em fluxo com extrato bruto de abacate para determinação de dopamina obtiveram uma faixa linear de resposta de $5,2 \times 10^{-5}$ a $5,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de dopamina com limite de detecção de $1,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e o trabalho de Pravda e colaboradores [9] que investigaram o desempenho de um biossensor amperométrico preparado a base de pasta de carbono modificada com tirosinase para a determinação de catecolaminas por HPLC, apresentou LOD para dopamina igual a 1 µM, podemos verificar que o biossensor proposto neste trabalho apresentou um desempenho melhor que os citados acima.

CONCLUSÕES

O trabalho relatou a viabilidade em se determinar dopamina a partir de biossensor cujo material enzimático foi obtido a partir do extrato vegetal. Além disso, as principais vantagens como determinação e rapidez da análise, aliada ao baixo custo e simplicidade de construção do biossensor, o torna um dispositivo com elevado potencial para a determinação deste neurotransmissor.

AGRADECIMENTOS: CAPES, FAPEMIG, Departamento de Ciências Naturais da UFSJ.

REFERÊNCIAS

- [1] Njagi J., Chernov M.M., Leiter J.C. and Andreescu Silvana, Anal. Chem. 82:989-996, 2010.
- [2] Visish M., Prabhakar S., Dhullar M., Verma I., Anand A., Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry 81(2): 166-170, 2010
- [3] Pereira A.C., Aguiar M.R., Kisner A., Macedo D.V., Kubota L.T., Sensors and Actuators B.124:269-276, 2006.
- [4] Pereira A.C., Santos A.S. e Kubota L.T., Quim. Nova 25(6):1012-1021, 2002.
- [5] Santos A.S., Pereira A.C., Duran N., Kubota L.T., Electrochem. Acta.52:215-220, 2005.
- [6] Filho O.Fatibello, Vieira I. Cruz, Quim. Nova 25(3):455-464, 2002.
- [7] Castilho T.J., Sotomayor M. Del P.T., Kubota L.T., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37:785-791,2005.
- [8] Lupetti Karina Omuro, Ramos Luiz Antônio e Filho Orlando Fatibello, Quim. Nova 26(2):197-201,2003.
- [9] Pravda M., Petit C., Michotte Y., Kauffmann J.M., Vytras K., Journal of Chromatography A 727:47-54,1996.

SENSOR PARA DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE H_2O_2 BASEADO EM FILMES LbL DE POLIETRÓLITO SILSESQUIOXANO

Cliciane G. de Jesus¹, Sérgio T. Fujiwara², Valtencir Zucolotto³, Karen Wonhrath¹ e Christiana A. Pessoa¹

¹ Departamento de Química - UEPG, Ponta Grossa - PR - Brasil; ² Departamento de Química - UNICENTRO, Guarapuava - PR - Brasil, ³ Instituto de Física - USP, São Carlos - SP - Brasil.
clicianeg@bol.com.br

RESUMO: Filmes nanoestruturados formados pelos polieletrólitos cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano ($SiPy^+Cl^-$) e ftalocianina tetrassulfonada de cobre ($CuTsPc$) foram produzidos através da técnica eletrostática Layer-by-Layer (LbL). O crescimento das bicamadas foi acompanhado por espectroscopia na região do UV-Vis a partir do aumento da absorvância da banda Q da ftalocianina. Estes filmes foram empregados na determinação do H_2O_2 associado à técnica de amperometria com o objetivo de desenvolver um biossensor para glicose. Os parâmetros experimentais e voltamétricos foram avaliados e as melhores respostas foram obtidas em meio de tampão PBS, pH 6,5 e para o filme contendo duas bicamadas. Nestas condições, o H_2O_2 apresentou um pico de redução bem definido em $-0,37 V$ (vs. $Ag/AgCl$). Foram calculados os valores de limites de detecção ($3,33 \times 10^{-7} mol L^{-1}$) e de quantificação ($1,11 \times 10^{-6} mol L^{-1}$).

Palavras-chave: Filmes LbL, polieletrólito, detecção de H_2O_2 .

INTRODUÇÃO

Os sensores eletroquímicos têm atraído muita atenção devido à sua alta sensibilidade, versatilidade e baixo custo. Neste contexto, a utilização de eletrodos modificados com filmes finos possibilita desenvolver superfícies com propriedades e funções específicas [1]. Dentre os sensores, os biossensores têm adquirido importância devido à possibilidade de avaliação de processos sintéticos ou biológicos, além do entendimento destes [2]. Assim, a técnica LbL tem sido cada vez mais empregada na produção de biossensores devido à sua alta simplicidade experimental e baixo custo [3].

O desenvolvimento de um método preciso e confiável para a determinação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é importante, pois este desempenha um papel significativo nas indústrias alimentícia, química, farmacêutica e bioquímica. Além disso, a detecção de H_2O_2 , gerado pela reação catalítica das enzimas oxidases, é a principal ferramenta de detecção em biossensores amperométricos, pois sua concentração é diretamente proporcional à concentração do substrato (analito) da enzima.

Neste trabalho, filmes ultrafinos à base de $CuTsPc$ e $SiPy^+Cl^-$ foram fabricados através da técnica LbL. Os filmes foram depositados sobre substratos de FTO (vidro modificado com óxido de estanho dopado com flúor) e caracterizados por espectroscopia de UV-Vis. O comportamento voltamétrico e as propriedades electrocatalíticas para a redução do H_2O_2 foram avaliados através das técnicas de voltametria cíclica (VC) e amperometria.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os filmes automontados ($SiPy^+Cl^-/CuTsPc$) contendo 1 a 10 bicamadas foram fabricados por imersão do substrato alternadamente, nas soluções do polication cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano ($SiPy^+Cl^-$) (5 min) e do poliânion $CuTsPc$ (5 min). Após a deposição de cada camada, os filmes foram lavados em uma solução de lavagem em pH 8 e secas sob fluxo de ar. O crescimento dos mesmos foi monitorado por espectroscopia na região do UV-Vis (Varian, modelo CARY 50). Medidas de voltametria cíclica e amperométricas foram realizadas em potenciostato PalmSens® (Palm Instrument BV), utilizando-se eletrodo $Ag/AgCl$ e fio de platina como eletrodo de referência e auxiliar respectivamente. Os filmes automontados contendo diferentes bicamadas ($SiPy^+Cl^-/CuTsPc$)_n depositados sobre FTO foram utilizados como eletrodo de trabalho. Como eletrólito de suporte foi utilizado o tampão PBS ($0,15 mol L^{-1}$). A resposta voltamétrica dos filmes ($SiPy^+Cl^-/CuTsPc$) foi estudada em função do número de bicamadas e o pH da solução eletrolítica na presença de $4,76 \times 10^{-4} mol L^{-1}$ de H_2O_2 , através da aplicação de potencial em um intervalo entre 0,2 e $-0,6 V$ vs $Ag/AgCl$ e $v=50 mVs^{-1}$. A partir da escolha do número de bicamadas e melhor pH, ensaios por amperometria entre $-0,40$ e $0,00 V$ foram realizados a fim de avaliar em que potencial a redução do peróxido de hidrogênio ocorria com melhor resposta de corrente. Escolhido o potencial curvas analíticas foram obtidas por meio de adições sucessivas de $50 \mu L$ de soluções estoque recém preparadas com concentração de $1,0 \times 10^{-3} mol L^{-1}$ (na faixa entre $4,97 \times 10^{-6} mol L^{-1}$ e $4,76 \times 10^{-5} mol L^{-1}$). Antes dos experimentos, todas as soluções foram purgadas com nitrogênio de alta pureza, por 10 min. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros de UV-VIS para o filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuPsTc})_n$, mostram as duas bandas da ftalocianina, uma em 620 nm, referente às espécies diméricas e outra em 692 nm, devido às espécies monoméricas. A região do espectro de 400-800 nm foi escolhida para o monitoramento do crescimento dos filmes, pois o policátion não absorve nesta faixa de comprimento de onda [3]. A absorbância das bandas mais intensas, entre 400 nm e 800 nm, do filme mostrou uma relação linear com o número de bicamadas, indicando que a quantidade de material adsorvido é o mesmo a cada bicamada depositada. O H_2O_2 é um dos produtos da reação mediada pela enzima glicose oxidase e sua concentração é diretamente proporcional à concentração do substrato (glicose) da enzima. Uma maneira indireta de verificar o comportamento enzimático em biossensores amperométricos é determinar a quantidade deste subproduto formado. Neste sentido, a detecção de peróxido de hidrogênio foi realizada, acompanhando sua redução. Inicialmente a técnica de voltametria cíclica foi empregada para confirmar a viabilidade da aplicação do eletrodo modificado pela técnica LbL como sensor eletroquímico. Um estudo comparativo foi realizado entre o filme LbL e os polieletrólitos SiPy^+Cl^- e CuTsPc sob a forma de filme *casting* e com o substrato de FTO (Figura 1). Tanto os filmes como o substrato apresentaram eletroatividade na redução de H_2O_2 . Percebe-se que, para o substrato, o processo de redução ocorreu em potenciais mais negativos (-0,44 V) quando comparado ao filme LbL. O mesmo comportamento é apresentado pelos filmes *casting* do policátion SiPy^+Cl^- (-0,41 V) e da ftalocianina (-0,39 V). Para o filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$, obteve-se maiores valores de corrente e menores valores de potencial de redução (-0,37 V) em relação aos demais eletrodos. Observou-se ainda que o filme LbL mostrou-se altamente estável sobre a superfície do substrato, mantendo sua resposta por mais de cem ciclos de varredura, diferentemente dos filmes contendo somente os polieletrólitos, os quais lixiviaram para a solução, após dez sucessivas varreduras.

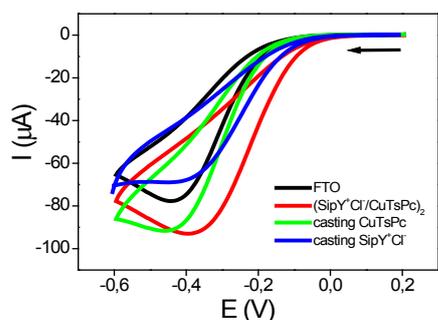


Figura 1: Voltamogramas cíclicos para o substrato FTO, filmes *casting* de CuTsPc e SiPy^+Cl^- e para o filme automontado $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$ na presença de $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,76 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$, $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$, em tampão PBS, pH = 6,5.

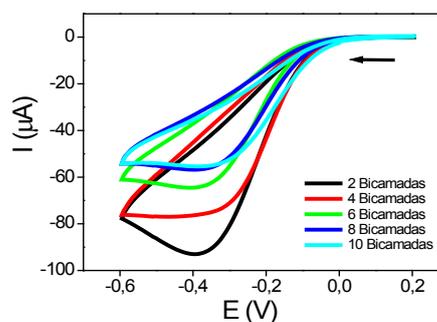


Figura 2: Voltamogramas cíclicos para o filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_n$, em tampão PBS pH = 6,5, $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,76 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$.

A fim de verificar a influência do número de bicamadas na resposta electrocatalítica frente a H_2O_2 em meio de tampão PBS (pH 6,5), voltamogramas ciclos foram obtidos com o eletrodo $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_n$. Observou-se que na presença do mesmo a uma concentração fixa de $4,76 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$, um processo catódico ocorreu, bem definido em torno de -0,37 V. No entanto, para filmes LbL com maior número de bicamadas houve decréscimo nos valores de corrente, fato este que pode ser atribuído a menor facilidade de difusão das espécies à superfície do eletrodo, dificultando a eficiência do processo de transferência de elétrons (Figura 2). Dentre os filmes analisados, aquele contendo duas bicamadas, foi o que apresentou o maior acréscimo de corrente na presença do H_2O_2 . A dependência do pH sobre a redução electroquímica do H_2O_2 também foi estudada por voltametria cíclica no intervalo de 5,0 até 7,0 na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ de H_2O_2 em tampão PBS. Verificou-se que com o aumento do pH, a densidade de corrente aumentou do pH 5,0 a 6,5, estabilizando em pH 7,0. Assim, o pH 6,5 foi selecionado como pH de trabalho, pois este apresentou maior definição do pico de redução. A fim de definir o melhor potencial para a redução electroquímica de H_2O_2 foram realizados estudos a partir da técnica de amperometria, em potenciais fixos variados na faixa de 0,0 V a -0,40. O filme exibiu resposta amperométrica para H_2O_2 para todos os potenciais estudados. Enfatiza-se que é preferível um potencial menos negativo a fim de evitar ou reduzir a interferência causada por algumas espécies electroativas e fazer os níveis de ruído de fundo atingir valores mais baixos. Assim, -0,10 V, foi escolhido como o potencial a ser aplicado para as medidas amperométricas.

Após a otimização dos parâmetros, curvas analíticas foram obtidas no intervalo de $4,97 \times 10^{-6}$ a $4,76 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ pelo método de adição padrão, com adições de 50 μL de uma solução estoque de concentração $1 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ de H_2O_2 . As curvas mostraram um aumento da corrente de pico com o aumento da concentração de H_2O_2 . A Figura 3 mostra

a resposta amperométrica do eletrodo (SiPy⁺Cl/CuTsPc)₂. Na inserção, observa-se uma dependência linear entre as correntes de redução e a concentração de H₂O₂ em solução.

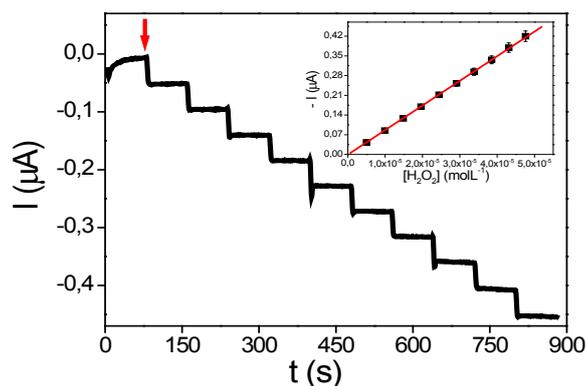


Figura 3: Resposta amperométrica para H₂O₂ em um eletrodo de (SiPy⁺Cl/CuTsPc)₂. Eletrólito: tampão PBS pH 6,5. Inserida curva de calibração.

Na construção da curva de trabalho observou-se que os valores de I_p aumentaram proporcionalmente à concentração de H₂O₂, possibilitando o cálculo dos valores de limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), utilizando-se as relações: LD = 3S_b / S e LQ = 10S_b / S, onde S_b é o desvio padrão de dez medidas do branco e S é a inclinação da curva analítica. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros calculados para detecção de H₂O₂ em tampão PBS, pH 6,5 sobre superfície do filme (SiPy⁺Cl/CuPsTc)₂, aplicando -0,10 V.

Parâmetros	Pico de redução
r	0,999
S _b (A)	9,69x10 ⁻⁴
S (A/mol L ⁻¹)	8,74x10 ³
LD (mol L ⁻¹)	3,33x10 ⁻⁷
LQ (mol L ⁻¹)	1,11x10 ⁻⁶

CONCLUSÕES

O filme (SiPy⁺Cl/CuTsPc)_n apresentou-se sensível para a determinação de peróxido de hidrogênio, apresentando um processo de redução em torno de -0,40V. Estudos voltamétricos na presença de H₂O₂ mostraram que o número de bicamadas influencia diretamente na resposta eletroquímica, já que com o aumento de bicamadas houve um decréscimo no valor de corrente. Tal comportamento pode ser atribuído a um aumento na resistividade do material uma vez que uma maior quantidade de material é depositada, aumentando a espessura do filme o que dificulta a transferência eletrônica. Resultados amperiométricos demonstram que o eletrodo (SiPy⁺Cl/CuTsPc)₂, mostrou-se sensível a detecção de peróxido de hidrogênio apresentando baixos limites de detecção e de quantificação, quando comparados à literatura, que apresenta valores em torno de 1µM.

AGRADECIMENTOS: CAPES pela bolsa concedida e nBioNet.

REFERÊNCIAS

- [1] Girard-Esgrot, A.P.; Godoy, S. and Blum, L.J. “Enzyme association with lipidic Langmuir-Blodgett films: Interests and applications in nanobioscience”, *Adv. Colloid Interface Sci.* 116(1-3): 205-225, 2005.
- [2] Freire, R.S.; Pessoa, C.A. and Kubota, L.T. “Self-assembled monolayers applications for the development of electrochemical sensors”, *Quim. Nova* 26(3): 381-389, 2003.
- [3] de Jesus, C.G.; dos Santos, V.; Canestraro, C.D.; Zucolotto, V.; Fujiwara, S.T.; Gushikem, Y.; Wohnrath, K. and Pessoa, C.A. “Silsequioxane as a New Building Block Material for Modified Electrodes Fabrication and Application as Neurotransmitters Sensors”, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11(4): 3499-3508, 2011.

ELETRODO MODIFICADO COM COMPÓSITO LAPONITA/CoO(OH) UTILIZADO NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Joslaine Jacumazo (IC), Marins Danczuk (PG), Fauze J. Anaissi (PQ).

Departamento de Química – UNICENTRO, Laboratório de Materiais e Compostos Inorgânicos,
LabMat. Guarapuava – PR - Brasil. joslainej@yahoo.com.br

RESUMO: Neste trabalho apresentamos os resultados obtidos com a utilização do eletrodo de platina modificado com material misto Argila Laponita/Cobalto Coloidal como sensor de ácido ascórbico. O colóide LapCo foi caracterizado por difratometria de raios X (DRX), espectroscopia eletrônica (UV-Vis) e vibracional (FTIR), análise térmica (TG/DTA) e as medidas eletroquímicas foram realizadas por Voltametria de Onda Quadrada (SWV) por ser um método eletroquímico sensível e seletivo para espécies eletroativas.

Palavras-chave: Sensor Eletroquímico, Argila Laponita, Cobalto Coloidal

INTRODUÇÃO

Materiais mistos são sistemas formados por dois ou mais constituintes que podem ser moléculas, oligômeros, agregados e partículas[1]. Entre os potenciais precursores de materiais híbridos estão às argilas[2], que possuem uma química de intercalação bastante rica e os géis inorgânicos de metais de transição, que apresentam propriedades de condução ou semi-condução[3]. A argila de interesse neste trabalho é a Laponita, uma hectorita sintética exfoliável em meio aquoso, resultando em suspensões estáveis. Esta argila possui fórmula empírica: $\text{Na}^{+0,7}[(\text{Si}8\text{Mg}5,5\text{Li}0,3)\text{O}20(\text{OH})4]$. As propriedades físicas e químicas de materiais em escala nanométrica são de grande interesse e de crescente importância para diversas aplicações como na óptica, eletrônica, catálise, biotecnologia e eletroquímica do estado sólido[4]. Considerando a importância das interfaces para a eletroquímica, têm sido desenvolvido nanocompósitos visando, entre outras, aplicações em eletrodos modificados como sensores amperométricos e potenciométricos. Na área de eletroquímica demonstra-se que eletrodos quimicamente modificados possuem algumas vantagens sobre eletrodos convencionais, contribuindo no desenvolvimento de inúmeras aplicações eletroanalíticas, dentre os quais se incluem eletrocatalise e sensores eletroquímicos[5-6].

As propriedades dos eletrodos modificados dependem da formação e das características do filme formado na superfície do eletrodo. Uma das principais vantagens dos eletrodos quimicamente modificados é a sua capacidade de catalisar a oxidação de algumas espécies que exibem elevado potencial em eletrodos não modificados, aumentando assim sua sensibilidade e seletividade[7]. Neste trabalho descrevemos a capacidade do eletrodo de platina modificada com a compósito Laponita/Cobalto coloidal de mediar a oxidação do ácido ascórbico. O ácido ascórbico, desperta interesse devido aos efeitos benéficos como vitamina C, além de seu uso como reagente e aditivo em alimentos, para ser analisada utilizou-se do método de Voltametria de Onda Quadrada. A voltametria de onda quadrada (“SWV – square wave voltammetry”) é uma técnica voltamétrica de pulso onde a forma do pico de corrente resultante é proveniente da sobreposição de pulsos de potencial de altura a (amplitude de pulsos), a uma escada de potenciais de largura ΔE_s (incremento de varredura de potenciais) e duração $2t$ (período). As medidas de corrente são feitas no final dos pulsos diretos e reversos e o sinal obtido, após derivação, é dado como uma intensidade da corrente resultante, apresentando excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas. Para aplicar a (SWV), assim como qualquer outra técnica eletroanalítica, é sempre importante fazer a otimização dos parâmetros. A frequência de aplicação dos pulsos é um dos parâmetros mais importantes a ser definido, pois determina a sensibilidade do método, além de prover informações a respeito do mecanismo eletrônico envolvido no sistema[8].

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Preparação do Material Misto - Laponita/Cobalto Coloidal

A preparação da suspensão coloidal de óxido-hidróxido de cobalto [CoOOH] foi realizada a partir da solução de acetado do metal em glicerina, em seguida foi lavado e mantido em suspensão aquosa. A argila foi utilizada na forma de suspensão coloidal (1%) preparada pela dispersão do material em água. Em 250 mL da suspensão da argila adicionou-se lentamente e sobre agitação 75 mL do gel de cobalto. Deixado sob agitação durante 24 horas, em seguida realizou-se um processo de lavagem para retirar solúveis em excesso, em paralelo foi monitorado o pH, o qual tende para o valor $\sim 7,0$ (pH neutro) e também a condutividade para determinar o número de lavagens mínimas necessárias para uma boa limpeza do material misto preparado.

As medidas foram realizadas em um potenciostato da BAS, modelo Cell Stand C3, num arranjo convencional de três eletrodos, como eletrodo auxiliar um eletrodo de fio de platina, e eletrodo de referência o eletrodo de prata cloreto de prata (Ag/AgCl), e sendo o eletrodo de trabalho o eletrodo de platina modificado com material misto Lap/Co.

Utilizou-se solução aquosa de NaOH (0,5 mol L⁻¹, 15 mL) como eletrólito suporte. Em todas as medidas foi realizado a deaeração da solução de eletrólito suporte com gás nitrogênio. A solução de ácido ascórbico (A.A., 0,5 mol.L⁻¹) foi preparada com água deionizada. A medida de (SWV) foi realizada adicionando alíquotas da solução de AA em frações de 10µL em 10µL até 200µL na solução de NaOH, também foi verificado o pH da solução durante algumas adições. Primeiramente realizou-se testes para a obtenção dos melhores parâmetros obtendo-se como resultado os melhores parâmetros: Incremento de varredura (ΔE_s) 2 mV, Frequência (f) 100 s⁻¹ e Amplitude (a) 50 mV, posteriormente realizou-se as medidas de Voltametria de Onda Quadrada (SWV), e janela de potencial de -550 até 430 mV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O colóide LapCo foi caracterizado por difratometria de raios-X (DRX), espectroscopia eletrônica (UV-Vis) e vibracional (FTIR) e voltametria cíclica (VC). No difratograma de raios-X do colóide Lap/Co observa-se a presença de um pico basal (001) em $2\theta = 9,80^\circ$, resultando em um valor de $d_{001} = 9,10 \text{ \AA}$, diferente do perfil característico da Laponita de partida. Outros picos estão presentes em 2θ ($15,5^\circ$, $28,9^\circ$) que deverão ser atribuídos para melhor compreensão da estrutura do colóide. Destacamos que, os picos de DRX do material misto são largos e pouco intensos, característico de materiais com baixo grau de cristalinidade. Os espectros de FTIR para a amostra de gel de cobalto, colóide misto e laponita apresentam pico típico de vibração da ligação Si–O–Si da argila laponita em 1041,3 cm⁻¹. Para o colóide misto identificou-se duas regiões diferentes daquelas encontradas nos espectros de infravermelho da argila. São observadas bandas na região entre 1200 e 1530 cm⁻¹, indicando a presença de grupos hidroxila complexados ao metal. A interação hidroxila-metal (M-OH), neste caso Co-OH, exibe um modo vibracional em torno de 1200 cm⁻¹. O colóide apresenta também picos intensos na região entre 2800 e 2900 cm⁻¹ devido à deformação axial das ligações C-H presentes na molécula de glicerina.

Estudos preliminares de VC (Fig. 1) mostra o comportamento eletroquímico para o colóide com dois pares redox, sendo que o primeiro situado entre -200 mV e -400 mV (par I), atribuído ao processo Co(III)/Co(II) e -600 mV e -800 mV (par II), atribuído ao processo de intercalação/desintercalação de H⁺, como sugere a equação abaixo:

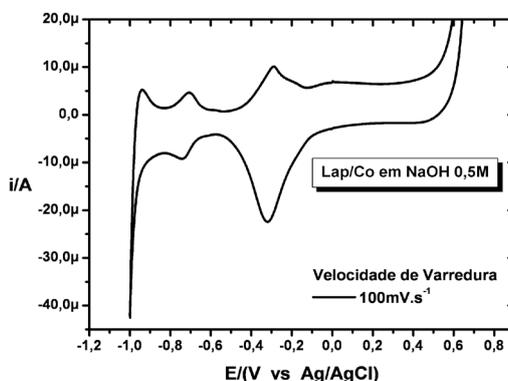
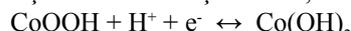


Figura 1: VC para eletrodo modificado com o material misto (Lap/Co).

Neste trabalho apresentamos os resultados referentes à utilização do colóide misto Lap/Co como modificador do eletrodo de trabalho, para aplicações eletroanalíticas na detecção de ácido ascórbico (AA). Na Fig. 2 é mostrado a série de SWV para o eletrodo de platina não modificado frente a adições sucessivas de ácido ascórbico. Percebe-se que a variação de corrente de pico não tem uma variação muito significativa e várias das medidas estão sobrepostas. Por outro lado, quando utilizamos o eletrodo de platina modificado (Fig. 3), o aumento da corrente de pico é proporcional a concentração do analito (curva inset) e coincide com o pico atribuído ao par redox Co(III)/Co(II).

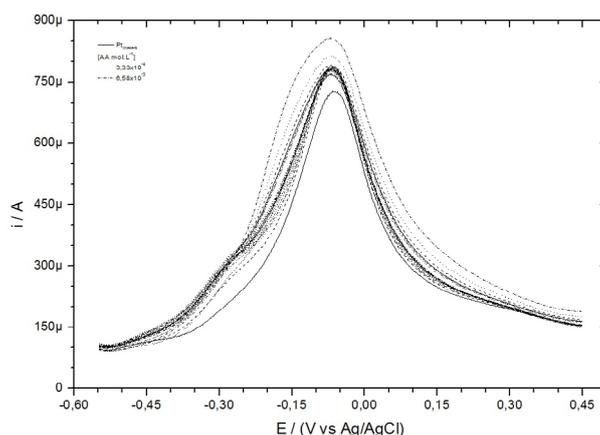


Figura 2: SWV para o eletrodo de platina não modificado em meio de NaOH (0,5 mol.L) e adições sucessivas de solução de (AA). Frequência: 100Hz, Amplitude: 50 mV, Incremento: 2 mV.

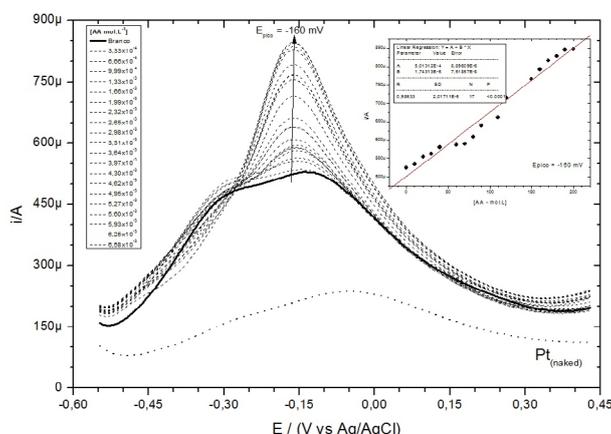


Figura 3: SWV para o eletrodo de platina modificado com Lap/Co em meio de NaOH (0,5 mol.L) e adições sucessivas de solução de (AA). Frequência: 100Hz, Amplitude: 50 mV, Incremento: 2 mV.

CONCLUSÕES

Estudos eletroquímicos preliminares demonstram que o colóide depende da natureza do eletrólito suporte, portanto, o pico relativo ao processo redox $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{III}}$, ocorre apenas em soluções alcalinas (NaOH, LiOH, ou KOH). Em presença de analitos, como o ácido ascórbico, apresentam sensibilidade relativa ao fato da espécie agir diretamente na corrente de pico do par redox $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{III}}$, indicando assim ser de potencial aplicação como sensor amperométrico para espécies redox.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem: Fundação Araucária, Capes, CNPq e Finep.

REFERÊNCIAS

- [1] LI B., WANG X.Y., YUAN H.T., ZHANG Y.S., SONG D.Y., ZHOU Z.X., J. App. Electrochem. **29**, 855, 1999.
- [2] LEV O., BHARATHI S., GLEZER V., MODESTOV A., GUN J., RABINOVICH L., SAMPATH S., Chem Mater. **9**, 2354, 1997.
- [3] LIVAGE J., HENRY M., SANCHEZ C., Prog Solid St Chem. **18**, 259-341, 1988.
- [4] HUGUENIN F., TORRESI R.M., Quim. Nova **27**, 3, 393-398, 2004.
- [5] KALCHER K., KANFFMANN J.M., WANG J., SCANCARA J., VYTRAS K., NEUHOLD C., YANG Z., Electroanalysis **7**, 5, 1995.
- [6] Cui, X.P.; HONG, L.; LIN, X. Quim. Anal. Sci. **18**, 543, 2002.
- [7] OSTERYOUNG, J.; OSTERYOUNG, R.; Anal. Chem. **57**, 101A, 1985.
- [8] MEDEIROS R.A., CARVALHO A.E., ROCHA-FILHO R.C., FATIBELLO-FILHO O., Qui. Nova **31**, 6, 1405-1409, 2008.

MODIFICAÇÃO DE ELETRODO DE OURO COM SÍLICA GEL E NANOPARTÍCULAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR NANOESTRUTURADO

Joseane Aparecida Carvalho¹, Marlene de Barros Coelho² e Valdir Souza Ferreira¹

¹ Departamento de Química - UFMS, Campo Grande - MS - Brasil; ² Embrapa Gado de Corte, Campo Grande - MS - Brasil. joseane.carvalho87@gmail.com

RESUMO: Através do emprego de monocamadas auto-organizadas (SAMs, “self-assembled monolayers”) e processo sol-gel foi realizada a derivatização superficial de um eletrodo de ouro policristalino utilizando o precursor molecular 3-mercaptopropil-trimetoxissilano (MPTS). A combinação dos dois métodos permitiu a criação de uma rede tridimensional de sílica gel adequada para a ancoragem de nanopartículas de ouro (AuNPs). O processo de modificação proporcionou um ambiente apropriado para a imobilização de proteína recombinante de *Mycobacterium bovis* (AgTB), produzida para o diagnóstico de tuberculose bovina, pela detecção de anticorpos (AcTB) em soro bovino, baseada na interação específica antígeno-anticorpo. O controle das etapas de funcionalização da superfície foi realizado investigando o comportamento eletroquímico do par redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, utilizando as técnicas eletroquímicas voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

Palavras-chave: Imunossensor, nanopartículas, proteína recombinante, voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica.

INTRODUÇÃO

A imobilização de biomoléculas, sobre superfícies transdutoras, em sua forma estável e retendo sua atividade biológica, é um dos grande desafios para a construção de biossensores.

As SAMs têm se tornado um procedimento de derivatização de superfícies bastante popular, principalmente devido à simplicidade de preparação, versatilidade e possibilidade de produzir, em escala molecular, estruturas altamente ordenadas. Somando-se a essa tecnologia, o método sol-gel é particularmente interessante para preparar redes tridimensionais adequadas para a imobilização de uma variedade de biomoléculas. A combinação dos dois métodos permite criar uma estrutura de sílica gel contendo grupos tióis, adequada para a ancoragem de nanopartículas de ouro [1, 2].

Adicionalmente, nanopartículas de ouro podem promover um importante papel na imobilização de biomoléculas devido a sua grande área superficial específica, biocompatibilidade e condutividade [2].

A imunointeração de proteínas em solução (anticorpo) com suas proteínas complementares (antígeno) imobilizadas em uma superfície leva a variações, por exemplo, no índice de refração, na espessura e na constante dielétrica da camada imobilizada. Tais propriedades podem ser exploradas no desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos. Vários trabalhos têm demonstrado que a EIE é uma técnica útil para caracterizar a formação de filmes sobre transdutores metálicos e como método de detecção [3].

Desta forma, o presente trabalho investigou a utilização de eletrodo ouro modificado com sílica gel e AuNPs para imobilização de proteína recombinante de *M. Bovis* no desenvolvimento de imunossensor para detectar anticorpos contra tuberculose bovina em soros de animais. As etapas de construção do imunossensor foram caracterizadas pelas técnicas eletroquímicas, VC e EIE, analisando o comportamento eletroquímico do par redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O sol do MPTS e as AuNPs foram preparados como descrito na literatura [2,4]. O eletrodo de ouro limpo foi imerso no sol do MPTS por 30 minutos, a temperatura ambiente, e enxaguado com etanol e água deionizada para remover o MPTS fisicamente adsorvido. Então, o eletrodo Au/MPTS foi imerso em suspensão de AuNPs, protegido da luz, por 5 h a 4°C. Em seguida, o eletrodo Au/MPTS/AuNPs foi enxaguado com água deionizada e exposto a solução contendo o antígeno AgTB (proteína recombinante de *M. bovis*) em tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,2) por aproximadamente 15 h a 4°C, visando garantir que todos os sítios ativos de AuNPs fossem ocupados por moléculas do antígeno. O eletrodo resultante Au/MPTS/AuNPs/AgTB foi enxaguado com PBS para remover as moléculas de antígeno fracamente adsorvidas e, imediatamente após, exposto à solução de albumina de soro bovino (BSA) por 30 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, novamente enxaguado com PBS. Finalmente, o eletrodo foi exposto a uma solução de soro bovino reconhecidamente positivo ou negativo para tuberculose bovina, diluída em PBS. Após 30 minutos de reação a 37°C, ou seja, condições semelhantes ao ensaio ELISA indireto, o eletrodo Au/MPTS/AuNPs/AgTB/AcTB foi enxaguado com PBS para remover as moléculas não ligadas.

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT128N. As medidas de VC foram realizadas no intervalo de potencial de -0,3 a 0,7 V vs. Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹ com velocidade de 50 mV s⁻¹. Para os experimentos de EIE foi aplicada ao eletrodo de trabalho uma onda senoidal com 10 mV de amplitude e um potencial de 220 mV vs. Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹, em uma faixa de frequência de 0,1 a 10⁴ Hz, com 10 pontos por década.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra as etapas do processo de construção do sensor nanoestruturado. O comportamento eletroquímico do par redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-} foi investigado em cada estágio de modificação. Foi observado que cada etapa de modificação do eletrodo altera suas propriedades eletroquímicas. Diferenças significativas foram observadas nas etapas de modificação com MPTS, AuNPs, AgTB e após a interação AgTB-AcTB quando comparadas com o eletrodo sem modificação.

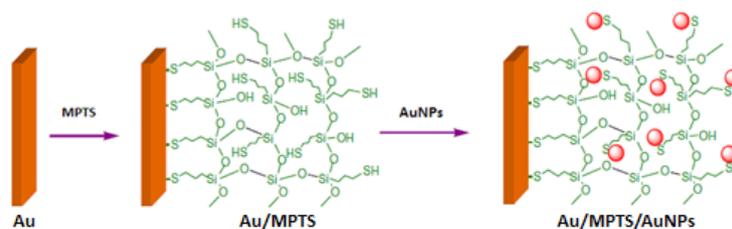


Figura 1: Esquema das etapas do processo de construção do sensor nanoestruturado [5].

A figura 2.A mostra que o par redox exibiu comportamento reversível sobre o eletrodo de ouro sem modificação (EL). Após a formação da camada de sílica gel a cinética de transferência de elétrons foi perturbada e a resposta voltamétrica do [Fe(CN)₆]^{3-/4-} diminuiu. Observa-se que houve a diminuição dos picos anódico-catódico e um deslocamento nos potenciais de pico, pois a modificação da superfície do eletrodo com a camada de sílica gel pode agir como uma camada de bloqueio para a difusão da espécie eletroativa até a superfície do eletrodo [1,2]. Após a automontagem de AuNPs, a resposta voltamétrica do par redox foi restaurada parcialmente, pois as AuNPs agem como minúsculos centros de condução, facilitando a transferência de elétrons [2]. A imobilização do antígeno AgTB é indicada pela nova diminuição dos picos anódico/catódico e deslocamento nos potenciais de pico. Na presença de anticorpos contra tuberculose bovina, ocorre novamente diminuição dos picos anódico/catódico e deslocamento nos potenciais de pico, indicando a interação AgTB-AcTB. O comportamento observado pela VC foi confirmado por EIE. Na figura 2.B, os gráficos de Nyquist mostram que a formação da camada de sílica-gel e a interação AgTB-AcTB são evidenciadas pelo aumento da parcela semicírculo do espectro de impedância, enquanto a automontagem de AuNPs provoca uma diminuição da resistência à transferência eletrônica, obtendo-se um gráfico de Nyquist semelhante ao eletrodo sem modificação. Observa-se claramente que a interação AgTB-AcTB pode ser detectada por EIE, que é uma técnica sensível a fenômenos interfaciais, visto que a interação antígeno-anticorpo não envolve a transferência de elétrons, que seria um requisito indispensável na detecção eletroquímica usual.

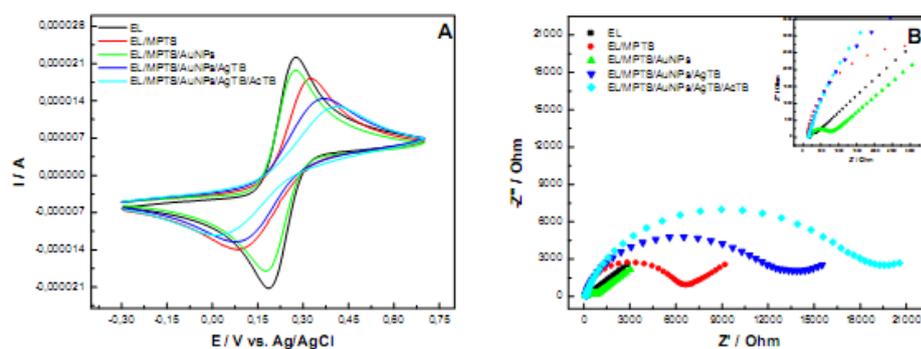


Figura 2: Voltamogramas cíclicos (A) e gráficos de Nyquist (B) obtidos para o eletrodo de ouro em diferentes etapas do processo de montagem, em solução 2,5 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em PBS pH 7,2 e KCl 0,1 mol L⁻¹.

A aplicação do sensor nanoestruturado como imunossensor resultou na detecção específica de anticorpos contra tuberculose bovina (AcTB) presentes em soro reconhecidamente positivo utilizando a EIE. A especificidade do imunossensor foi testada utilizando soro reconhecidamente negativo (ausência de AcTB). O circuito equivalente [R([RW]Q)(RQ)], utilizado para ajustar as curvas experimentais, foi baseado no trabalho de WU, et al. (2009) [3], que explica separadamente, as propriedades elétricas da camada modificada, C_m, e da interface camada modificada/solução, C_{ms}. A detecção da formação de um imunocomplexo entre a proteína recombinante e os anticorpos específicos foi

indicada pela variação ou não (soro negativo) do parâmetro de avaliação do imunossensor, a resistência à transferência eletrônica, R_{ct} . A R_{ct} é a soma da resistência relatada para a interface eletrodo modificado/solução, R_{ms} , e a resistência relatada para a camada modificada, R_m . Na figura 3 é evidenciada a formação da ligação antígeno-anticorpo, na presença de soro positivo para tuberculose bovina, pelo aumento de R_{ct} , que aumentou de 12 k Ω para 18 k Ω . A utilização de soro negativo praticamente não alterou a R_{ct} , indicando que o imunossensor desenvolvido apresente especificidade para tuberculose bovina.

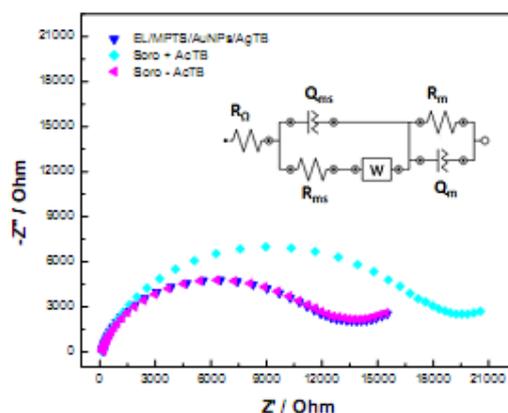


Figura 3: Gráficos de Nyquist obtidos após aplicação do imunossensor para análise de soros reconhecidamente positivo ou negativo para tuberculose bovina, em solução 2,5 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em PBS pH 7,2 e KCl 0,1 mol L⁻¹. No detalhe a representação do circuito elétrico equivalente.

CONCLUSÕES

As medidas de VC e EIE demonstraram que a rede de sílica gel formou uma camada de bloqueio sobre a superfície do eletrodo de ouro e as AuNPs exerceram um importante papel na transferência de elétrons. A EIE mostrou-se adequada para acompanhar as etapas de modificação e também como método de detecção da reação antígeno-anticorpo. Além disso, os resultados indicaram que a atividade biológica das proteínas recombinantes foi mantida, característica essencial para a imunodeteção. Assim, demonstrou-se que o imunossensor construído apresenta potencial para aplicações futuras em diagnóstico laboratorial de tuberculose bovina. A metodologia proposta pode ser estendida para a imobilização de outras biomoléculas, proporcionando assim uma plataforma promissora para o desenvolvimento de diversos imunossensores.

AGRADECIMENTOS: UFMS, CNPQ E EMBRAPA GADO DE CORTE.

REFERÊNCIAS

- [1] WANG J., PAMIDI P.V.A., ZANETTE D.R., "Self-assembled silica gel networks", *J. Am. Chem. Soc.* 120: 5852-5853, 1998.
- [2] BHARATHI S., NOGAMI M., IKEDA S., "Novel electrochemical interfaces with a tunable kinetic barrier by self-assembling organically modified silica gel and gold nanoparticles", *Langmuir* 17 (1): 1-4, 2001.
- [3] WU C.-C., LIN C.-H., WANG W.-S., "Development of an enrofloxacin immunosensor based on label-free electrochemical impedance spectroscopy", *Talanta* 79: 62-67, 2009.
- [4] FRENS G., "Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions", *Nat. Phys. Sci.* 241: 20-22, 1973.
- [5] KALIMUTHU P., ABRAHAM JOHN S., "Size dependent electrocatalytic activity of gold nanoparticles immobilized onto three dimensional sol-gel network", *J. Electroanal. Chem.* 617: 164-170, 2008.

APLICAÇÃO DO MATERIAL HÍBRIDO $\text{SiO}_2/\text{SiDIEN}$ IMPRESSO IONICAMENTE NA DETERMINAÇÃO DE ÍONS Cu(II)

Paulo Cesar Mendes Villis¹, Jose Roberto Barion Filho¹, Gustavo Silveira¹, Andréia de Moraes², Ariadne Missono Brondi¹, Pedro Orival Luccas¹, Fábio Luiz Pissetti¹, Alzira Maria Serpa Lucho¹, Yoshitaka Gushikem²

¹Instituto de Ciências Exatas (ICEEx), Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG, 37130-000, Alfenas, MG, Brasil; ²Instituto de Química (IQ), Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, 13083-970, Campinas, SP, Brasil. paulovillis@yahoo.com.br

RESUMO: Neste trabalho foi preparado um material híbrido adsorvente organicamente modificado com N1-[3-(trimetoxisilano)propil]dietilenotriamina e impresso ionicamente com Cu(II) . O material híbrido foi investigado usando um eletrodo de pasta de carbono por Voltametria de Redissolução Anódica de Pulso Diferencial (DPASV). Em DPASV a resposta linear para o cobre(II) foi observado no intervalo de concentração de $6,0 \times 10^{-4}$ - $5,4 \times 10^{-3}$ mmol.L^{-1} ($R = 0,999$; $n = 9$), tempo de pré-concentração (T_{pc}) de 1800 s no potencial de redução (E_{red}) de -0,51 V vs. ECS e $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, com limite de detecção de $1,82 \times 10^{-7}$ mmol.L^{-1} . DPASV foi utilizado para determinação de cobre (II) em amostras de água da torneira e os resultados foram comparados com os dados de espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS), de acordo com uma avaliação estatística do nível de 95%, usando t-teste. Análises das amostras mostraram valores entre 274,74 a 28,42 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Palavras-chave: cobre(II), sílica, pulso diferencial, pasta carbono, água de torneira.

INTRODUÇÃO

Polímeros impressos quimicamente são materiais sintéticos que possuem sítios de reconhecimento químico, com ação semelhante à interação antígeno-anticorpo. De fato, o conceito de impressão química foi desenvolvido a partir da teoria de Linus Pauling sobre a formação de anticorpos, a partir da qual os trabalhos pioneiros de Wulff e Sarhan [1] e Nishide [2] na década de 1970 estabeleceram os conceitos atualmente conhecidos como polímeros impressos molecularmente e polímeros impressos ionicamente, respectivamente. A síntese do material consiste basicamente em uma reação de polimerização, na qual um template é utilizado para orientar a formação de uma estrutura tridimensional a partir dos monômeros. Com a remoção do template, a estrutura tridimensional formada é responsável pela capacidade de reconhecimento do template específico em uma mistura de compostos químicos com estruturas e funções químicas semelhantes [3].

Atualmente, o método de impressão química em superfícies de suportes sólidos tem sido amplamente estudado, pois além de apresentar maior seletividade, os sítios de reconhecimento são mais acessíveis e a transferência de massa é mais rápida, o que favorece a interação com o template. [5]

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo a síntese de um polímero impresso com íons, constituído de uma estrutura de sílica funcionalizado com grupos dietilenotriamina, utilizando como template os íons Cu(II) . É proposta a aplicação do material sintetizado no preparo de eletrodos de pasta de carbono para a quantificação de íons Cu(II) em amostras de águas de torneira, empregando-se a técnica de voltametria de redissolução anódica. A escolha dos íons Cu(II) se justifica pela sua importância em sistemas biológicos, ambientais e monitoramento de processos em águas naturais e residuais.

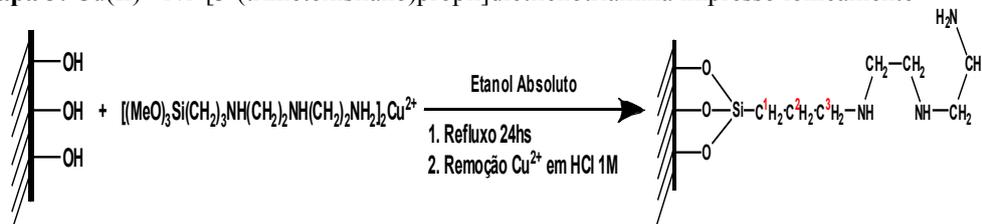
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O material híbrido a base de sílica foi sintetizado com o precursor orgânico $(\text{MeO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ na proporção 1:6,6 ($\text{SiO}_2/\text{precursor}$; mmol) em meio alcoólico, numa reação tipo *template*. Foram necessárias três etapas para a síntese do material híbrido, conforme mostra a Esquema 1.

Etapa 1: Ativação da sílica gel;

Etapa 2: Complexação de íons Cu(II)

Etapa 3: Cu(II) - N1-[3-(trimetoxisilano)propil]dietilenotriamina impresso ionicamente



O eletrodo de trabalho material híbrido SiO₂/Sidien foi preparado pela mistura mecânica de grafite e do material obtido, conforme a Tabela 1. Em seguida, 22,0 mg desta mistura foram misturadas com 2μL de Nujol e acondicionados numa cavidade de um tubo de vidro com profundidade de 0,10 cm, que possui internamente um disco de platina de 5 mm de diâmetro em contato elétrico com um fio de cobre.

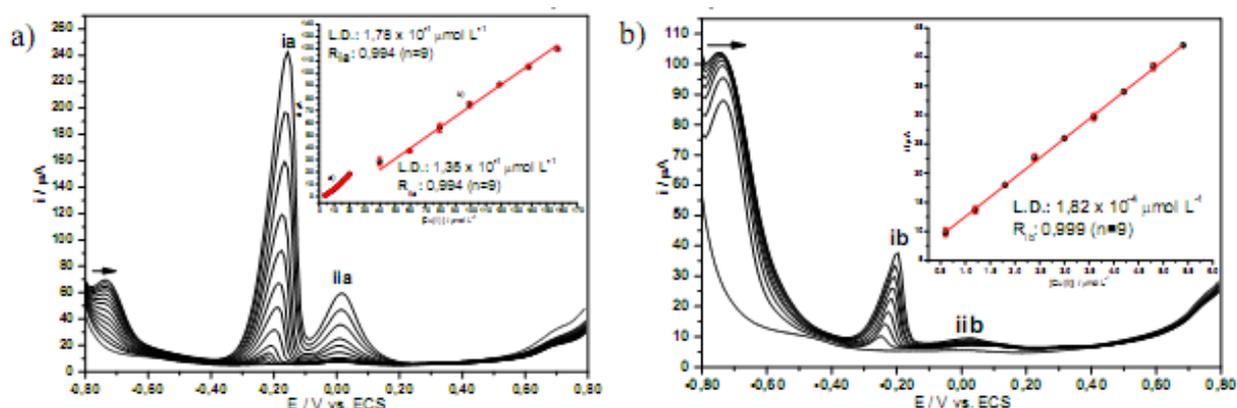
RESULTADOS E DISCUSSÃO

O material SiO₂/Sidien foi caracterizado por diversas técnicas espectroscópicas, confirmando a formação de um material híbrido. Dados do material híbrido SiO₂/Sidien: I.V.: δ(Si-O) 470 cm⁻¹; ν_s(Si-O-Si) 1100 cm⁻¹; (Si-OH) 3448 cm⁻¹; ¹³C RMN: C₁ 10,0 ppm; C₂ 17,0 ppm; C₃ 22,0 ppm; ²⁹Si RMN: -99,0 ppm (Q³); -59,0 ppm (T²); -68,0 ppm (T³); -108,0 ppm (Q⁴). Estes resultados confirmam a imobilização do grupo orgânico na rede de sílica no material híbrido.

Na Tabela 1 estão reunidos os parâmetros otimizados das condições de trabalho na determinação de íons Cu(II) nas medidas voltamétricas de redissolução anódica.

Tabela 1. Otimização dos parâmetros na determinação de cobre(II) usando eletrodo de pasta de carbono SiO₂/Sidien.

Parâmetros	Dados Otimizados
Velocidade de varredura e Amplitude pulso	20 mVs ⁻¹ e 50 mV
Potencial de pré-concentração	-0,51 V vs. ECS
Tempo de pré-concentração	Figura 1a: 600 s Figura 1b: 1800 s
Tempo de equilíbrio	5 s
Potencial inicial e final	-0,8 V a 0,8 V
Composição do eletrodo	Proporção 1:1 (m/m; material/grafite) e óleo mineral (Nujol)
Eletrólito suporte e pH	Solução Tampão Sørensen 0,5 mol L ⁻¹ e pH 5,28



A Figura 1 apresenta os voltamogramas por VRAPD na presença de diferentes concentrações de íons Cu(II) em dois tempo de pré-concentração, (a) $t_{pc} = 600$ s e (b) $t_{pc} = 1800$ s.

Figura 1. VRAPD o eletrodo de SiO₂/Sidien na presença de diferentes concentrações de íons Cu(II): a) $t_{pc} = 600$ s e b) $t_{pc} = 1800$ s. Desvio Padrão em triplicata.

Na presença de íons cobre em solução, em concentrações inferiores a 0,6 μmol.L⁻¹, observa-se os picos (ia) e (ib), que estão relacionados a quelação dos íons metálicos Cu(II) com o grupo trietilenodiamina do eletrodo. Acima desta concentração observa-se o surgimento de um segundo pico (iia) e (iib) que podem ser atribuídos ao processo de oxidação do Cu(0) adsorvidos na superfície do material. Na Figura 1a, no intervalo de concentração de 4,0 a 20,0 μmol.L⁻¹ o limite de detecção (L.D.) foi de 1,36 x 10⁻¹ μmol.L⁻¹ e no intervalo de 39,8 a 157,0 μmol.L⁻¹ foi de 1,78 x 10⁻¹ μmol.L⁻¹. Na Figura 1b, no intervalo de concentração de 0,6 a 5,4 μmol.L⁻¹ o L.D. foi de 1,82.10⁻⁴ μmol.L⁻¹. Através destes resultados percebe-se que o t_{pc} é uma variável a ser considerada, dependendo do intervalo de concentração dos íons Cu(II).

A VRAPD foi utilizada para a determinação de íons Cu(II) em amostras de águas de torneira (ICEx – Laboratório LABq – Unifal-MG) e os resultados obtidos foram comparados com os dados obtidos por FAAS, de acordo com a avaliação estatística a um nível de confiança de 95% (Tabela 2).

Tabela 2. Análise das amostras de água da torneira utilizando a VRAPD e a FAAS.

Amostra ^a	(Cu(II)/ $\mu\text{g L}^{-1}$) ^{b,d}		Erro Relativo ^c (%)
	VRAPD	FAAS	
A ₁	197,25 \pm 0,75	197,37 \pm 2,45	-0,06
A ₂	274,74 \pm 2,03	275,45 \pm 0,56	-0,25
B ₁	37,36 \pm 0,40	38,33 \pm 1,06	-2,53
B ₂	53,27 \pm 2,36	54,63 \pm 2,92	-2,48
B ₃	28,42 \pm 0,50	28,33 \pm 0,56	-0,31

^a (A_{1,2}) t_{pc} = 600 s e (B_{1,3}) t_{pc} = 1800 s

^b n = 3

^c FAAS vs. VRAPD (FAAS – VRAPD/FAAS) x 100%

^d t_{crítico} = 2,30 (P = 0,05 com 8 graus de liberdade, Stat t = 0,008)

Os resultados obtidos mostraram boa concordância entre a VRAPD e FAAS. A legislação brasileira permite o máximo de 2,0 mg.L⁻¹ de cobre na água potável. [6]

CONCLUSÕES

O eletrodo de pasta de carbono do material SiO₂/Sidien pode ser empregado na preparação de sensores eletroquímicos para a determinação de íons Cu(II) presente em meio aquoso com diferentes tempos de pré-concentração, empregando-se a VRAPD. Os resultados encontrados confirmam que não existem diferenças significativas entre os resultados obtidos pelos dois métodos, VRAPD e FAAS.

AGRADECIMENTOS: FAPEMIG, CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] G. Wulff, A. Sarhan, Use of Polymers with Enzyme-Analogous Structures for Resolution of Racemates, *Angew Chem Int Edit*, 11 (1972) 341-&.
- [2] H. Nishide, J. Deguchi, E. Tsuchida, Selective Adsorption of Metal-Ions on Crosslinked Poly(Vinylpyridine) Resin Prepared with a Metal-Ion as a Template, *Chem Lett*, (1976) 169-174.
- [3] G.S. Wu, G.; Wu, D.; Shen, Y.; Wang, Z.; He, C. , Synthesis of ion-imprinted mesoporous silica gel sorbent for selective adsorption of copper ions in aqueous media, *Microchim Acta*, 171 (2010) 203-209.
- [4] H. Zheng, D. Zhang, W.Y. Wang, Y.Q. Fan, J. Li, H.P. Han, Highly selective determination of palladium(II) after preconcentration using Pd(II)-imprinted functionalized silica gel sorbent prepared by a surface imprinting technique, *Microchim Acta*, 157 (2007) 7-11.
- [5] X. Bi, R.J. Lau, K.L. Yang, Preparation of ion-imprinted silica gels functionalized with glycine, diglycine, and triglycine and their adsorption properties for copper ions, *Langmuir*, 23 (2007) 8079-8086.
- [6] BRASIL. Ministério da Saúde, Portaria n. 518, de 25 de março de 2004.

O EFEITO DO pH NA ELETROOXIDAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS USANDO ELETRODOS DE DNDB

Adriana F. Azevedo*, Fernando A. Souza, Neidenêi G. Ferreira

Laboratório Associado de Sensores e Materiais – INPE, São José dos Campos – SP – Brasil

RESUMO: A resposta eletroquímica de filmes de diamante nanocristalino dopado com boro (DNDB) foi investigada em a oxidação de 1 mmol L⁻¹ de fenol, 4-clorofenol e 4-nitrofenol. Os filmes foram crescidos sobre substrato de silício usando a técnica de filamento quente com uma mistura gasosa contendo CH₄/H₂/Ar. Na superfície do filme DNDB foi realizado um pré-tratamento por polarização anódica seguido por polarização catódica antes de cada medida a fim de manter a superfície do eletrodo ativa e sem adsorção de produtos provenientes da oxidação. Foram utilizados dois meios com diferentes pH: NaOH e H₂SO₄. A eletrooxidação de todos os compostos ocorreu em ambos os meios, sendo que os valores dos potenciais do pico de oxidação foram menores em NaOH do que H₂SO₄. Além disso, os valores da corrente de oxidação dos compostos também foram maiores NaOH, exceto para o 4-nitrofenol, o que precisa ainda ser melhor esclarecido.

Palavras-chave: diamante, nanocristalino, dopagem, compostos fenólicos, eletrooxidação

INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são poluentes comumente descartados em efluentes de diversas indústrias do setor químico. Os fenóis constituem um grupo amplo de poluentes orgânicos devido a sua baixa degradação, bioacumulação e toxicidade [1]. Neste contexto, os sensores eletroquímicos também podem atender à necessidade de análise contínua e em tempo real para substituir as técnicas analíticas empregadas nas indústrias com um custo bem menor. Entretanto, quando o eletrodo de diamante é usado como sensor, a adição de compostos fenólicos pode inativar a sua superfície, devido à adsorção de um filme polimérico. Neste caso, a superfície do eletrodo pode ser restaurada a sua atividade inicial, por uma polarização anódica (PA), seguida por uma polarização catódica (PC) no mesmo eletrólito e na mesma região de potencial de decomposição da água [2]. Além disso, a desativação da superfície do eletrodo também pode estar relacionada com o pH do eletrólito utilizado [3]. Deste modo, neste trabalho será apresentado um estudo preliminar da caracterização eletroquímica do eletrodo de diamante nanocristalino dopado com boro (DNDB) e do seu comportamento na eletrooxidação do fenol, 4-clorofenol e 4-nitrofenol num meio ácido e básico.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os filmes de DNDB foram obtidos num reator de filamento quente usando os seguintes parâmetros de crescimento: 900K, 6,7 KPa, 6 hs de deposição e uma mistura gasosa contendo CH₄/H₂/Ar com fluxo de 1/19/80 sccm (“standard cubic centimeter per minute”). O dopante boro foi obtido pela passagem do gás hidrogênio num reservatório contendo B₂O₃ dissolvido em metanol. O nível de dopagem corresponde a 10²⁰ cm⁻³ atoms B/C, calculado a partir das análises de Mott-Schottky plot. Os filmes de DNDB foram depositados sobre substratos de silício (100) com uma área de 1x1 cm² preparados previamente num banho de ultrassom contendo uma solução de pó de diamante de 0,25 mm e hexano por 1 h. A morfologia e a estrutura dos filmes foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando um equipamento modelo JEOL JSM-5310 e por espectroscopia de espalhamento micro-Raman (sistema microscópico Renishaw 2000) usando $\lambda=514.5$ nm numa faixa espectral de 300 a 3500 cm⁻¹. As medidas eletroquímicas foram feitas usando um equipamento Autolab PGSTAT 302 com os eletrodos de diamante, platina e Ag/AgCl como eletrodos de trabalho, contra-eletrodo e de referência, respectivamente. Os eletrólitos de suporte utilizados foram H₂SO₄ e NaOH na concentração de 0,5 mol L⁻¹ cada e 4-clorofenol, 4-nitrofenol e fenol na concentração de 1 mmol L⁻¹ cada. A superfície dos eletrodos de DNDB foram tratadas, antes de cada medida, por PA (2.8V vs. Ag/AgCl) durante 10s seguida pela PC (- 2.8V vs. Ag/AgCl) por 10s.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imagem da superfície do filme de DNDB e seu respectivo espectro Raman são mostrados na Fig.1(a,b). A morfologia deste filme é bem suave, homogênea e com a presença de pequenos aglomerados de grãos nanocristalinos. Este tipo de filme tem uma grande quantidade de carbono sp² presente nos contornos dos grãos e que foi confirmado pela análise do espectro Raman. No espectro Raman é possível identificar oito modos vibracionais. O pico do diamante está um pouco deslocado para um comprimento de onda menor (1300 cm⁻¹) devido às impurezas formadas em filmes altamente dopados. As bandas D (1350 cm⁻¹) e G (1550 cm⁻¹) estão relacionadas com a grande presença do carbono sp² neste filme, confirmada também pelo espectro de segunda ordem (~ 2700 cm⁻¹). Também é bem nítido neste espectro um ombro em 1150 cm⁻¹ e um pico em 1490 cm⁻¹ referente ao transpoliacetileno (TPA) existente nos contornos dos

grãos de diamante nanocristalino da superfície. As bandas em 500 e 1220 cm^{-1} são assunto de debate, mas basicamente estão associadas à incorporação de boro na rede cristalina do filme de diamante. A presença da banda em 500 cm^{-1} é atribuída ao aumento da concentração dos pares de boro e a banda centrada em 1220 cm^{-1} é atribuída a interferência Fano entre o estado discreto do fônon e o estado contínuo eletrônico [4].

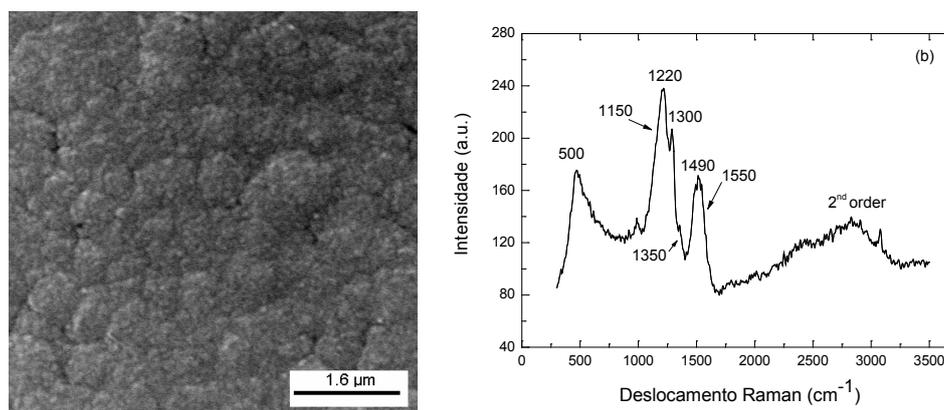


Figura 1: Imagem MEV e Espectro Raman do filme de DNDB, respectivamente.

Na Figs.2(a,b) são mostrados os voltamogramas cíclicos da eletrooxidação dos compostos fenólicos nos meios ácido e básico, respectivamente. Os potenciais de pico de oxidação do 4-clorofenol, fenol e 4-nitrofenol numa velocidade de varredura de 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ foram 1,16, 1,22 e 1,52 V vs. Ag/AgCl em H_2SO_4 e; 0,56, 0,57 e -0,08 V vs. Ag/AgCl em NaOH. Estes resultados mostraram que é possível a eletrooxidação dos compostos fenólicos no eletrodo de DNDB independente do meio utilizado, sendo que os valores do potencial de pico de oxidação dos compostos fenólicos em NaOH são bem menores do que em H_2SO_4 . Além disso, os valores de corrente dos picos de oxidação do 4-clorofenol e do fenol são maiores em NaOH do que em H_2SO_4 . Com relação ao 4-nitrofenol, mais análises e um melhor conhecimento do seu mecanismo de oxidação precisam ser feitas para entender seu comportamento em relação aos valores de corrente de oxidação nestes meios estudados.

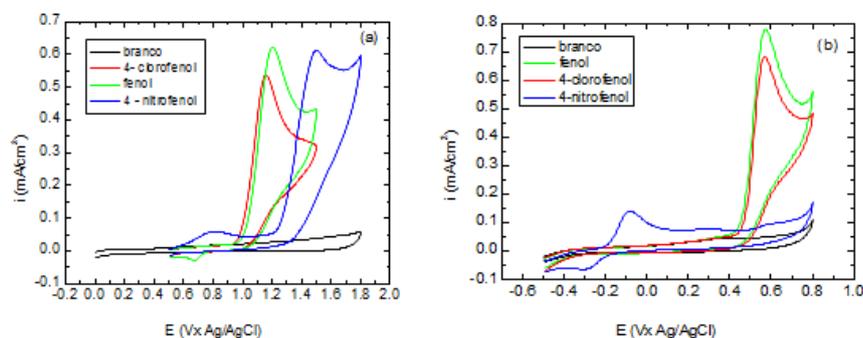


Figura 2: Curvas de VC dos compostos fenólicos em (a) H_2SO_4 e (b) NaOH usando o eletrodo DNDB ($v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$).

As Figs.3 mostram os gráficos contendo informações sobre os potenciais do pico de oxidação dos compostos fenólicos e da corrente de pico de oxidação em função de diferentes valores da raiz quadrada da velocidades de varredura ($g^{1/2}$). Tanto o potencial como a corrente de pico de oxidação dos três compostos, nos dois meios, variaram com a velocidade de varredura. A corrente de pico variou linearmente em função da $g^{1/2}$, mostrando um comportamento quase-reversível destes eletrodos. Estes resultados justificam continuar as investigações usando diferentes concentrações dos compostos fenólicos em meio básico para uma futura aplicabilidade dos eletrodos de DNDB como nanosensores.

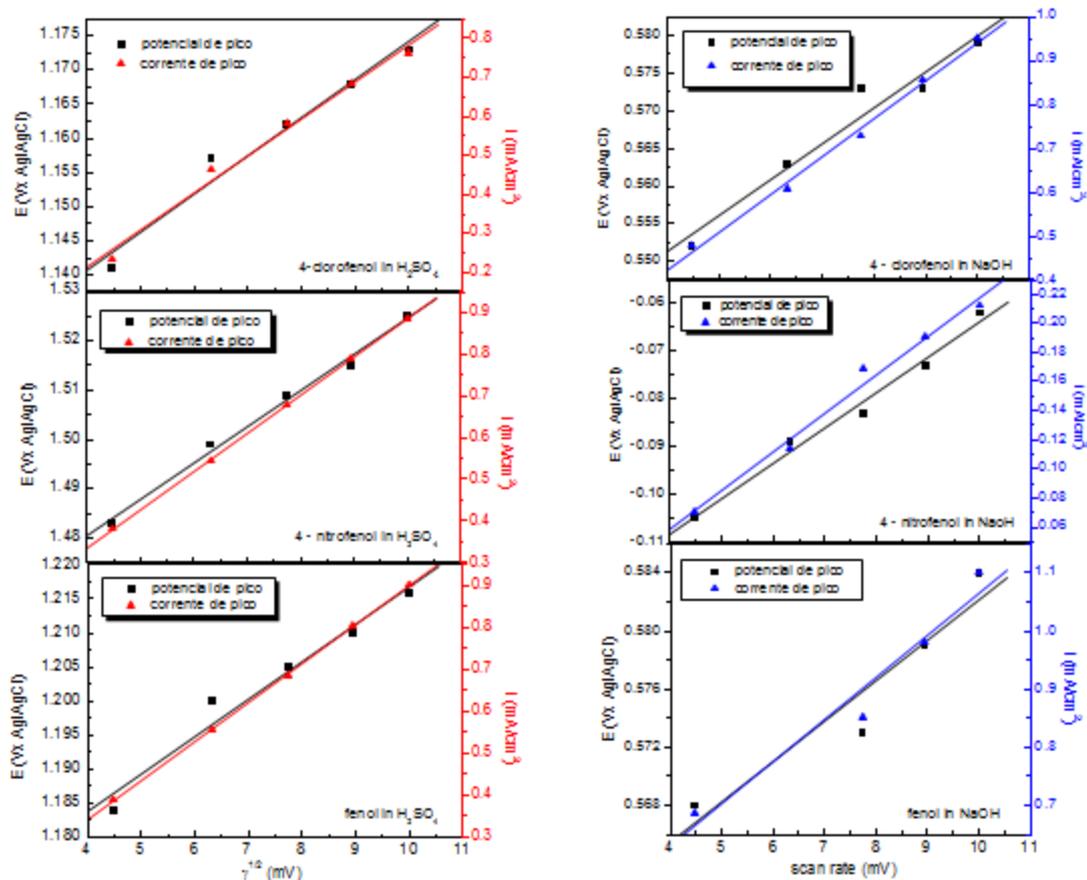


Figura 3: Gráficos do potencial e corrente de oxidação em função da raiz quadrada da velocidade de varredura em H₂SO₄ e NaOH usando o eletrodo DNDB.

AGRADECIMENTOS: FAPESP, CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução CONAMA N° 357/2005, Internet site address: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano.cfm?codlegitipo=3> acessado em 29/04/2011.
- [2] Iniesta, J., Michaud, P.A., Panizza, M., Cerisola, G., Aldaz, A., Comminellis, Ch., “Electrochemical oxidation of phenol at boron-doped diamond electrode”, *Electrochim. Acta* 46:3573-3578, 2001.
- [3] Arslan, G., Yazici, B., Erbil, M., “The effect of pH, temperature and concentration on electrooxidation of phenol”, *J. Hazardous Mater. B* 124:37-43, 2005.
- [4] Ager, J.W., Walukiewicz, W., McCluskey, M., Plano, M.A., Landstrass, M.I., “Fano interference of the Raman phonon in heavily boron-doped diamond films grown by chemical vapor deposition”, *Appl. Phys. Lett.* 66:616-618, 1995.

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE Cu(II) UTILIZANDO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM PEPTÍDEO DA PROTEÍNA PRÍON

Jonatas G. da Silva^{1,2}, Thiago V. de Freitas^{1,2}, Luciano P. Silva¹, Jurandir R. de Souza², Marcelo P. Bemquerer¹ e Clarissa S. Pires de Castro¹

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 2372, CEP 70.770-917, Brasília-DF,

² Instituto de Química-LQAA, Universidade de Brasília, Brasília-DF. jonatasg@yahoo.com.br

RESUMO: O presente trabalho propõe o desenvolvimento de um sensor eletroquímico baseado na modificação do eletrodo de ouro com um peptídeo derivado da proteína príon, acrescido quimicamente de um grupo sulfidril (H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂), para a determinação de Cu(II) empregando a voltametria de pulso diferencial. Foram otimizados os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais: tempo de imobilização do peptídeo, tempo de acumulação do Cu(II), eletrólito suporte e pH, amplitude de pulso e velocidade de varredura. A curva analítica, obtida pelo método de adição de padrão, apresentou a equação $I_{pc} (\mu A) = 0,83 + 1,0 \times 10^6 [Cu(II)]$ ($r = 0,999$) e linearidade entre $5,0 \times 10^{-7}$ a $6,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com limite de detecção $7,1 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e limite de quantificação $2,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Estes resultados mostram que o sensor eletroquímico desenvolvido poderá ser utilizado na detecção e quantificação de Cu(II) em diversas matrizes.

Palavras-chave: Peptídeo derivado da proteína príon, Eletrodo de ouro, Voltametria de pulso diferencial, Cu(II)

INTRODUÇÃO

Os metais tóxicos são absorvidos pelas plantas através do solo e do ar, são ingeridos pelos animais e entram na alimentação humana por meio do consumo de carnes, leite, verduras e frutas, causando sérios problemas à saúde [1,2]. Além disso, estudos toxicológicos também demonstraram que até mesmo os íons metálicos ditos essenciais para os processos biológicos podem ser tóxicos quando estes estão em concentrações elevadas. Por exemplo: o cobre é um íon metálico essencial, com uma dose diária recomendada de 2 a 3 mg; no entanto, em concentrações elevadas este íon poderá ser pró-oxidante e portanto tóxico [3]. Consequentemente, as metodologias para monitorar as concentrações dos metais tornam-se importantes meios de avaliar os níveis de toxicidade.

Atualmente, a determinação de íons metálicos é feita rotineiramente utilizando-se as técnicas de espectroscopia de absorção atômica (AAS) e de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). As metodologias analíticas baseadas nestas técnicas possibilitam medidas precisas e exatas da concentração total dos íons metálicos. Além disso, na técnica de ICP-MS, a concentração de diferentes metais é medida em uma única análise [4,5]. Entretanto, as principais desvantagens dessas técnicas são o alto custo para a aquisição e manutenção dos equipamentos e o fato delas serem de grande porte, ou seja, para uso em laboratório e difíceis de serem adaptadas ao campo. Os eletrodos modificados são uma solução possível para atender a necessidade de medidas analíticas no campo, tão importantes para a aplicação em agricultura; pois, além de serem portáteis, possuem a capacidade de fornecer uma estimativa da biodisponibilidade dos íons metálicos, ao contrário das técnicas de AAS e ICP-MS que determinam a concentração total dos metais [6,7].

Os peptídeos são excelentes elementos biológicos de reconhecimento para o desenvolvimento de eletrodos modificados para a determinação de metais, uma vez que eles possuem uma variedade de átomos doadores de elétrons, situados no esqueleto peptídico e nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, que podem ligar-se seletivamente aos íons metálicos [8,9]. Estudos recentes mostraram que o peptídeo VNITKQHTVTTTT faz parte do sítio de reconhecimento a Cu(II) do príon e está envolvido em seu mecanismo de infectividade [10]. Por meio de uma modificação química simples, é possível adicionar um grupamento sulfidril a esta cadeia peptídica e construir uma camada automontada sobre uma superfície metálica como o ouro (Au). Este material nanoestruturado com afinidade e seletividade para o Cu(II) poderá ser então um protótipo de um sensor e ser utilizado para determinar esse íon metálico em diversas matrizes, por exemplo, as alimentares e ambientais. É surpreendente que poucos estudos tenham sido conduzidos até o momento para o desenvolvimento de eletrodos sólidos modificados baseados em peptídeos para a determinação de metais. Neste contexto o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um sensor eletroquímico baseado na modificação do eletrodo de Au com um análogo de um peptídeo oriundo do príon, acrescido quimicamente de um grupo sulfidril (H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂), para a determinação de Cu(II) empregando a voltametria de pulso diferencial (DPV).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O peptídeo H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ foi obtido pelo método de síntese em fase sólida e purificado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa utilizando-se o cromatógrafo líquido LC-10 (Shimadzu) e uma coluna semipreparativa (Zorbax Agilen, 250 x 10 mm, 5µm). As frações cromatográficas atribuídas ao peptídeo foram verificadas por espectrometria de massa em modalidade MALDI-ToF, utilizando-se o espectrômetro de massa Ultraflex III (Bruker Daltonics). A solução aquosa do peptídeo foi padronizada utilizando o espectrofotômetro UV-mini 1240 (Shimadzu) e o método de Murphy e Kies [11]. As medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico 797 VA Computrace (Metrohm) e uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos: Au (Φ 2mm) (trabalho), Ag/AgCl (referência) e platina (auxiliar). Foi utilizada solução padrão de cobre 1000 mg L⁻¹ (Fluka). Para a limpeza e ativação do *eletrodo de Au*, foi utilizado o tratamento químico com uma *solução "piranha"* (3H₂SO₄:1H₂O₂), em seguida um tratamento eletroquímico, em H₂SO₄ 1 mol L⁻¹, por 10 ciclos no intervalo de potencial de -0,3 V (potencial inicial, E_i) e 1,50 V (potencial de inversão, E_w) e velocidade de varredura (v) = 100 mV s⁻¹. Após a limpeza e ativação, o eletrodo foi transferido para uma célula eletroquímica contendo 1,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ do peptídeo derivado da proteína príon em tampão fosfato, sem agitação. A acumulação do Cu(II), no eletrodo modificado, foi realizada em 10 mL de tampão fosfato, sob agitação. A regeneração do eletrodo modificado foi realizada em solução de ácido perclórico 1,0 x 10⁻¹ mol L⁻¹, durante 30 s, e potencial de 0,5 V, sob agitação. Primeiramente foram otimizados os parâmetros voltamétricos e condições experimentais: tempo de imobilização do peptídeo, tempo de acumulação do Cu(II), eletrólito suporte e pH, amplitude de pulso e velocidade de varredura. Posteriormente, foi obtida a curva analítica, pelo método da adição de padrão, para o Cu(II).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais otimizadas, em ensaios prévios, para a determinação de íons Cu(II) utilizando a DPV e o eletrodo de ouro modificado com o peptídeo derivado da proteína príon são mostrados na Tabela 1. O estudo da repetibilidade de resposta do eletrodo de ouro modificado para a quantificação de Cu(II) apresentou RSD de 3,2% (n=10).

Tabela 1. Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de Cu(II) utilizando-se a DPV e o eletrodo de ouro modificado com o peptídeo derivado da proteína príon.

Parâmetros	
T _{imobilização do peptídeo} / min	15 min
T _{ac do Cu(II)} / s	60
Eletrólito suporte e pH	Tampão fosfato pH 7,0
Amplitude de pulso / mV	50
v / mV s ⁻¹	50

Nos voltamogramas de pulso diferencial (Fig. 1) obtidos para o Cu(II), em tampão fosfato pH 7,0, observa-se um sinal em 0,20 V, correspondente a sua redução no eletrodo de ouro modificado com o peptídeo da proteína príon. Este sinal pode ser utilizado na detecção e quantificação de Cu(II) em diferentes matrizes.

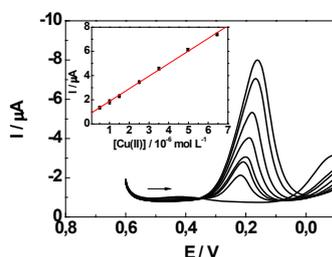


Figura 1: Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 7,0 com adições sucessivas de solução padrão de Cu(II) 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹. E_i = 0,60 V; E_f = -0,10 V, amplitude de pulso = 50 mV, v = 50 mV s⁻¹, Eletrodo de trabalho: Eletrodo de ouro modificado com o peptídeo derivado da proteína príon, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L⁻¹).

A curva analítica apresentou a equação I_{pc} (µA) = 0,83 + 1,0 x 10⁶ [Cu(II)] (r = 0,999) e linearidade entre 5,0 x 10⁻⁷ a 6,5 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ com limite de detecção 7,1 x 10⁻⁹ mol L⁻¹ e limite de quantificação 2,4 x 10⁻⁸ mol L⁻¹, calculados a partir de: LD = 3Sb/b; LQ = 10Sb/b, onde Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b a inclinação da curva analítica.

CONCLUSÕES

O método voltamétrico desenvolvido para a determinação de Cu(II), utilizando o eletrodo de ouro modificado com o peptídeo derivado da proteína príon, acrescido quimicamente de um grupo sulfidrila (H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂), e a DPV, apresentou boa sensibilidade e repetibilidade e baixos limites de detecção e quantificação, possibilitando a sua aplicação em diversas matrizes quanto à detecção e quantificação de Cu(II). As próximas etapas desse estudo são: caracterização da superfície do eletrodo de ouro modificado com o peptídeo H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ utilizando a microscopia de força atômica; determinação do íon metálico Cu(II) em amostras hipotéticas utilizando o sensor desenvolvido; avaliação do desempenho do sensor de peptídeo para a determinação dos íons Cu(II) em cultivares de café da embrapa.

AGRADECIMENTOS: CENARGEN, UnB, CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS

- [1] NRIAGU J. O. and PACYNA J. M., "Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals", *Nature* 333(6169): 134-139, 1988.
- [2] McLAUGHLIN M. J., PARKER D.R. and CLARKE J.M., "Metals and micronutrients- food safety issues", *Field Crops Res.* 60(1-2): 143-163, 1999.
- [3] GAETKE L. M. and CHOW C. K., "Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients", *Toxicol.* 189(1-2): 147-163, 2003.
- [4] ROYCHOWDHURY T., TOKUNAGA H. and ANDO M., "Survey of arsenic and other heavy metals in food composites and drinking water and estimation of dietary intake by the villagers from an arsenic-affected area of West Bengal, India", *Sci. Total Environm.* 308(1-3):15-35, 2003.
- [5] SAHAN Y., BASOGLU F. and GÜÇER S., "ICP-MS analysis of a series of metals (Namely: Mg, Cr, Co, Ni, Fe, Cu, Zn, Sn, Cd and Pb) in black and green olive samples from Bursa, Turkey", *Food Chem.*, 105(1): 395-399, 2007.
- [6] CHEN P. and HE C., "A general strategy to convert the MerR family proteins into highly sensitive and selective fluorescent biosensors for metal ions", *J. Am. Chem. Soc.*, 126(3): 728-729, 2004.
- [7] LEMAY S. G., "Nanopore-based biosensors: The interface between ionics and electronics", *ACS Nano* 3(4): 775-779, 2009.
- [8] SIGEL H. and MARTIN R. B., "Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands", *Chem Rev.* 82(4): 385-426, 1982.
- [9] LICINI G. and Scrimin P., "Metal-ion-binding peptides: From catalysis to protein tagging", *Angew. Chem. Int. Ed.* 42(38): 4572-4575, 2003.
- [10] DE CASTRO C. S. P., SOUZA DE J. R., BEMQUERER M. and OLIVEIRA FILHO W. P., "A voltammetric study of the binding of copper(II) to peptide fragments of prion", *Polyhedron* 28(18): 4131-4135, 2009.
- [11] MURPHY J.B. and KIES M.W., "Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions", *Biochim. Biophys. Acta* 45: 382-384, 1960.

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS, VISANDO APLICAÇÃO EM LEITE DE VACA CRÚ

Thiago Martiniano do Prado (PG) e Maria D.P.T. Sotomayor (PQ).

Instituto de Química –UNESP, Araraquara – SP – Brasil. thiago.prado1@br.nestle.com

RESUMO: Descreve-se a construção de um biossensor amperométrico para a detecção de antibióticos derivados da penicilina, empregando pasta de carbono funcionalizada com carbodiimida, na qual a enzima penicilinase (β -lactamase) foi covalentemente ligada. A preparação da pasta assim como as condições de análise foram otimizadas em relação à quantidade de enzima, mediador de elétrons, eletrólito, pH e potencial aplicado. Os resultados obtidos demonstraram que o biossensor proposto mostra-se promissor na detecção dessa classe de antibióticos propostos.

Palavras-chave: biossensores, antibióticos, leite, penicilinase.

INTRODUÇÃO

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou em 2002, a Instrução Normativa 51 (IN 51) que estabelece padrões de qualidade para produtos lácteos processados no Brasil. Além da IN 51, o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL) foi criado para que a população possa consumir produtos lácteos mais nutritivos, saborosos, seguros e também para favorecer situações em que o rendimento dos produtores seja aumentado [1]. Os parâmetros determinados pelo MAPA para que o leite seja considerado de boa qualidade são: Contagem Bacteriana Total (CBT), Contagem de Células Somáticas (CCS), teores de gordura, lactose, proteína, sólidos totais, sólidos desengordurados e pesquisa de resíduos de antibióticos. Dentre os parâmetros supracitados, a alta Contagem de Células Somáticas (CCS) pode ser um indicador de que a vaca esteja com uma doença conhecida como Mastite ou Mamite. A doença é caracterizada por um processo inflamatório da glândula mamária, causada principalmente por bactérias e fungos, podendo também ser decorrente de problemas traumáticos, metabólicos, fisiológicos e alérgicos. A Mastite pode manifestar-se de duas diferentes formas: a clínica e a subclínica. No caso da Mastite clínica, o úbere da vaca apresenta-se inchado, avermelhado e quente. A composição do leite é alterada, com a presença de grumos, pus e sangue. Quando a vaca está com a Mastite subclínica, o leite e o úbere não apresentam alterações visíveis, sendo necessário realizar a análise do leite para a detecção [2]. Para o tratamento da Mastite são usados medicamentos antimicrobianos (antibióticos) o que implica em um importante fator a ser controlado para a produção de leite com qualidade. Quando se aplica um medicamento antibiótico em uma vaca, o leite por esta produzido passa a conter resíduos do medicamento durante um determinado tempo. Enquanto existir resíduos de antibiótico no leite, este não deve ser aproveitado ou comercializado. O leite com resíduos de antibióticos pode causar alergia em quem o beber; desenvolver resistência em bactérias causadoras de doenças e prejudicar o crescimento dos fermentos usados na fabricação de queijos e iogurtes, trazendo prejuízos à indústria e ao produtor. Devido aos prejuízos provocados à produção e aos riscos oferecidos para a saúde do consumidor, as indústrias de laticínios realizam um rigoroso controle durante a captação de leite para evitar seu uso com resíduos de antibióticos. Para este controle são empregados kits analíticos, que apesar de oferecerem um procedimento de análise simples, apresentam como desvantagens, longo tempo de espera para a obtenção dos resultados.

Na busca pela otimização do procedimento de análise de resíduos de antibióticos no leite cru, é proposto o desenvolvimento de um biossensor capaz de detectar penicilinas comumente utilizadas por produtores para o tratamento de rebanhos com mastite. A benzilpenicilina também conhecida como Penicilina G (Figura 1), foi a substância adotada para o desenvolvimento desta pesquisa.

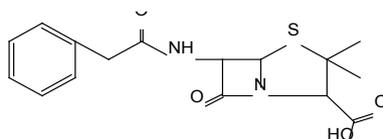


Figura 1: Estrutura da benzilpenicilina (Penicilina G)

Na construção do biossensor será empregada a enzima penicilinase, também conhecida como β -lactamase, cujo ciclo catalítico baseia-se no ataque ao anel β -lactâmico da Penicilina G, formando o ácido penicilinoico, segundo a sequência de reações mostrada na Figura 2 [3].

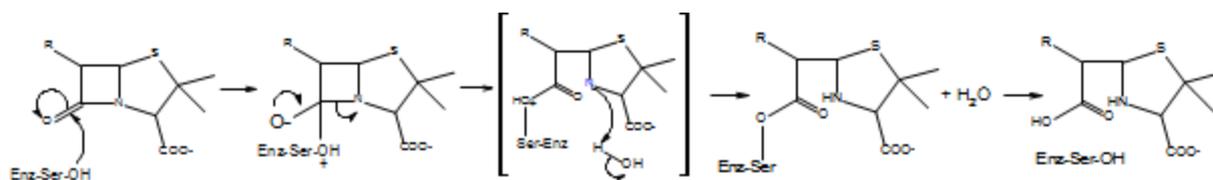


Figura 2: Mecanismo de ação da enzima penicilinase sobre uma penicilina.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Imobilização da enzima β -lactamase por ligação covalente em grafite funcionalizado com carbodiimida.

Para isto, foi seguido o procedimento descrito por Sotomayor *et al* [4]. Misturou-se 100 mg de pó de grafite com 1,1 mg de met-*p*-toluenesulfonato de *N*-Ciclohexil-*N'*-(2-morfolinoetil)carbodiimida (CDI) e 300 μ L de solução tampão acetato 0,05 mol L⁻¹ (pH 4,8) mantendo-se a mistura sob agitação durante 2 horas e 25 °C. A seguir a mistura foi lavada com água destilada e deixada secar por 4 horas à temperatura ambiente. A imobilização da enzima foi realizada pela mistura de 100 mg de grafite previamente ativado com CDI, 20 U de penicilinase (Sigma) dissolvida em solução tampão fosfato, 325 μ L de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e 30 mg de mediador de elétrons. A mistura foi deixada reagir por 16 horas a 4 °C, para permitir que a reação proceda-se. Após este tempo foi obtido um material seco, pronto para ser misturado com 40 μ L de óleo mineral (Nujol®) para obtenção da pasta de carbono, a qual foi colocada na extremidade de um tubo de vidro de 4 mm de diâmetro interno e 1 mm de profundidade, para obter o respectivo biossensor.

Neste trabalho, foram avaliados os mediadores; *bis*(ciclo-pentadienil)ferroceno (ferroceno), tetracianoquinodimetano (TCNQ) e ftalocianina de cobalto (CoPc).

Pastas de carbono contendo grafite funcionalizado com CDI sem enzima e sem mediador, também foram preparadas para efeitos de comparação.

Medidas eletroquímicas.

As medidas eletroquímicas foram realizadas com o auxílio de um potenciostato Palm-Sense® da Palm Instruments BV (Holanda) utilizando-se cela eletroquímica convencional de três eletrodos empregando como eletrodo de referência o de Ag|AgCl, KCl_{sat}, um anel de Pt como eletrodo auxiliar e o biossensor à base de penicilinase como trabalho. Foram empregadas as técnicas de voltametria cíclica, no intervalo de potencial de -0,3 a 0,5 V e velocidade de varredura de 0,02 V s⁻¹; e, a amperometria em potencial de -100 mV vs Ag|AgCl, com adições sucessivas de alíquotas de uma solução padrão 0,01 mol L⁻¹ de penicilina G no eletrólito suporte.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estágio da pesquisa foram otimizadas as condições de preparação da pasta em relação à quantidade de enzima e as condições de análise em relação ao potencial aplicado e ao tipo de tampão e pH do eletrólito suporte. As condições que permitiram obter melhores resultados até o momento foram para a preparação da pasta o uso de 20 U de enzima/100 mg de grafite-CDI e do CoPc como mediador de elétrons. Para a realização das medidas o uso de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0 como eletrólito, aplicando potencial de -215 mV foram as mais adequadas.

A Figura 3A mostra o perfil voltamétrico comparativo de: (a) uma pasta modificada apenas com o mediador CoPc e (b) do biossensor em eletrólito suporte; e (c) do biossensor na presença de 2,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de benzilpenicilina (Penicilina G). Observa-se que no biossensor, ocorre um aumento da corrente de redução a partir de -50 mV, o qual foi aproveitado para otimizar a quantificação de penicilina G, através de amperometria. Cabe ressaltar que, este perfil não foi observado quando foram preparadas as pasta com ferroceno e TCNQ; quando o grafite não foi funcionalizado com CDI; nem quando foram preparados biossensores usando a ligação covalente cruzada com glutaraldeído. Mostrando que ocorre um efeito sinérgico quando usados na preparação da pasta CoPc como mediador de elétrons e a enzima ligada ao grafite funcionalizado com CDI.

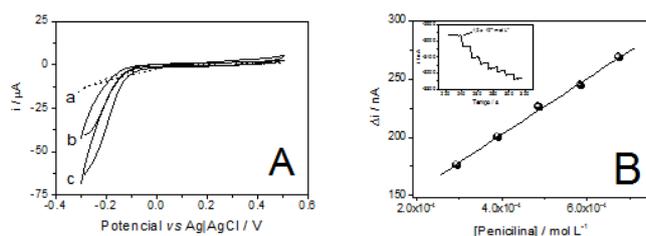


Figura 3: (A) Voltamogramas obtidos para o biossensor com β -lactamase imobilizada por ligação covalente (b,c) e pasta de carbono modificada apenas com mediador (a), medidas realizadas no eletrólito suporte de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹. (B) Curva analítica e inserido o perfil amperométrico do biossensor.

Na Figura 3B mostra-se a curva analítica obtida em -100 mV para o biossensor, mostrando seu correspondente amperograma inserido na mesma figura. O biossensor mostrou resposta linear na faixa entre $3,0 \times 10^{-4}$ e $7,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A equação que ajustou os dados ($R = 0,9989$ e $n = 5$) foi a seguinte:

$$\Delta i / A = 106(\pm 3) + 2,4 \times 10^{-5}(\pm 6,6 \times 10^{-3}) [Penicilina] / mol L^{-1} \quad (1)$$

Sob as condições otimizadas o sensor mostrou limite de detecção e quantificação de $3,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, respectivamente. Adicionalmente, visando a diminuição do limite de detecção do sensor, será utilizada na preparação da pasta nanotubos de carbono.

CONCLUSÕES

O sensor desenvolvido a base de pasta de carbono modificada com grafite funcionalizado com CDI, no qual a enzima com β -lactamase foi covalentemente imobilizada mostrou-se promissor na detecção de benzilpenicilina. Entretanto, apesar dos resultados obtidos para uma aplicação em leite, a detectabilidade do método deverá ser melhorada. Pensando nisto, estudos deverão ser realizados empregando nanotubos de carbono.

REFERÊNCIAS

- [1] LEITBOM, **Como valorizar seu leite**, Disponível em: <www.leitbom.com.br/produtor>. Acesso em: 27 nov. 2008.
- [2] VITAFORT, **Programa de controle biológico das mastites**. Disponível em: <www.vitafort.com.br/programas_bio>. Acesso em: 27 nov. 2008.
- [3] DROPA, M. **Caracterização de cepas genotípicas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo**. 2006. 97. Dissertação (Mestrado em Serviços de Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- [4] SOTOMAYOR, M.D.P.T., FACCHIN, I., OLIVEIRA NETO, G., KUBOTA, L.T. *Analyst*, 2001, **126**, 739–742.

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA GLICOSE BASEADO EM FILMES ELETRODEPOSITADOS DE POLIPIRROL

Dafne Pires Pinto¹, Robson Pacheco Pereira² e Ana Maria Rocco¹

¹ Grupo de Materiais Condutores e Energia, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ; ² Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda, RJ. amrocco@eq.ufrj.br

RESUMO: No presente trabalho, são obtidos filmes eletrodepositados de polipirrol (Ppy) e glicose oxidase (GOx) e caracterizados por Cronoamperometria (CA), Voltametria Cíclica (VC) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A caracterização por VC evidenciou que os processos eletroquímicos na superfície do filme são irreversíveis e controlados pela difusão das espécies até o eletrodo, para os quais os valores de corrente de pico apresentam uma dependência linear com $v^{1/2}$, enquanto os potenciais associados aos mesmos variam linearmente com v .

Palavras-chave: biossensores, eletropolimerização, voltametria cíclica.

INTRODUÇÃO

A detecção e quantificação de substâncias como colesterol e glicose no organismo é de grande importância em análises clínicas, uma vez que a concentração destas substâncias, entre outras, pode ser utilizada como parâmetro de diagnóstico na prevenção e tratamento de inúmeras patologias [1]. Desde 1957 [2], técnicas espectrofotométricas têm sido empregadas na quantificação de substâncias em fluidos fisiológicos e há, atualmente, diversas metodologias para estas determinações analíticas. Em comparação às técnicas frequentemente empregadas, a utilização de métodos eletroquímicos na quantificação de analitos de origem biológica pode apresentar vantagens em relação à velocidade e ao custo de execução da determinação [3].

Os trabalhos descritos na literatura sobre o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos utilizando polímeros condutores envolve a síntese química ou eletroquímica do polímero com a imobilização de enzimas específicas durante este processo. Esta imobilização pode ser covalente [4] ou *via* interações intermoleculares entre a enzima e a matriz do polímero [5]. Diferentes métodos de imobilização são descritos na literatura, envolvendo a modificação química de superfícies de filmes poliméricos [6], o encapsulamento de enzimas com revestimento de polímero condutor [7] e a imobilização de enzimas durante eletropolimerização [8], dentre outros. Alguns biossensores têm limite de detecção da ordem de 10^{-8} mol.L⁻¹ [9] e, em geral, a especificidade da detecção permite a utilização do dispositivo diretamente em fluidos e amostras reais.

No presente trabalho, foram obtidos eletroquimicamente biossensores baseados em polipirrol (Ppy) e glicose oxidase (GOx) e caracterizados por técnicas eletroquímicas e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

PARTE EXPERIMENTAL

Todas as sínteses e caracterizações eletroquímicas foram realizadas em célula de três eletrodos na qual foram utilizados Pt (como eletrodo de trabalho e contra-eletrodo) e ECS (como referência). Filmes dos sistemas Ppy/GOx foram obtidos por polimerização galvanostática a partir de soluções aquosas contendo pirrol, KCl como eletrólito suporte e GOx em meio tamponado (tampão fosfato equimolar). As sínteses foram realizadas aplicando-se uma corrente de 0,5 mA durante 1000 s. Após as sínteses, os filmes foram lavados com água deionizada e imediatamente submetidos às caracterizações eletroquímicas.

Os filmes obtidos foram caracterizados por cronoamperometria (CA), voltametria cíclica (VC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Em todas as sínteses e caracterizações eletroquímicas foi utilizado um potenciostato Autolab PGSTAT30/FRA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a curva $E \times t$ obtida durante a síntese de um filme Ppy/GOx utilizando $[Py] = 0,1$ M; $[KCl] = 1,0$ M, $[GOx] = 1$ mg/mL e tampão fosfato equimolar, evidenciando uma etapa rápida de nucleação seguida de uma etapa mais lenta de crescimento do filme.

A curva mostrada na Figura 1 é representativa das sínteses dos filmes Ppy/GOx e evidencia a deposição de material eletroativo na superfície do eletrodo de trabalho. Entre A e B ocorre a oxidação dos monômeros em solução, próximos à superfície do eletrodo, em um processo controlado pela difusão dos mesmos, e o início da formação de oligômeros. Entre B e C, ocorre o início da nucleação destes oligômeros e sua deposição na superfície do eletrodo, em um processo controlado pela difusão dos oligômeros. A partir de C até D, ocorre o crescimento destas estruturas recém nucleadas,

dando origem a um filme contínuo na superfície do eletrodo. Esse tipo de deposição foi observado para filmes de polipirrol obtidos anteriormente empregando ânions complexos contra íons [10].

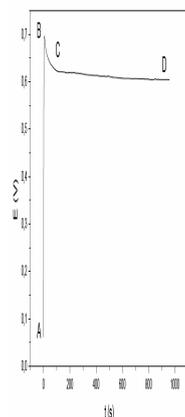


Figura 1. Evolução do potencial (E) em função do tempo durante a síntese de filmes Ppy/GOx.

Na Figura 2 são mostrados os voltamogramas cíclicos para os filmes Ppy/GOx, nos quais são observados um processo anódico e um catódico, associados à oxidação e à redução da glicose, respectivamente. Os processos característicos do Ppy provavelmente ocorrem na mesma faixa de potencial dos processos observados, sendo as ondas catódicas e anódicas detectadas, uma soma dos processos do polímero e do substrato.

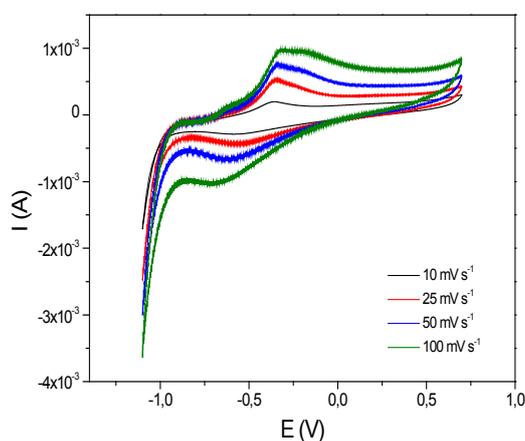


Figura 2. Voltamogramas cíclicos de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 1,0 M, tampão fosfato equimolar e [GOx] = 1 mg/mL. Potencial aplicado vs ECS.

Os voltamogramas cíclicos evidenciam um par redox com potenciais entre -0,3608 e -0,3217 V (oxidação) e entre -0,6882 e -0,5834 V (redução). Este par redox, dado os seus valores de potencial, constitui um sistema irreversível [11], o que é coerente com a formação de produtos oxidados a partir da glicose, os quais apresentam um comportamento redox distinto. Observando-se os voltamogramas, percebe-se um aumento no valor I_p e de ΔE_p com a velocidade de varredura, o que indica que os processos são dependentes de um controle difusional, associado, no presente estudo, à difusão da glicose até a superfície do filme. A dependência da corrente de pico de oxidação e de redução com a raiz quadrada da velocidade de varredura são mostradas na Figura 3.

Da Figura 3, observa-se a relação linear entre a corrente de pico (I_{ox} e I_{red}) e a raiz quadrada da velocidade de varredura, o que sugere a existência de um controle difusional na superfície do eletrodo [12], associado, em princípio, ao processo de dopagem do polímero. Esse comportamento é similar ao encontrado para outros filmes de polipirrol nos quais não são empregadas enzimas, o que indica o mesmo comportamento eletroativo para o filme condutor polimérico.

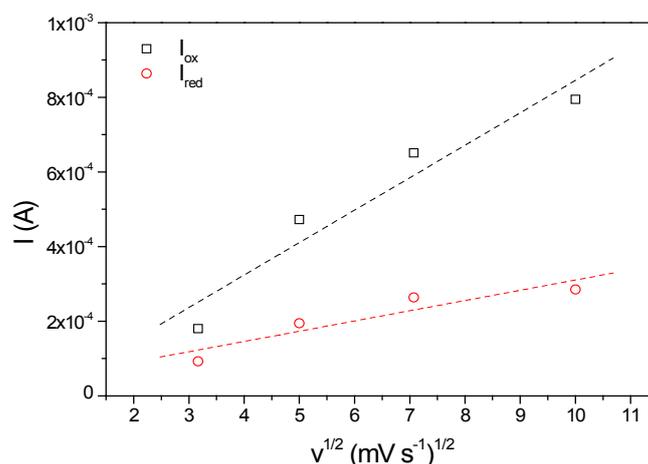


Figura 3. Dependência da corrente de pico (anódico, I_{ox} , e catódico, I_{red}) com a raiz quadrada da velocidade de varredura para filmes Ppy/GOx.

CONCLUSÕES

Filmes Ppy/GOx foram obtidos reprodutivelmente e caracterizados por técnicas eletroquímicas e morfológicas. Os resultados sugerem que os filmes apresentam eletroatividade com a presença da enzima na superfície, de forma similar a outros filmes de polipirrol relatados na literatura. A caracterização dos dispositivos em solução contendo glicose e sem glicose sugere o reconhecimento do soluto (glicose) presente na solução devido à maior definição dos picos de oxidação e redução na solução contendo glicose.

AGRADECIMENTOS: CNPq, FAPERJ, PIBIC/UFRJ e ProPPI/UFF.

REFERÊNCIAS

- [1] TAN X.C., LI M.J., CAI P.X., LUO L.J., ZOU X.Y., "An amperometric cholesterol biosensor based on multiwalled carbon nanotubes and organically modified sol-gel/chitosan hybrid composite film", *Analytical Biochemistry* 337(1):111-120, 2005.
- [2] ZAK B., "Simple rapid microtechnic for serum total cholesterol", *American Journal of Clinical Pathology* 27(5):583-588, 1957.
- [3] RAHMAN M.A., KUMAR P., PARK D.S., SHIM Y.B., "Electrochemical sensors based on organic conjugated polymers", *Sensors* 8(1):118-141, 2008.
- [4] RAHMAN M.A., WON M.S., SHIM Y.B., "Xanthine sensors based on anodic and cathodic detection of enzymatically generated hydrogen peroxide", *Electroanalysis* 19(6):631-637, 2007.
- [5] SEKER S., BECERIK I., "A neural network model in the calibration of glucose sensor based on the immobilization of glucose oxidase into polypyrrole matrix", *Electroanalysis* 16(18):1542-1549, 2004.
- [6] FIORITO P.A., BRETT C.M.A., DE TORRESI S.I.C., "Polypyrrole/copper hexacyanoferrate hybrid as redox mediator for glucose biosensors", *Talanta* 69(2):403-408, 2006.
- [7] RAMANAVIČIUS A., KAUSAITĖ A., RAMANAVIČIENĖ A., "Polypyrrole-coated glucose oxidase nanoparticles for biosensor design", *Sensors and Actuators B* 111:532-539, 2005.
- [8] WANG J., MUSAMEH M., "Carbon-nanotubes doped polypyrrole glucose biosensor", *Analytica Chimica Acta* 539(1-2):209-213, 2005.
- [9] DARAIN F., PARK J.S., AKUTSU H., SHIM Y.B., "Superoxide radical sensing using a cytochrome c(3) immobilized conducting polymer electrode", *Biosensors and Bioelectronics* 23(2):161-167, 2007.
- [10] DA CRUZ A.G.B., WARDELL J.L., RANGEL M.V.D., SIMÃO R.A., ROCCO A.M., "Preparation and characterization of a polypyrrole hybrid film with [Ni(dmit)(2)](2-), bis(1,3-dithiole-2-thione-4,5-dithiolate)nickellate(II)", *Synthetic Metals* 157(2-3):80-90, 2007.
- [11] BARD A.J., FAULKNER L.R., *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, 2nd Ed, NY: EUA, John Wiley & Sons, 2001.
- [12] SHILABIN A.G., ENTEZAMI A.A., "Electrochemical behaviour of conducting polyfuran derivatives containing pyrrole, thiophene and ethylenic spacers", *Eur Pol J* 36(9):2005-2020, 2000.

CONSTRUÇÃO DE UMA PLATAFORMA FUNCIONAL PARA COMPLEXAÇÃO DE ÍONS COBRE VISANDO À DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE CISTEÍNA

Cecília de Carvalho Castro e Silva¹, Murilo Santhiago¹, Cátia Crispilho Corrêa¹, Márcia Cristina Breikreitz¹, Ronei Jesus Poppi¹ e Lauro Tatsuo Kubota¹

¹ Instituto de Química - Unicamp, Campinas - SP - Brasil. cecsilva@iqm.unicamp.br

RESUMO: O presente trabalho descreve a obtenção de um nanocompósito de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) com poli(4-vinilpiridina) (PVP) e o seu emprego na construção de uma plataforma funcional para complexação de íons cobre, sobre um eletrodo de carbono vítreo (ECV), para confecção de um sensor amperométrico para detecção de cisteína. O ECV/MWCNTs-PVP/Cu²⁺ apresentou eletrocatalise eficiente para oxidação de cisteína. A curva analítica apresentou uma faixa linear de 5 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Já os limites de detecção e quantificação foram 1,49 e 4,98 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente e o tempo de resposta de apenas 0,10s.

Palavras-chave: Plataforma funcional, MWCNTs, nanocompósito, íons cobre e cisteína.

INTRODUÇÃO

As propriedades e aplicações dos nanotubos de carbono (NTCs) têm sido amplamente exploradas desde a sua descoberta por Iijima em 1991 [1]. Devido às suas características estruturais singulares, os NTCs apresentam grande área superficial e propriedades químicas, elétricas e mecânicas diferenciadas. Isto possibilita a utilização destes materiais no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Porém, o emprego dos NTCs no desenvolvimento de sensores eletroquímicos muitas vezes implica em sua modificação. Esta modificação busca contornar um dos problemas encontrados na manipulação dos NTCs, que é a dificuldade em dispersá-los, principalmente em meio aquoso. Estas modificações podem ainda facilitar a interação dos NTCs com moléculas orgânicas e biológicas e possibilitar a imobilização de complexos metálicos, biomoléculas, entre outros [2].

Os métodos tradicionais de modificação dos NTCs utilizam ácidos e agentes oxidantes fortes, como ácido sulfúrico e ácido nítrico, que destroem a estrutura sp^2 dos átomos de carbono, alterando as propriedades eletrônicas dos NTCs. Uma estratégia de modificação menos agressiva é o método de enxertia de polímeros (do inglês, "grafting from"). Onde o polímero é ligado à superfície dos NTCs por meio de uma reação de polimerização *in situ* do monômero na presença dos NTCs e iniciadores radicalares [3]. Dependendo do tipo de monômero utilizado na reação de polimerização existe a possibilidade de utilizar o nanocompósito obtido, na construção de plataformas para complexação de íons metálicos, formando um complexo polímero-metal. O ancoramento de íons cobre nestas plataformas é de grande interesse, já que estes íons apresentam propriedades eletrocatalíticas frente a uma vasta gama de compostos orgânicos [4]. Devido a estas propriedades eles se tornam excelentes candidatos para estudos eletroquímicos e modificação de eletrodos.

Diante do exposto, o presente trabalho descreve a construção e caracterização de uma plataforma funcional de nanocompósitos de MWCNTs contendo PVP para complexação de íons cobre, sobre um ECV, e o emprego desta plataforma na detecção amperométrica de cisteína.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para obter o nanocompósito de MWCNTs com PVP (MWCNTs-PVP), adaptou-se o procedimento descrito por Qin *et al* [3]. Onde 50 mg de MWNTs foram adicionados em 70 mL de DMF, sob atmosfera de nitrogênio e agitação magnética por 20 min. Posteriormente 80 mg AIBN e 10 mL de 4-vinilpiridina foram adicionados à mistura sob agitação a 70 °C, em banho termostaticado de óleo, por 48h. Após este período, a mistura obtida foi resfriada à temperatura ambiente e diluída a 300 mL de DMF, sendo em seguida centrifugada por 6 horas e filtrada em um sistema à vácuo, através de uma membrana PTFE de diâmetro de poro 0,20 μm .

Antes de realizar a modificação sobre o ECV, este foi polido com alumina 1,0; 0,5 e 0,3 μm . Logo após o ECV foi levado ao ultrassom em uma solução 1:1 (v/v) etanol/água por 5 minutos. Em seguida, a superfície do eletrodo foi lavada com água e seca à temperatura ambiente.

Para realizar a modificação do ECV, inicialmente foi preparada uma dispersão contendo 6,00 mg de MWCNTs-PVP e 1 mL DMF, utilizando um banho de ultrassom por 2 h. Uma alíquota de 2,5 μL desta dispersão foi adicionada ao ECV limpo e em seguida aguardou-se o eletrodo secar à temperatura ambiente. Posteriormente o eletrodo foi imerso por 83 minutos em uma solução aquosa de cloreto de cobre (II) 50,00 mmol L^{-1} , visando a complexação dos íons cobre na superfície do ECV modificado. Os parâmetros concentração da dispersão de MWCNTs-PVP e da solução de cloreto de cobre (II) e tempo de complexação dos íons cobre, foram previamente otimizados a partir de um planejamento composto central de face centrada.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato modelo PGSTAT 30 da Autolab. Uma célula eletroquímica composta por três eletrodos foi empregada, sendo o eletrodo de trabalho o ECV modificado, o de referência um eletrodo de calomelano saturado (ECS) e o auxiliar um fio de platina helicoidal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da reação de polimerização *in situ* via radical livre, foi possível obter o desmembramento e funcionalização dos MWCNTs em uma única etapa, sendo ainda que, a PVP formou uma rede polimérica em torno dos MWCNTs, funcionalizando-os com grupos piridínicos, que possibilitou o ancoramento dos íons cobre.

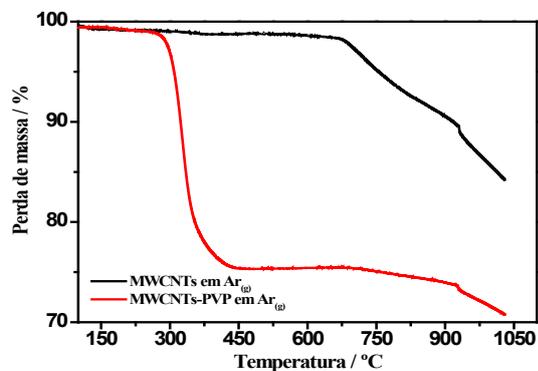


Figura 1. Curvas termogravimétricas para MWCNTs e MWCNTs-PVP. Taxa de aquecimento a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, em atmosfera inerte de argônio ($\text{Ar}_{(g)}$).

Através da análise termogravimetria do MWCNTs-PVP, Figura 1, foi possível realizar uma estimativa da porcentagem de PVP no nanocompósito, sendo esta de aproximadamente 23%. Esta porcentagem é suficiente para garantir um número significativo de sítios de coordenação no nanocompósito. Além disso, uma porcentagem muito maior de PVP na composição do nanocompósito poderia dificultar a transferência de elétrons entre o MWCNTs-PVP/ Cu^{2+} e o ECV, já que a condutividade elétrica da PVP em temperatura ambiente é extremamente baixa, na ordem de $10^{-14}\text{ S cm}^{-1}$.

Foram realizados alguns ensaios com o intuito de estudar as propriedades eletroquímicas do ECV modificado com o nanocompósito e ancorado com íons cobre (MWCNTs-PVP/ Cu^{2+}). Portanto, foram obtidos voltamogramas cíclicos com o ECV/MWCNTs-PVP/ Cu^{2+} , na faixa de potencial de -450 a 450 mV vs ECS , em várias velocidades de varredura ($10 - 850\text{ mVs}^{-1}$), conforme mostrados na Figura 2.

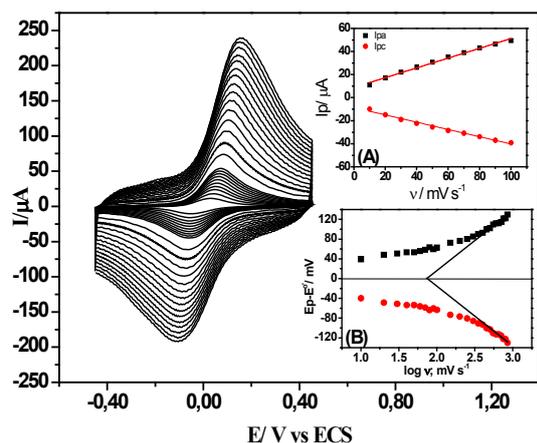


Figura 2. Voltamogramas cíclicos obtidos pelo ECV/MWCNTs-PVP/ Cu^{2+} em várias velocidades de varredura ($10-850\text{ mV s}^{-1}$). Tampão fosfato de potássio $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. (A) I_p vs v . (B) Gráfico de Laviron.

A Figura 2, exibe voltamogramas cíclicos com picos bem definidos e que apresentam um aumento de corrente em função do aumento da velocidade de varredura. Ao se analisar o gráfico das correntes de picos anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) em função da velocidade de varredura, Figura 2 (A), é possível observar que estas exibem um comportamento linear em função da velocidade de varredura, indicando assim, que os íons cobre possuem um comportamento eletroquímico característico de espécies redox do que estão confinadas na superfície do eletrodo. Com o objetivo de caracterizar eletroquimicamente o ECV/MWCNTs-PVP/ Cu^{2+} , obteve-se a constante de velocidade heterogênea de

transferência de elétrons (k_s), o coeficiente de transferência de elétrons (α) e o número de elétrons (n) a partir do gráfico de Laviron (Fig. 2 (B)). Sendo os valores encontrados de $k_s = 5,78 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 0,5$ e $n = 1$.

Foram avaliados o efeito do pH (5,0 – 8,0), do tipo (PIPES, TRIS, HEPES e Fosfato) e da concentração do eletrólito de suporte (0,01 – 0,50 mol L⁻¹), na resposta eletroquímica do ECV/MWCNTs-PVP/Cu²⁺, por meio de experimentos de voltametria cíclica, onde foi monitorado o valor de I_{pa} . A condição otimizada para trabalho com o ECV/MWCNTs-PVP/Cu²⁺ é em solução tampão fosfato de potássio, pH 7,0 a 0,1 mol L⁻¹.

O ECV/MWCNTs-PVP/Cu²⁺ foi avaliado em relação ao seu potencial electrocatalítico para detecção de cisteína. Neste sentido, foram obtidos voltamogramas cíclicos, Figura 3 (I), com o ECV/MWCNTs-PVP/Cu²⁺ na ausência (A) e na presença de 0,8 mmol L⁻¹ de cisteína (B). A Figura 3 (I) (A) exibe o voltamograma cíclico obtido em tampão fosfato, 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 a 5 mV s⁻¹. É possível visualizar que o ECV/MWCNTs-PVP/Cu²⁺ exibe um par redox bem definido em uma região de baixos sobrepotenciais, com um valor de E_0' de 0 mV. Após a adição de cisteína à solução, Figura 3 (I) (B), o pico de oxidação aumentou significativamente para o processo redox Cu^{I/II} e o pico de redução diminuiu indicando assim, uma electrocatálise eficiente. Posteriormente, após ter sido realizada uma otimização dos parâmetros analíticos, obteve-se a resposta cronoamperométrica do ECV/MWCNTs-PVP/Cu²⁺ para a oxidação de cisteína, Figura 3 (II), onde os estudos foram realizados em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 e potencial aplicado (E_{ap}) de 150mV vs ECS. A partir da resposta cronoamperométrica obtida pelo ECV/MWCNTs-PVP/Cu²⁺ em função da concentração de cisteína, confeccionou-se a curva analítica para o sensor, conforme exibido no inserto da Figura 3 (II), onde pode ser observada uma faixa linear de 5 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$, podendo ser expressa pela seguinte equação:

$$DI (\mu\text{A}) = 0,0168 (\pm 0,0039) + 0,0070 (\pm 0,0001) [\text{Cisteína}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad \text{Equação 1}$$

com um coeficiente de correlação de 0,998. O sensor apresentou limite de detecção e quantificação de 1,49 e 4,98 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, calculados seguindo as recomendações da IUPAC, uma sensibilidade de 7 nA L μmol^{-1} e um tempo de resposta extremamente baixo, de apenas 0,10 s.

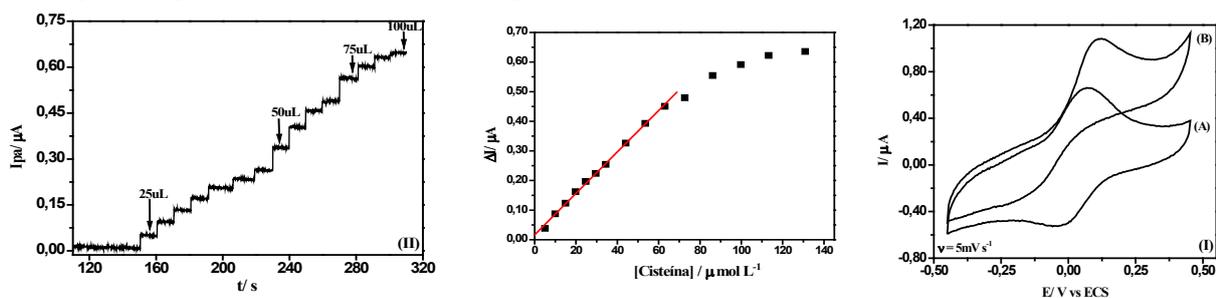


Figura 3: (I) Voltamogramas cíclicos obtidos para o ECV/MWCNTs-PVP/Cu²⁺, (A) na ausência e na presença de cisteína (B) 0,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. (II) Resposta cronoamperométrica obtida após sucessivas adições de uma solução estoque de cisteína $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. E_{ap} : 150 mV vs ECS. Inseto: curva analítica.

CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou a construção de uma plataforma funcional de nanocompósitos de MWCNTs-PVP, para complexação de íons cobre, e o emprego desta plataforma na detecção amperométrica de cisteína. O ECV/MWCNTs-PVP/Cu²⁺ apresentou electrocatálise eficiente para cisteína, com uma ampla faixa linear de resposta amperométrica, de 5 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Já os limites de detecção e quantificação foram 1,49 e 4,98 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Além disso o ECV/MWCNTs-PVP/Cu²⁺ responde de maneira muito rápida na detecção amperométrica de cisteína, com um tempo de resposta de apenas 0,10 s.

AGRADECIMENTOS: FAPESP e INCT Bioanalítica.

REFERÊNCIAS

- [1] IJIMA S. "Helical microtubules of graphitic carbon". *Nature*. 354: 56-58, 1991.
- [2] HUCZKO A. "Synthesis of aligned carbon nanotubes", *Appl. Phys. A*. 74: 617-638, 2002.
- [3] QIN S.; QIN D.; FORD W. T.; RESASCO D. E.; HERRERA J. E. "Grafting of poly(4-vinylpyridine) to single-walled carbon nanotubes and assembly of multilayer films", *Macromolecules*. 37: 9963-9967, 2004.
- [4] BELLE C.; RAMMAL W.; PIERRE J. L. "Sulfur ligation in copper enzymes and models", *J. inorg. biochem.* 99: 1929-1936, 2005.

ESTUDO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA DA ACETILCOLINESTERASE EM SOLUÇÃO E AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBIDOR POR CARBARIL E PARATION

Lívia Flório Sgobbi e Sergio Antonio Spinola Machado

Instituto de Química de São Carlos - USP, São Carlos - SP - Brasil. liviaflorio@iqsc.usp.br

RESUMO: Os biossensores que utilizam acetilcolinesterase são empregados na detecção de pesticidas organofosforados e carbamatos, baseados em mecanismos de inibição enzimática. A imobilização da enzima é o passo mais importante no desenvolvimento de um biossensor, já que a atividade da enzima tem que ser mantida. Dessa forma, o conhecimento da cinética enzimática é essencial. Assim, a partir do método espectrofotométrico de Ellman calcularam-se os parâmetros cinéticos da acetilcolinesterase, como $V_{m\acute{a}x}$ e K_M , sendo esses $6,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. O comportamento inibitório de dois tipos de pesticidas, carbaril e paration, foi estudado e as constantes cinéticas de inibição calculadas. O carbaril apresentou mecanismo de inibição reversível não-competitivo, com diminuição de 22% e 38% na velocidade máxima aparente, quando adicionado menor e maior concentração deste pesticida, mantendo o K_M constante. Enquanto que o paration inibiu a ação da enzima irreversivelmente, diminuindo V_{mapp} em 31% e não alterando K_M .

Palavras-chave: biossensor, cinética enzimática, acetilcolinesterase, pesticidas, inibição.

INTRODUÇÃO

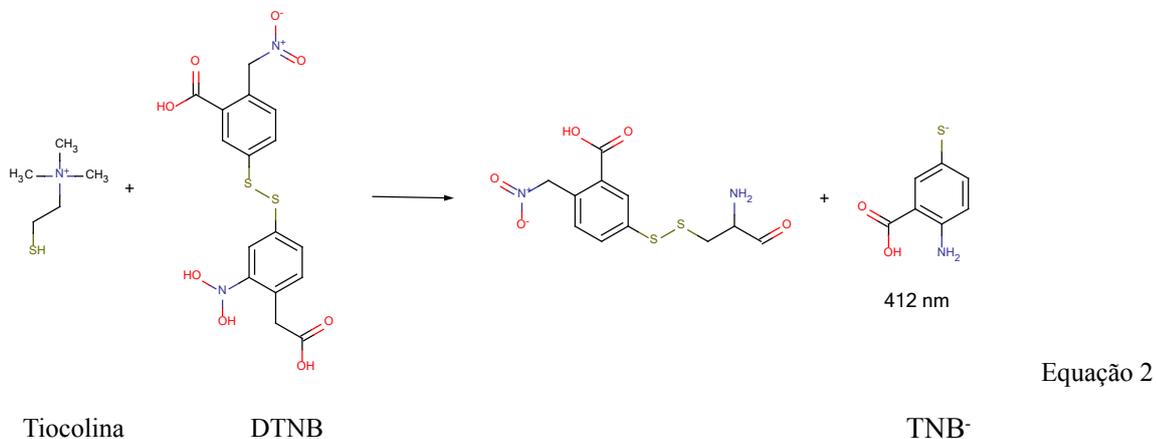
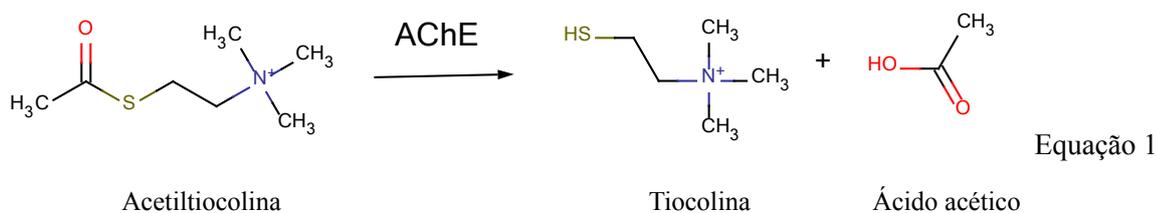
A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima amplamente utilizada na preparação de biossensores para detecção de pesticidas da classe dos carbamatos e organofosforados [1,2,3]. Isto se deve ao fato de que a AChE é um enzima alvo para estudos baseados em mecanismos de inibição dessa enzima. Desta forma, o conhecimento dos parâmetros da cinética enzimática, tais como a velocidade máxima e a constante de Michaelis, em solução são de grande importância para a aplicação dessa enzima no desenvolvimento de biossensores.

Assim, alguns estudos mostram que após a etapa de imobilização das enzimas sobre transdutores, como os eletroquímicos (por exemplo, nanoestruturas de ouro, nanotubos de carbono, polímeros condutores, etc.) ocorre uma drástica diminuição da atividade da enzima, principalmente em função da estratégia de imobilização utilizada (ligação covalente cruzada, ligação covalente, oclusão em gel, adsorção física) [4,5]. Essa alteração na conformação da enzima afeta a velocidade de reação da enzima, podendo até alterar o seu mecanismo de ação na presença de inibidores. Desta maneira, tendo conhecimento a cerca dos parâmetros cinéticos da enzima livre em solução pode se alcançar um melhor entendimento sobre o comportamento da enzima após a sua imobilização.

Assim, por meio do método espectrofotométrico proposto por Ellman [4] determinaram-se os parâmetros cinéticos de velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$), constante de Michaelis (K_M), além das constantes relacionadas à inibição enzimática por pesticidas, como a velocidade máxima aparente (V_{mapp}). O próximo passo destes estudos serão a avaliação dos parâmetros da enzima AChE após a sua imobilização sobre eletrodos de ouro modificados com alcanotíóis.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O método de Ellman foi utilizado para construção da curva de Michaelis-Menten e a partir do ajuste da hipérbole observada foram extraídos os valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_M . Este método espectrofotométrico está baseado no fato de que a tiocolina, que é um dos produtos da hidrólise enzimática da acetiltiocolina (ATCh) reage imediatamente, quantitativamente e irreversivelmente com o ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), formando um produto amarelo (ácido 5-mercapto-2-nitrobenzóico), como mostrado nas equações 1 e 2. A absorbância *versus* tempo foi medida em pH 7,0 (tampão BR) a temperatura constante, em 412 nm. Preparou-se uma solução estoque de acetilcolinesterase de enguia elétrica (AChEe) de $1,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O intervalo de concentração de acetiltiocolina (substrato) foi de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Para os experimentos de inibição enzimática, foram preparadas uma solução estoque de carbaril $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em água e uma de paration $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 3% de butanol, para não haver influência na atividade enzimática. O tempo de incubação do carbaril com a enzima foi de 10 min, e com o paration foi de 5 min. Para todos os experimentos, foram adicionados 25 μL da solução da enzima na cubeta, com volume final igual a 3mL. As constantes relacionadas com a inibição enzimática foram calculadas e o tipo de inibição enzimática foi determinado para cada pesticida.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos de cinética de inibição enzimática foram realizados utilizando concentrações de carbaril de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de paration. Os parâmetros cinéticos da AChE livre de inibidores foram $V_{\text{máx}} = 6,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $K_M = 1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A velocidade máxima aparente (V_{mapp}) apresentou diminuição de 22% para enzima inibida com carbaril $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e de 38% com carbaril $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. No caso do paration $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, houve diminuição de 31%. Os valores de K_M da enzima inibida não sofreram alteração, como pode ser visto na Tabela 1. O tipo de inibição foi determinado analisando-se as constantes calculadas. Verificou-se que o carbaril inibe a AChE de forma reversível não-competitiva [6] e que o paration inibe a enzima irreversivelmente [7] (Figura 1).

Tabela 1: Constantes cinéticas da acetilcolinesterase inibida por pesticidas da classe dos carbamatos e organofosforados

Pesticida	V_{mapp}	K_m	K_i
Carbaril ($1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$)	$5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}\text{s}^{-1}$	$1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$6,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$
Carbaril ($5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$)	$4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}\text{s}^{-1}$	$1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$2,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$
Paration ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$)	$4,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}\text{s}^{-1}$	$1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$2,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$

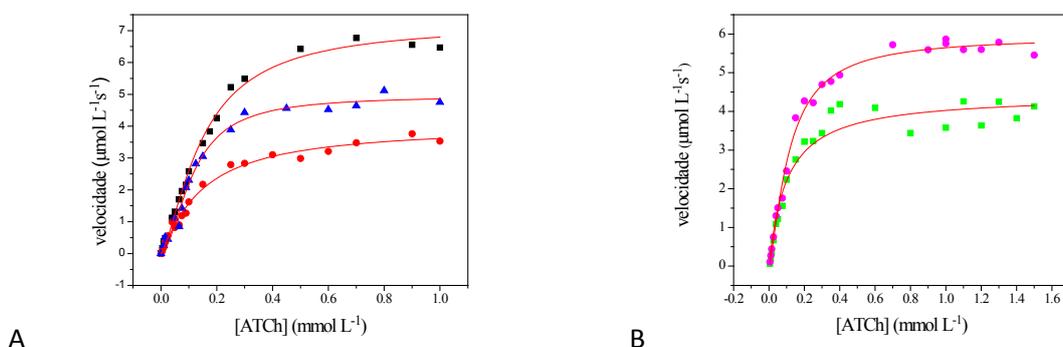


Figura 1: Curva de Michaelis-Menten A) para enzima acetilcolinesterase (•) livre de inibidores, na presença de carbaril (◼) $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e (◉) $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, B) para enzima acetilcolinesterase (◉) livre de inibidores, na presença de paration (◉) $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

CONCLUSÕES

A atividade da AChE diminui quando é inibida por pesticidas da classe dos organofosforados e carbamatos, paration e carbaril, respectivamente. O carbaril inibe a enzima de modo reversível não-competitivo, no qual a velocidade máxima diminui e o K_M não é alterado. Já o paration inibe a AChE de forma irreversível, apresentando diminuição da velocidade máxima e mantendo o K_M constante. A constante de inibição K_i foi determinada, mostrando que o aumento na concentração de inibidor, leva ao aumento de K_i , ou seja, a força inibidora do reagente aumenta, com o aumento de concentração.

Com base nos resultados obtidos a próxima avaliação da ação inibitória destes compostos será observada após a imobilização da enzima AChE sobre eletrodos de ouro modificados com alcanotóis para fins de comparação dos parâmetros cinéticos obtidos com a enzima livre em solução. Além disso, tendo em vista o perfil das curvas cinéticas apresentadas após a imobilização da enzima e com os valores de K_i podem ser realizadas correlações com a menor quantidade de pesticida mensurável em uma amostra contaminada com carbaril ou paration.

AGRADECIMENTOS: CNPq

REFERÊNCIAS

- [1] ZAMFIR, L. G.; ROTARIU, L.; BALA, C., “A novel, sensitive, reusable and low potential acetylcholinesterase biosensor for chlorpyrifos based on 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate/ multi walled carbon nanotubes gel”, *Biosensors&Bioelectronics*, 26: 3692-3695, 2011.
- [2] VALDÉS-RAMÍREZ, G.; CORTINA, M.; RAMÍREZ-SILVA, M. T.; MARTY, J. L., “Acetylcholinesterase-based biosensors for quantification of carbofuran, carbaryl, methylparaoxon, and dichlorvosin 5% acetonitrile”, *Anal. Bioanal. Chem.* 392:699–707, 2008.
- [3] CAETANO, J.; MACHADO, S. A. S., “Determination of carbaryl in tomato “in natura” using an amperometric biosensor based on the inhibition of acetylcholinesterase activity”, *Sensors and Actuators*, 129: 40–46, 2008.
- [4] KUNZMANN, A.; ANDERSSON, B.; THURNHERR, T.; KRUG, H.; SCHEYNIUS, A.; FADEEL, B., “Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation” *Biochimica et Biophysica Acta*. 1810: 361-373, 2011.
- [5] RUSSIER, J.; MÉNARD-MOYON, C.; VENTURELLI, E.; GRAVEL, E.; MARCOLONGO, G.; MENEGUETTI, M.; DORIS, E.; BIANCO, A., “Oxidative biodegradation of single- and multi-walled carbon nanotubes” , *Nanoscale*. 3: 893-896, 2011.
- [6] ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R. M. “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity”, *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95, 1961.
- [7] NOROUZY, A.; QUJEQ, D.; HABIBI-REZAEI, M. “The inhibitory effect of dissolved carbaryl in dioxane on physically adsorbed acetylcholinesterase”, *React. Kinet. Catal. Lett.* 98:391–401, 2009.
- [7] FORSBERG, A.; PUU, G.; “Kinetics for the inhibition of acetylcholinesterase from the electric eel by some organophosphates and carbamates”, *Eur. J. Biochem.* 140: 153-156, 1984.

DESENVOLVIMENTO DE SENSOR BIOMIMÉTICO PARA DETECÇÃO DO HERBICIDA 2,4-D

Ademar Wong (PG)* e Maria Del Pilar Taboada Sotomayor (PQ)

Instituto de Química - Unesp, Araraquara - SP – Brasil. ademar.wong@iq.unesp.br

RESUMO: Um sensor biomimético para monitoramento do herbicida 2,4-D foi desenvolvido a partir de um eletrodo de pasta de carbono modificado com complexo derivado de porfirina de ferro (III). A detecção e a quantificação do 2,4-D ocorreram com a voltametria cíclica e cronoamperometria. Os melhores resultados foram obtidos aplicando potencial de $-0,100\text{ V vs Ag/AgCl (KCl}_{\text{sat}})$ em tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$ e pH 6,0. A faixa linear de resposta obtida foi entre $9,9\text{-}65,4\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, com um limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de $0,39$ e $1,29\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O sensor biomimético apresentou alta sensibilidade e seletividade possibilitando utilizar esse dispositivo em várias matrizes.

Palavras-chave: sensor biomimético, 2,4-D, amperometria, herbicida, enzima P450.

INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos têm gerado preocupações, devido o seu uso indiscriminado e lançamento inadequado no meio ambiente. Sendo os agrotóxicos tóxicos ao homem e organismos vivos, devem ser tomadas precauções quanto a sua aplicação e, principalmente, quanto aos resíduos provenientes das mais diversas fontes, visando a disposição final adequada, sem comprometimento do meio ambiente como um todo e do solo em particular. O 2,4-D e vários outros POPs (poluentes orgânicos persistentes) em geral são exemplos de agrotóxicos bastante estáveis que apresentam uma degradação lenta e por isso, são encontrados no ambiente natural. O 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) pertence à classe química dos fenoxiacéticos sendo recomendado para pastagens, gramados e culturas gramíneas (arroz, cana-de-açúcar, milho, trigo, etc). Apresenta uma toxicidade moderada para mamíferos, é absorvido pela pele, via digestiva e por inalação, promovendo agudamente, alterações da glicemia de forma transitória, simulando um quadro clínico de diabetes, alterações neuromusculares por neurite periférica, e a longo prazo podem causar distúrbios reprodutivos e alguns tipos de câncer como linfomas [1].

O desenvolvimento de um sensor biomimético é neste caso, uma alternativa viável para o monitoramento do 2,4-D no meio ambiente. Os sensores biomiméticos são baseados de um modo geral, em mecanismos de reconhecimento molecular de substratos enzimáticos através de enzimas artificiais que imitam o sítio ativo de alguma enzima redox, como a P450. As enzimas P450 são conhecidas também de citocromo P450 e se encontram presentes no nosso organismo, metabolizando uma variedade de compostos de origem orgânica, como fármacos e xenobióticos. Complexos a base de porfirina e ftalocianina têm sido bastante estudados para mimetizar as enzimas P450. Estes dispositivos visam vencer as limitações de biossensores enzimáticos tais como disponibilidade, custo e instabilidade das enzimas; assim como promover uma melhora na transferência eletrônica entre eletrodo/sítio ativo (complexo redox) / substrato [2].

Desta forma, este trabalho mostra o desenvolvimento e otimização de um sensor biomimético à base de pasta de carbono modificada com um complexo derivado de porfirina de ferro (III) para detecção sensível e seletiva de 2,4-D.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Reagentes e Soluções

Foram utilizados no desenvolvimento do trabalho o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ametrin, clorpirifós, metribuzin, carbendazin, carbofuran, diuron, hexazinona, tebutiuron, tricloro-2-piridinol, complexo derivado de porfirina de ferro (III), óleo mineral e grafite em pó todos provenientes da Sigma-Aldrich®; o KH_2PO_4 , o acetato de sódio e o hidróxido de sódio adquiridos da Synth®; o tampão orgânico TRIS e o TRISMA foram fornecidos pela Merck®.

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade $\geq 18\text{ M}\Omega\text{ cm}$ a 25°C) obtida do sistema de purificação Milli-Q (Direct-0,3).

Construção do sensor biomimético

A preparação da pasta de carbono para determinação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foi realizada misturando pó de grafite, o complexo derivado de porfirina de ferro (III) e tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). O material foi cuidadosamente homogeneizado com uma espátula de aço inox, e a seguir deixado secar a temperatura ambiente. Sobre o material seco, adicionou-se o agente aglutinante, óleo mineral (Nujol®), para a obtenção da pasta de carbono.

A pasta de carbono modificada foi colocada na cavidade de um eletrodo composto de um tubo de vidro e um fio de platina incorporado nele, que está em contato com um disco de platina de 4 mm de diâmetro e colocado à profundidade

de 1 mm de uma das extremidades do tubo, deixando uma cavidade própria para a incorporação da pasta no eletrodo. Em seguida a superfície foi uniformizada com papel sulfite limpo para se obter uma superfície homogênea.

Sistema de análise para determinação do 2,4-D

As medidas eletroquímicas em batelada foram realizadas em um micro-potenciostato da Autolab®, usando uma célula eletroquímica convencional de 03 eletrodos, contendo um eletrodo de referência de Ag/AgCl(KCl_{sat}) comercial da Analion®, um fio de platina em forma de espiral como eletrodo auxiliar e o eletrodo de pasta de carbono modificada como eletrodo de trabalho.

As técnicas eletroanalíticas utilizadas neste estudo foram a voltametria cíclica para caracterização eletroquímica do sensor proposto e a amperometria para efetuar as análises quantitativas do ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização eletroquímica do sensor através de estudo voltamétrico e o perfil de resposta do sensor biomimético nas condições otimizadas.

Pode ser observado na Figura 1A, a curva 1 corresponde ao voltamograma cíclico da solução do eletrólito suporte na ausência do analito. Na curva 2 temos a presença do ácido 2,4-dicloroacético(2,4-D) que sofre processo de redução eletroquímica, promovendo um aumento da corrente catódica em potencial -0,100 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}).

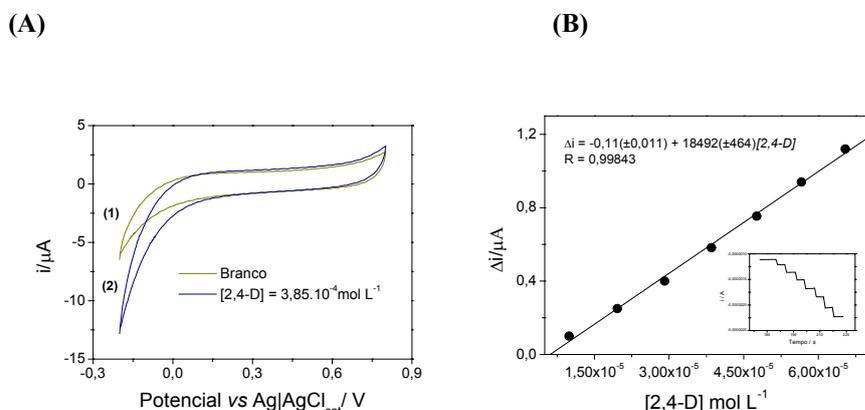


Figura 1: Voltamograma cíclico para caracterização eletroquímica do 2,4-D (A) e o perfil da curva analítica do 2,4-D e seu correspondente amperograma em (B). Medidas realizadas empregando solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6.0) e aplicando potencial de -100 mV vs Ag/AgCl(KCl_{sat})

A curva analítica da Figura 1B que se encontra nas condições otimizadas apresentou uma faixa linear de resposta para 2,4-D entre 9,9 e 65,4 μmol L⁻¹, com uma sensibilidade de 18492 (±461) μA L mol⁻¹ e limites de detecção e quantificação de 3,89.10⁻⁷ e 1,29.10⁻⁶ mol L⁻¹, respectivamente. O limite de detecção foi calculado a partir da relação 3S/N [3], onde S/N corresponde ao sinal/ruído da medida. Já o limite de quantificação foi calculado como sendo 3,3 vezes o limite de detecção ou 10S/N [3]. A Tabela 1 mostra as características analíticas obtidas com o sensor, cujos valores são similares com os outros métodos analíticos que se encontram reportados na literatura [4,5].

Tabela 1: Características analíticas obtidas pelo sensor na determinação de 2,4-D.

Parâmetro (unidade)	Resposta
Faixa Linear (μmol L ⁻¹)	9,9 – 65,4
Coefficiente de Correlação	0,9984 (n=7)
Limite de detecção (μmol L ⁻¹)	0,39
Limite de quantificação (μmol L ⁻¹)	1,29
Sensibilidade (μA Lmol ⁻¹)	18492 ± 461
Tempo de vida (uso contínuo)	14 dias consecutivos
Tempo de vida (armazenado a seco)	30 dias

Estudo da seletividade

Para avaliar a seletividade do sensor biomimético foram testados diversos agrotóxicos como ametrin, clorpirifós, metribuzin, carbandazin, carbofurano, diuron, hexazinona, terbutiuron e tricloro-2-piridinol. Observou-se que o sensor não apresentou resposta analítica para os agrotóxicos estudados, tanto na voltametria cíclica como na amperometria. Indicando o caráter altamente seletivo do sensor biomimético proposto na detecção e quantificação de 2,4-D.

CONCLUSÕES

O sensor proposto apresentou resultados satisfatórios em relação a sua sensibilidade, estabilidade e seletividade indicando, portanto que o complexo derivado de porfirina de ferro (III), possa estar se comportando como um catalisador biomimético da enzima P450 na detecção do 2,4-D.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a versatilidade e simplicidade apresentadas com o eletrodo de pasta de carbono modificado possibilita que este método se torne uma ferramenta real para análise de 2,4-D em diversas matrizes, sendo portanto uma alternativa mais econômica, quando comparada aos outros métodos analíticos já existentes.

AGRADECIMENTOS: CAPES, CNPq (470419/2009-1), FAPESP (2011/03008-7)

REFERÊNCIAS

- [1] TEIXEIRA M.C., DUQUE P. and SÁ-CORREIA, I., “Environmental genomics: mechanistic insights into toxicity of and resistance to the herbicide 2,4-D”, *Trends in Biotechnology* 25(8): 363-370, 2007.
- [2] SOTOMAYOR M. D. P. T., TANAKA A. A., FREIRE, R. S. and KUBOTA L.T. *Encyclopedia of sensors*. New York: American Scientific Publishers, pp. 195-210, 2006.
- [3] SKOOG D. A., HOLLER, F. J. and NIEMAN, T. A. “*Principles of instrumental analysis*”. 5th ed. New York: Saunders College, pp. 25-29, 1997.
- [4] POPOV S.A., CHUMICHKINA Yu.A., SHAPOVALOVA E. N., DMITRIENKO S. G. and ZOLOTOV Yu. A. “Preconcentration of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on Molecularly Imprinted Polymers and Its Subsequent Determination by High Performance Liquid Chromatography”, *Journal of Analytical Chemistry* 66(1): 6–10, 2011.
- [5] OZKAN D., KERMAN K., MERIC B., KARA P., DEMIRKAN H., POLVEREJAN M., PINNAVAIA T.J. and OZSOZ M. “Heterostructured Fluorohectorite Clay as an Electrochemical Sensor for the Detection of 2,4-Dichlorophenol and the Herbicide 2,4-D”, *Chemistry of Materials* 14(4): 1755-1761, 2002.

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO EM SENSOR BIOMIMÉTICO PARA DETERMINAÇÃO DO HERBICIDA 2,4-D

Ademar Wong^{1*}, Rosa Fireman Dutra² e Maria Del Pilar Taboada Sotomayor¹

¹Instituto de Química - Unesp, Araraquara - SP – Brasil; ²Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE - Brasil. ademar.wong@iq.unesp.br

RESUMO: O estudo das propriedades eletrônicas de nanotubos de carbono em sensores eletroquímicos para o monitoramento de analitos de interesse ambiental tem crescido nos últimos anos, com destaque para os sensores voltamétricos e amperométricos. Foi utilizado neste estudo um sensor biomimético para detecção e quantificação eletroquímica do ácido 2,4-diclorofenoxiacético(2,4-D) em várias proporções de grafite/nanotubo (m/m) em eletrodo de pasta de carbono. A partir dos resultados obtidos pode-se verificar a influência positiva do uso de nanotubos de carbono na resposta analítica do sensor biomimético.

Palavras-chave: pasta de carbono, nanotubos de carbono, sensores biomiméticos, amperometria.

INTRODUÇÃO

Nanotubos de carbono são nanoestruturas únicas com propriedades mecânicas e eletrônicas notáveis. Essas estruturas químicas foram identificadas pela primeira vez por Iijima em 1991, são altamente rígidas e resistentes a tensões mecânicas. Desempenham simultaneamente as funções de condutores, tanto de calor como de eletricidade. Após pouco mais de uma década de sua descoberta, os conhecimentos produzidos nesta área indicavam que os nanotubos poderiam ser utilizados em numerosas aplicações práticas como dispositivos emissores de elétrons, armazenagem de energia, nanosondas e sensores [1].

A utilização de nanotubos de carbono em sensores eletroquímicos para o monitoramento de analitos de interesse ambiental tem crescido nos últimos anos, com destaque para os sensores voltamétricos e amperométricos. Os sensores eletroquímicos constituem uma alternativa viável para o monitoramento de analitos de interesse sendo uma poderosa ferramenta para os químicos analíticos na resolução de seus problemas, especialmente por causa de algumas características vantajosas como a elevada sensibilidade das determinações, baixo custo e portabilidade. A versatilidade das técnicas eletroquímicas também merece destaque visto que é possível controlar as reações eletroquímicas modificando a interface eletrodo-solução e selecionando-se criteriosamente o potencial aplicado à célula eletroquímica. Todas essas características são adquiridas ao utilizar sensores biomiméticos que se baseiam em dispositivos mais estáveis e duradouros que os biossensores convencionais, que possuem como base materiais biológicos [2,3].

Para esse estudo será analisado o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que é um herbicida recomendado para pastagens, gramados e culturas gramíneas (arroz, cana-de-açúcar, milho, trigo, etc). No mercado brasileiro, é encontrado em diferentes formulações e marcas comerciais e cada formulação pode apresentar características físico-químicas diferentes, conferindo ao produto características diferenciais volatilidade, toxicidade e persistência no ambiente. Este herbicida apresenta uma toxicidade moderada para mamíferos, é absorvido pela pele, via digestiva e inalação determinando, agudamente, alterações da glicemia de forma transitória, simulando um quadro clínico de diabetes, além de alterações neuromusculares [4].

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Reagentes e Soluções

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a 25°C) obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Direct-0,3).

Foram utilizados no desenvolvimento do projeto o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (Sigma-Aldrich); nanotubo de carbono (NTC) (Drop-sens[®]); óleo mineral e grafite em pó provenientes da Sigma-Aldrich[®]; o KH_2PO_4 , o acetato de sódio e o hidróxido de sódio adquiridos da Synth[®].

Nanotubos de Carbono

Nanotubos de carbono (NTC) de parede múltipla adquiridos comercialmente da Drop-sense[®] foram imobilizados e utilizados tal como recebidos na preparação de eletrodos de pasta de carbono, usando várias proporções de grafite/nanotubo (m/m). Foi realizado também um estudo com nanotubos funcionalizados [5], pré-tratados com solução de sulfonitrila na razão (3:1). Para isto, a mistura foi submetida à agitação por um período de 12 horas. Os nanotubos funcionalizados foram lavados com água deionizada até a retirada de todo o ácido e a seguir levado a uma estufa a 70°C para retirada de carbono amorfo.

Os nanotubos não funcionalizados e funcionalizados foram adicionados separadamente na composição da pasta de carbono e os sinais analíticos avaliados a partir dos resultados obtidos.

Construção do sensor biomimético e análise eletroquímica

A preparação da pasta de carbono para determinação de 2,4-D foi realizada misturando complexo derivado de porfirina de ferro (III), tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7.0) e quantidades adequadas de nanotubo de carbono não funcionalizado e de pó de grafite, de tal forma a obter proporções m/m entre 9% e 50%. O material foi cuidadosamente homogeneizado com uma espátula de aço inox, e a seguir deixado secar ao ambiente. Sobre o material seco, adicionou-se agente aglutinante, óleo mineral (Nujol®) para a obtenção da pasta de carbono. Foram preparadas uma pasta sem nanotubo de carbono (0% em NTC) e uma pasta contendo 50% (m/m) de NTC funcionalizado, para efeitos de comparação.

A pasta de carbono modificada foi colocada na cavidade de um eletrodo composto de um tubo de vidro e um fio de platina incorporado nele, que está em contato com um disco de platina de 4 mm de diâmetro e colocado à profundidade de 1 mm de uma das extremidades do tubo, deixando uma cavidade própria para a incorporação da pasta no eletrodo.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um micro-potenciostato da Autolab®, usando uma célula eletroquímica convencional de 03 eletrodos, contendo um eletrodo de referência de Ag/AgCl(KCl_{sat}) comercial (Analion®), um fio de platina em forma de espiral como eletrodo auxiliar e o(s) eletrodo(s) de pasta de carbono modificada como eletrodo(s) de trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Perfil da resposta eletroquímica do 2,4-D

Foi inicialmente desenvolvido e posteriormente otimizado um sensor biomimético para determinação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Os parâmetros encontrados como ideais para análise foram o potencial de -0,100 V vs Ag/AgCl (KCl)_{sat}, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH 6.0. A Figura 1 mostra um estudo de resposta eletroquímica utilizando nanotubos de carbono não funcionalizados (A) e funcionalizados (B), obtidos a partir de amperogramas.

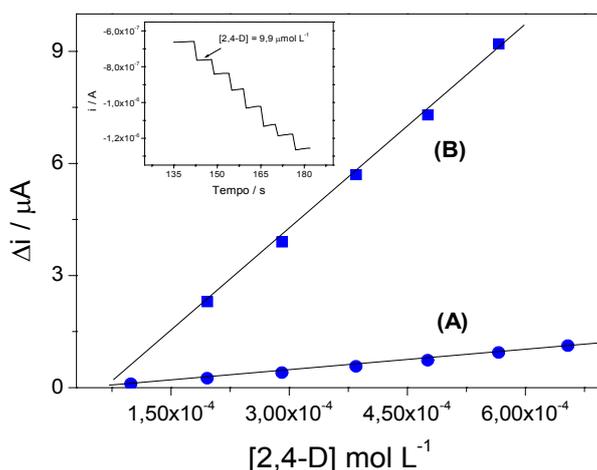


Figura 1: Perfil da curva analítica para detecção do herbicida 2,4-D utilizando eletrodo de pasta modificada com complexo derivado de porfirina de ferro (III) na ausência (A) e presença de nanotubos de carbono funcionalizados (B) em tampão fosfato pH 6.0 e potencial aplicado de -100mV.

Na figura 2 encontra-se ilustrado o efeito do uso de nanotubos de carbono no sensor biomimético. Verificou-se que com o aumento da percentagem de nanotubos na composição da pasta de carbono modificada, maior a sensibilidade do sistema para análise do 2,4-D. Em A1 mostra-se a sensibilidade obtida com a pasta de carbono modificada com complexo de porfirina de ferro (III). Entre A2 e A4, observa-se um aumento das sensibilidades em função da percentagem de NTC não funcionalizados na pasta de grafite. Verifica-se que em A5 a sensibilidade é praticamente a mesma que a obtida em A4, concluindo que o uso de nanotubos de carbono não funcionalizados, não oferece melhora da sensibilidade a partir desta proporção. Já em A6 onde a percentagem (m/m) de nanotubos na pasta é a mesma que para A5, observa-se que a sensibilidade é grandemente melhorada pelo pré-tratamento dos NTC, quando funcionalizados com solução de sulfonitrila (3:1).

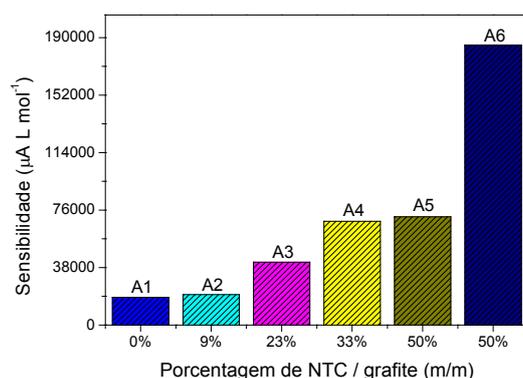


Figura 2: Estudo de resposta analítica para o sensor biomimético utilizando várias proporções grafite/nanotubo não-funcionalizado (m/m) (A1-A5), e nanotubo funcionalizado (A6).

Foram realizados testes de seletividade com diversos agrotóxicos como ametrin, clorpirifós, metribuzin, carbendazin, carbofurano, diuron, hexazinona, terbutiuron e tricloro-2-piridinol. Observou-se que o sensor não apresentou resposta analítica para os agrotóxicos estudados, tanto na voltametria cíclica como na amperometria.

Adicionalmente, estão sendo realizados estudos para avaliar possíveis interferentes e assim viabilizar o sensor proposto para aplicação em amostras ambientais.

CONCLUSÃO:

Neste estudo foi avaliada a contribuição de nanotubos de carbono na resposta analítica de um sensor biomimético para detecção e quantificação do herbicida 2,4-D. Os resultados obtidos mostraram que com o aumento da percentagem de nanotubos de carbono na proporção grafite/nanotubo (m/m), incorporada na pasta de carbono modificada, maior era a sensibilidade e, portanto maior detectabilidade, principalmente para os nanotubos de carbono funcionalizados, sendo aproximadamente de dez vezes em relação ao sensor à base de pasta de carbono.

AGRADECIMENTOS: CAPES e CNPq (470419/2009-1), FAPESP (2011/03008-7)

REFERÊNCIAS

- [1] IJIMA S. "Helical Microtubules of Graphitic Carbon.", *Nature*, pp. 354-356, 1991.
- [2] PEREIRA A.C., SANTOS A. S. and KUBOTA L.T. "Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas", *Química Nova* 25(6): 787-976, 2002.
- [3] SOTOMAYOR M. D. P. T. and KUBOTA L. T., "Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos", *Química Nova* 25(1): 123-128, 2002.
- [4] XIE C, GAO S., GUO Q. AND XU K., "Electrochemical sensor for 2,4-dichlorophenoxy acetic acid using molecularly imprinted polypyrrole membrane as recognition element", *Microchim Acta* 169(3-4): 145-152, 2010.
- [5] CHIANG Y-C., LIN W.-H., CHANG Y.-C., "The influence of treatment duration on multi-walled carbon nanotubes functionalized by H₂SO₄/HNO₃ oxidation", *Applied Surface Science* 257(6):2401-2410, 2010.

DETERMINAÇÃO DE ÍONS COBRE EM CACHAÇA UTILIZANDO ELETRODO CARBONO CERÂMICO AMINOFUNCIONALIZADO

Alzira Maria Serpa Lucho¹, Aline Evangelista Aguiar¹, Karina Lopes Dornelas¹, Fábio Luiz Pissetti¹, Ariadne Missoni Brondi¹, Andréia de Moraes², Camila Maroneze² e Yoshitaka Gushikem²

¹Instituto de Ciências Exatas - Unifal, Alfenas - MG – Brasil; ²Instituto de Química - Unicamp, Campinas - SP – Brasil; lucho@unifal-mg.edu.br

RESUMO: Foi preparado um eletrodo carbono cerâmico a partir da hidrólise e condensação do aminopropiltrimetoxisilano em meio ácido utilizando grafite. O eletrodo apresentou resultados que indicam a adsorção de íons Cu^{2+} no grupo amino presente na rede. Foi realizada a quantificação desse íon em uma amostra comercial de cachaça utilizando voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial. Os íons Cu^{2+} também foram determinados por absorção atômica em chama. Através das medidas eletroquímicas obteve-se $2,90 \text{ mg L}^{-1}$ e pela absorção atômica $2,48 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre na amostra de cachaça.

Palavras-chave: 3-aminopropil-trimetoxisilano, carbono cerâmico, íons cobre, cachaça

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse na preparação de diferentes tipos de eletrodos vem crescendo devido ao grande número de possíveis aplicações. Os com objetivo específico de fazer o sensoriamento de diferentes espécies estão entre os mais estudados [1,2]. Dentre estes, os preparados via processo sol-gel tem apresentado excelentes resultados, aliados ainda, a uma preparação simples e com um eficiente controle morfológico e estrutural [3,4].

Recentemente tem aumentado o interesse nos chamados eletrodos de carbono cerâmico (ECC), que são basicamente obtidos pela inserção de partículas de carbono grafite a matriz de sílica obtida pelo método sol-gel, atribuindo assim, condutividade elétrica ao material [5].

O cobre encontra-se extensamente distribuído na natureza sendo essencial ao organismo. Mas sua ingestão em altas concentrações pode provocar morte, com isso é crescente o interesse em técnicas que possibilitem o seu monitoramento. A legislação brasileira estabeleceu que a quantidade máxima de cobre na cachaça é de 5 mg L^{-1} [6,7].

Em geral, os métodos analíticos empregados para a determinação de cobre são: a análise de ativação de nêutrons (AAN), espectrometria de absorção atômica (EAA) e plasma acoplado a espectrometria de massa (ICP-MS). Estes são métodos caros e que exigem aparelhos sofisticados. Devido a isso as técnicas eletroquímicas têm atraído o interesse dos pesquisadores, devido ao seu baixo custo, boa sensibilidade, alta seletividade e fácil operação [8].

O objetivo do presente trabalho foi determinar íons cobre em amostra real de cachaça utilizando um eletrodo carbono cerâmico contendo partículas de grafite dispersas em uma rede de sílica com o grupo funcional amino.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O material foi sintetizado pela hidrólise e condensação do 3-aminopropiltrimetoxisilano na presença de partículas de grafite tendo o ácido clorídrico como catalisador. Adicionou-se 8,0 mL do alcóxidosilano, 2,0 g de carbono grafite, 20,0 mL de etanol, 0,60 mL de água destilada e 0,10 mL de ácido clorídrico concentrado a um balão e manteve-se a mistura sob refluxo durante 4h e 45min. Após esta etapa o solvente foi lentamente evaporado e o material foi lavado e seco. O material obtido foi denominado de SiN/Grafite e caracterizado por microscopia eletrônica de varredura. O eletrodo de trabalho, SiN/Grafite, foi preparado através da mistura mecânica de 20 mg do material e 5 mg de nujol. Esta mistura foi pressionada em um orifício na extremidade de um tubo de vidro, no qual o contato elétrico é promovido através de platina soldada a um fio de cobre. A técnica eletroquímica utilizada neste trabalho foi a voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial (VRAPD). A técnica de absorção atômica em chama foi usada como método de referência.

Para os estudos eletroquímicos foi utilizado um potenciostato e uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos. Como eletrodo de referência foi utilizado um eletrodo de calomelano saturado (ECS) e um fio de platina como contra-eletrodo. Como eletrólito suporte utilizou-se uma solução de KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Para a construção da curva analítica de Cu^{2+} utilizou-se uma solução de CuSO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com mistura de água/etanol 60:40 (v/v) e a amostra real analisada foi uma cachaça comercial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O material sintetizado apresenta superfície porosa característica do processo sol-gel, como mostrado na figura 1, abaixo.

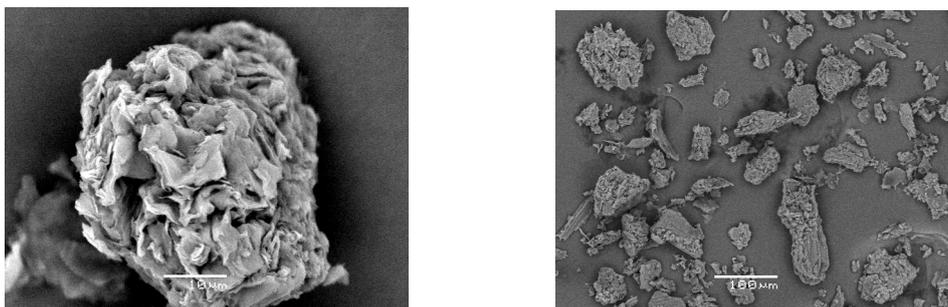


Figura 1. Imagens de MEV do material (SiN/Grafite).

Foram realizadas medidas para estabelecer os melhores parâmetros para as medidas de VRAPD. Os parâmetros são apresentados na tabela abaixo.

Tabela 1: Parâmetros utilizados durante a Voltametria de Redissolução Anódica de Pulso Diferencial.

Parâmetros	Valor ou comentário
Potencial de deposição / V	- 0,7
Tempo de deposição / s	120
Agitação durante a deposição	Em todas as deposições
Eletrólito suporte	KCl 0,10 mol L ⁻¹
Tempo de equilíbrio / s	5
Amplitude de pulso / mV	50
Velocidade de varredura / mV s ⁻¹	20
Intervalo de potencial / V	- 0,8 a 0,8
Tipo de varredura	Anódica

A figura 2 mostra os voltamogramas obtidos (a) na presença de apenas o eletrólito suporte, (b) após a adição de 25,0 mL de cachaça e (c) após adição de uma alíquota de solução de CuSO₄, resultando na célula uma concentração de 1,33x10⁻⁴ mol L⁻¹ de Cu²⁺. A figura 3 mostra a variação de corrente pico relacionada a adições consecutivas de 2,0 mL de cachaça.

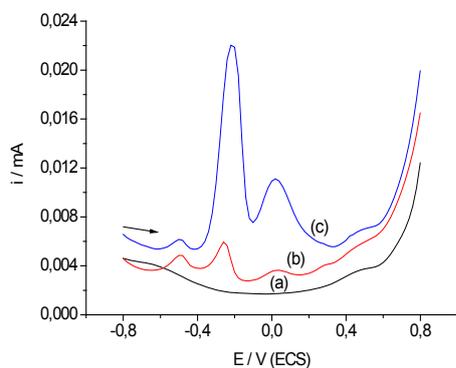


Figura 2: (a) VRAPD para o eletrodo SiN/Grafite em 0,10 mol L⁻¹ de KCl, (b) na presença de 25 mL de cachaça e (c) com adição de CuSO₄ na concentração de 1,33x10⁻⁴ mol L⁻¹.

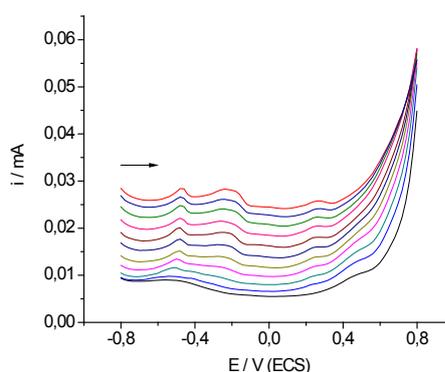
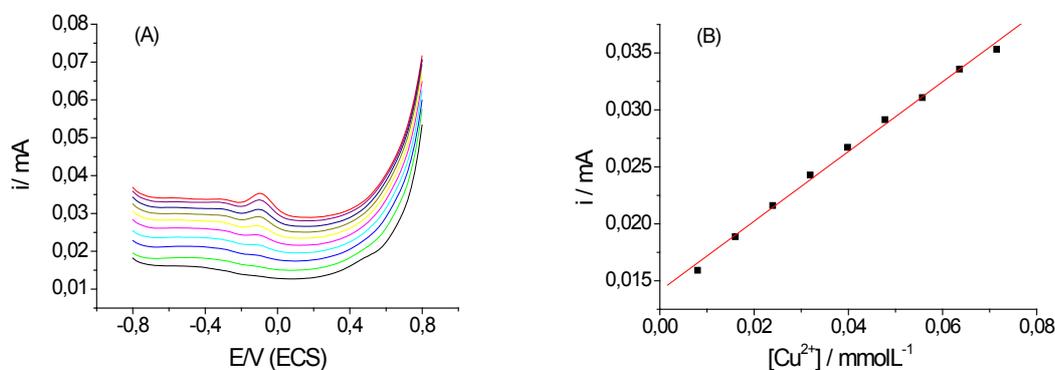


Figura 3: VRAPD para o eletrodo SiN/Grafite, com adição de alíquotas de cachaça, de 2,0 mL, ao eletrólito suporte KCl 0,1 mol L⁻¹.

Uma comparação entre os voltamogramas (a) e (b) mostrou a formação de três picos de corrente após a adição da amostra de cachaça a célula eletrolítica. Quando se adiciona uma alíquota de solução de CuSO₄ as correntes de pico em -0,26 V e 0,03 V aumentam. Estes dados mostraram que estes picos podem ser atribuídos ao processo de

oxidação dos íons cobre adsorvidos na superfície do eletrodo. Durante o tempo de deposição os íons Cu^{2+} da solução são complexados pelos grupos aminos e reduzidos. Com a posterior varredura de potencial estes são oxidados ($\text{Cu}^0 + 2e^- \leftrightarrow \text{Cu}^{2+}$). Na figura 3 observou-se que o perfil do voltamograma é diferente para pequenas quantidades de amostra e que ocorreu um aumento na corrente da dupla camada elétrica. Com o aumento da quantidade de Cu^{2+} observou-se um aumento linear nas correntes de picos da oxidação dos íons, em $-0,22$ V.

Para se obter uma curva analítica para os íons cobre foram feitas medidas da corrente de pico em função da adição de uma solução de CuSO_4 . Na figura 4 são apresentados (a) os voltamogramas e (b) a curva analítica.



Figuras 4: (a) Voltamogramas na presença de diferentes concentrações de Cu^{2+} e (b) a curva analítica obtida para o pico de corrente em $-0,10$ V.

A partir dos dados apresentados observou-se relação linear entre a concentração de Cu^{2+} e a corrente de pico em $-0,10$ V. A partir da equação da reta obtida, $y = 0,2792x + 1,4887E^{-5}$, foi calculada a concentração de cobre em cachaça obtendo-se um valor de $2,90 \text{ mg L}^{-1}$ de Cu^{2+} na amostra. A curva analítica da técnica de Absorção Atômica em chama foi obtida nas mesmas condições, num intervalo de $0,5$ a $6,5 \text{ mg L}^{-1}$. A partir da equação da reta, $y = 0,13516x + 0,04664$, a quantidade de cobre encontrada na amostra real de cachaça foi de $2,48 \text{ mg L}^{-1}$.

CONCLUSÕES

Os resultados eletroquímicos obtidos mostraram que o material apresenta uma boa condutividade, indicando que as partículas de grafite foram dispersas adequadamente durante o processo de condensação da rede de sílica. As quantidades de cobre determinadas na amostra real de cachaça pelas técnicas de VRAPD e por absorção atômica apresentaram uma boa concordância, mostrando o potencial do eletrodo para atuar como sensor eletroquímico para determinação de íons cobre em amostras de cachaça.

AGRADECIMENTOS: UNIFAL-MG, FAPEMIG, CAPES E CNPQ

REFERÊNCIAS

- [1] BUDNIKOV, G. K. et al. Chemically modified electrodes with amperometric response in enantioselective analysis. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 63, n. 1, p. 2-12, 2008.
- [2] RAHMAN, M. A. et al. Electrochemical sensors based on organic conjugated polymers. *Sensors*, v. 8, p. 118-141, 2008.
- [3] ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo Processo de Sol-Gel na construção de biossensores. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002.
- [4] HENCH, L. L.; WEST, J. K. The Sol-Gel Process. *Chemical Review*, v. 90, p. 33-72, 1990.
- [5] SKEIKA, T. et al. Eletrodos de carbono cerâmico: parâmetros de preparação, propriedades e aplicações como sensores eletroquímicos. *Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 30, n. 2, p. 125-136, 2009.
- [6] AZEVEDO, S. M. et al. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 27, n. 3, p. 618-624, 2003.
- [7] GARBIN, R.; BOGUSZ, S.; MONTANO, M. A. N.. *Ciência Rural*, v. 25, n. 006, p. 1436-1440
- [8] MARIAME, C.; RHAZI, M. E.; ADRAOUI, I. Determination of Traces of Copper by Anodic Stripping Voltammetry at a Rotating Carbon Paste Disk Electrode Modified with Poly(1,8-Diaminonaphtalene). *Journal of Analytical Chemistry*, v. 64, n. 6, p. 632-636, 2009.

BIOSSENSOR DE TERCEIRA GERAÇÃO BASEADO EM UM ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO E TIROSINASE

Bruno C. Janegitz, Roberta A. Medeiros, Romeu C. Rocha-Filho e Orlando Fatibello-Filho

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP

brunocj@ymail.com

RESUMO: O desenvolvimento de uma nova arquitetura de um biossensor utilizando-se a enzima tirosinase (Tyr) imobilizada em nanopartículas de ouro (AuNPs) sobre a superfície de um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) foi realizado. A transferência direta de elétrons deu-se a partir da enzima Tyr diretamente ligada às AuNPs. Voltamogramas cíclicos resultaram em um par de picos redox bem definidos, correspondente à transferência eletrônica direta de Tyr (par redox Cu(I)/Cu(II) presente no centro ativo da enzima), com o potencial formal de 0,442 V [vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)] em solução de tampão fosfato (pH 7,0). Parâmetros cinéticos como o coeficiente de transferência de elétrons (α) e a constante aparente de transferência de carga (k) foram avaliados. O biossensor desenvolvido foi utilizado com sucesso para a determinação de fenol e guaiacol em águas naturais por voltametria de onda quadrada.

Palavras-chave: Biossensor de terceira geração, tirosinase, eletrodo de diamante dopado com boro, nanopartículas de ouro

INTRODUÇÃO

As nanopartículas de ouro (AuNPs) apresentam propriedades eletrônicas, ópticas e químicas muito atraentes para várias aplicações tecnológicas nas áreas de nanoeletrônica, sensores, ótica e catálise. A eletrodeposição de nanopartículas metálicas é uma ótima metodologia para a modificação de eletrodos, pois a taxa de deposição pode ser facilmente controlada via o potencial de eletrodo ou a densidade de corrente. Para a eletrodeposição de nanopartículas com tamanho e forma controlada é importante ter conhecimento da cinética da reação e do correspondente mecanismo de electrocristalização. A eletrodeposição de nanopartículas metálicas pode ser realizada com sucesso em diversos tipos de materiais eletródicos. As AuNPs possuem atividade biocatalítica, sendo consideradas um material importante para a construção de biossensores, pois permitem a comunicação entre a enzima e o eletrodo; portanto, espera-se que o uso de AuNPs possa proporcionar uma melhora no desempenho de um eletrodo enzimático para a detecção de fenóis em baixas concentrações.

Fenóis são importantes poluentes ambientais mesmo em baixas concentrações. A contaminação de solo e água por fenóis é preocupante porque estes são compostos tóxicos que podem causar várias doenças, entre elas o câncer. Esses fenóis são extensamente usados na indústria madeireira, de tecidos e pesticidas. Muitos métodos têm sido propostos para a determinação de fenóis e pesticidas, entre eles, os métodos eletroanalíticos empregando biossensores baseados em tirosinase, que têm apresentado boa eficiência **para esse propósito**. Baixas concentrações de fenóis podem ser detectadas por meio do aumento da corrente quando houver transferência direta de elétrons; portanto, a construção de um biossensor é imprescindível para se obter uma resposta efetiva entre a superfície do eletrodo e a enzima.

Eletrodos à base de carbono modificados com nanopartículas de ouro têm sido extensivamente pesquisados como substratos para eletroanálise. Neste contexto, os eletrodos de diamante dopado com boro (BDD) apresentam propriedades bastante interessantes, como, por exemplo, corrente de fundo relativamente baixa, alta estabilidade eletroquímica e robustez química e mecânica.

Portanto, visando a determinação de fenol e guaiacol em amostras de águas naturais, neste trabalho é descrito o desenvolvimento de um biossensor utilizando tirosinase (Tyr) imobilizada em AuNPs eletrodepositadas sobre a superfície de um eletrodo de BDD.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Preparação do biossensor Tyr-AuNPs/BDD

Inicialmente, AuNPs foram eletrodepositadas sobre o eletrodo de BDD (filme depositado por CVD sobre p-Si) aplicando um potencial de -0,4 V por 40 s, sendo que estes dois parâmetros foram previamente otimizados por planejamento fatorial em 2 níveis. Então, o eletrodo de AuNPs/BDD foi modificado por imersão em uma solução aquosa de cistamina 10,0 mmol L⁻¹ por 2 h à temperatura ambiente. Posteriormente, o eletrodo foi exaustivamente lavado com solução de tampão fosfato (pH 7,0). Depois disso, o eletrodo de AuNPs/BDD foi imerso em glutaraldeído (GA) 2,5% (v/v) por 2 h e novamente lavado com tampão fosfato. Finalmente, o eletrodo foi imerso por 2 h em uma solução contendo 1,0 mL de uma solução de tampão fosfato com 0,10 mg de tirosinase 15 kU e, em seguida, cuidadosamente

lavado com solução de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0). Quando não utilizado, o biossensor Tyr-AuNPs/BDD foi armazenado em solução de tampão fosfato (pH 7,0) a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. As medidas eletroanalíticas foram executadas com um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT12 (Eco Chemie) gerenciado pelo programa computacional GPES 4.9. A determinação do pH das soluções foi realizada com um pHmetro digital ORION, modelo EA 940. Utilizou-se um sistema de três eletrodos: o biossensor como eletrodo de trabalho, uma placa de Pt como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) como referência, ao qual todos os potenciais aqui relatados estão referidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Biossensor Tyr-AuNPs/BDD

Na Figura 1 são mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos de BDD, AuNPs/BDD e Tyr-AuNPs/BDD em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Observou-se que não há diferença significativa no perfil voltamétrico apresentado pelos eletrodos de BDD (A) e AuNPs/BDD (B). Há apenas um pequeno aumento da resistividade para o eletrodo de AuNPs/BDD, indicando que não há problemas na transferência de elétrons entre as AuNPs e o eletrodo de BDD. O eletrodo de Tyr-AuNPs/BDD exibiu um perfil voltamétrico bem definido, com os picos catódico e anódico de mesma magnitude em 1 e 225 mV, respectivamente. Esses picos redox são atribuídos à reação redox do centro ativo (átomos de cobre) da enzima tirosinase, apresentando uma diferença entre os valores dos potenciais de pico anódico e catódico de $\Delta E_p = 224 \text{ mV}$ e um potencial formal redox de 112 mV. A presença da enzima Tyr no biossensor pode proporcionar a transferência de elétrons, a partir de um lado de seus tetrâmeros, possivelmente ligado a AuNPs/BDD, ocorrendo então a transferência direta de elétrons.

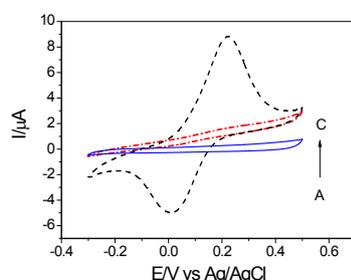


Fig. 1. Voltamogramas cíclicos ($\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$) para os eletrodos de BDD (A), AuNPs/BDD (B) e Tyr-AuNPs/BDD (C) em tampão de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

O estudo realizado empregando o biossensor Tyr-AuNPs/BDD em diferentes velocidades de varredura de potencial mostrou que a reação não é controlada por difusão, mas sim pela superfície, como esperado para sistemas com enzimas imobilizadas. As correntes de pico anódica e catódica são linearmente proporcionais à velocidade de varredura (de 20 a 400 mV s^{-1}) indicando que a reação do eletrodo ocorre na monocamada redox. A partir das equações de Laviron, pode-se obter informações como coeficiente de transferência e constante de transferência heterogênea para eletrodos com essas características. De acordo com os correspondentes processos anódico e catódico, o valor do coeficiente de transferência de elétrons (α) calculado foi de 0,45. Baseado em um gráfico ΔE_p vs. $\log \nu$, obteve-se um valor de $0,032 \text{ s}^{-1}$ para a constante aparente de transferência de carga (k), valor este próximo aos encontrados na literatura para biossensores de tirosinase com transferência direta de elétrons.

Determinação de fenol e guaiacol por voltametria de onda quadrada (SWV)

A tirosinase é uma enzima que, na presença de oxigênio, converte compostos fenólicos em quinonas correspondentes. Assim, as quinonas geradas podem ser reduzidas eletroquimicamente em potencial relativamente baixo. Portanto, a corrente de pico catódica obtida por SWV aumenta com a concentração de fenol ou guaiacol, como observado na Fig. 2. Isto confirma que o biossensor Tyr-AuNPs/BDD apresenta excelente capacidade catalisadora para realizar a redução de fenol e guaiacol.

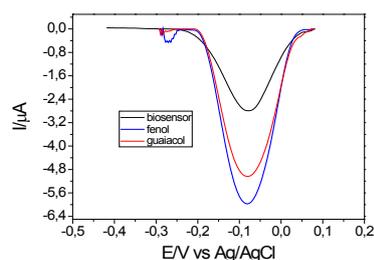


Fig. 2. Voltamogramas de onda quadrada do biossensor Tyr-AuNPs/BDD em tampão de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e na presença de fenol ou guaiacol $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

A otimização dos parâmetros experimentais da SWV foi realizada utilizando uma solução de fenol 1,0 mmol L⁻¹ em solução de tampão de fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). Posteriormente, a relação entre o aumento da intensidade da corrente do pico de redução e as concentrações de fenol e guaiacol foi examinada. O aumento da corrente de pico catódica é linearmente proporcional à concentração de fenol em um intervalo de concentração de 0,1 a 11,0 μmol L⁻¹, com uma equação correspondente a $I_p / \mu A = -0,014 + 1,7 [c / (\mu mol L^{-1})]$ e um coeficiente de correlação de 0,994. Para o guaiacol, a corrente de pico catódica também aumenta de forma proporcional à concentração no intervalo de 0,1 a 9,9 μmol L⁻¹, apresentado uma equação correspondente a $I_p / \mu A = -0,19 + 1,9 [c / (\mu mol L^{-1})]$ e um coeficiente de correlação de 0,993. O limite de detecção obtido a partir da relação sinal/ruído foi de 0,07 μmol L⁻¹, para fenol, e 0,09 μmol L⁻¹, para guaiacol. O biossensor apresentou um desvio padrão relativo (RSD) de 4,2 % para o fenol e 3,8 % para guaiacol, para cinco medidas sucessivas de fenol e guaiacol na concentração de 1,0 μmol L⁻¹. A estabilidade do biossensor foi investigada durante 30 dias através da sua resposta nas mesmas concentrações dos analitos nos estudos anteriores; assim, após um mês de ensaio, a resposta do biossensor diminuiu para 85 %, para o fenol, e 87 %, para guaiacol.

CONCLUSÕES

A eletrodeposição de AuNPs sobre eletrodo de BDD foi realizada com sucesso, aplicando-se potencial de eletrodo e tempo de deposição obtidos com o auxílio de um planejamento fatorial. A transferência direta de elétrons obtida no biossensor Tyr-AuNPs/BDD foi atribuída ao uso das AuNPs e BDD. O sensor apresentou um pico anódico e um pico catódico, relacionados ao centro eletroativo da Tyr (cobre): par redox Cu(II)/Cu(I). A enzima tirosinase foi efetivamente imobilizada sobre as AuNPs, resultando em um biossensor que exibe resposta rápida, alta sensibilidade e estabilidade para a detecção voltamétrica de compostos fenólicos. Os resultados obtidos permitem concluir que o eletrodo de BDD é um substrato que oferece diversas vantagens, como estabilidade química e eletroquímica, sendo um bom material para aplicação em biossensores. O uso de AuNPs eletrodepositadas sobre o eletrodo de BDD pode ser uma alternativa interessante para imobilizar outras biomoléculas (trabalhos futuros). Finalmente, cabe destacar que o biossensor Tyr-AuNPs/DDB foi aplicado para a determinação do teor de fenol e guaiacol em amostras de águas naturais, pelo método de adição padrão, e os resultados obtidos foram satisfatórios.

AGRADECIMENTOS: FAPESP, CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] L. Komsijska; G. Staikov. Electrocrystallization of Au nanoparticles on glassy carbon from HClO₄ solution containing [AuCl₄]⁻. *Electrochim. Acta* 54: 168-172, 2008.
- [2] J. Kochana; A. Gala; A. Parczewski; J. Adamski. Titania sol-gel-derived tyrosinase-based amperometric biosensor for determination of phenolic compounds in water samples. Examination of interference effects. *Anal. Bioanal. Chem.* 391: 1275-1281, 2008.
- [3] S. Szunerits; R. Boukherroub. Investigation of the electrocatalytic activity of boron-doped diamond electrodes modified with palladium or gold nanoparticles for oxygen reduction reaction in basic medium. *Comptes Rendus Chimie* 11: 1004-1009, 2008.
- [4] B.X. Ye; X.Y. Zhou. Direct electrochemical redox of tyrosinase at silver electrodes. *Talanta* 44: 831-836, 1997.
- [5] R.W. Murra, A.J. Bard. *Electroanalytical Chemistry*. MarcelDekker: New York, 1984.
- [6] E. Laviron. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *J. Electroanal. Chem.* 101: 19-28, 1979.

SEPARAÇÃO E DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DOPAMINA EM DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO À BASE DE PAPEL

Murilo Santhiago¹, Leandro Y. Shiroma¹, Wilney J. R. Santos¹, Angelo L. Gobbi², Lauro T. Kubota¹

¹ Instituto de Química - Unicamp, Campinas - SP - Brasil; ² Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, Campinas - SP – Brasil. msanthiago@iqm.unicamp.br

RESUMO: O presente trabalho descreve a construção de dispositivos microfluídicos à base de papel para separação e detecção eletroquímica de ácido ascórbico e dopamina visando análises simples, rápidas e com custo reduzido. Os canais de separação foram criados no papel através de um processo de impressão com cera para delimitar as regiões do dispositivo. Os eletrodos de ouro foram formados ao final dos canais através de um processo conhecido como sputtering. O sistema de detecção eletroquímico foi caracterizado eletroquimicamente e empregado na detecção dos analitos. As propriedades de separação da coluna de papel foram avaliadas através de injeções de 500 nL de uma solução contendo as espécies de interesse. Variáveis experimentais como tipo de papel, pH, composição do eluente, volume de amostra, tamanho e largura da coluna de papel foram avaliados e, nas condições de maior resposta, foi possível obter limites de detecção na ordem de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Palavras-chave: Detecção eletroquímica, microfabricação, papel, dispositivos simples, dopamina.

INTRODUÇÃO

Atualmente a Química Analítica tem concentrado inúmeros estudos visando o desenvolvimento de dispositivos de análise simples para as mais diversas aplicações. Parte dessa dedicação desde a década de 90 foi impulsionada pelo crescimento acentuado da venda de kits para análises de “point-of-care” (POC). Esse tipo de análise é usualmente descrita como auxiliar, próxima do paciente, remota e descentralizada, tornando possível realizar testes clínicos em salas de emergência, no escritório ou até mesmo em casa [1]. Assim, o ponto de partida para tornar esse tipo de análise atrativa é a escolha do material que servirá como plataforma de teste.

O papel é um material que apresenta inúmeras vantagens para a construção de dispositivos simples, como por exemplo: i) o papel é barato e fabricado praticamente em todo mundo a partir de fontes renováveis e recicláveis; ii) o papel tem sido utilizado por muitos anos com sucesso como filtro; iii) facilmente impresso, revestido ou impregnado com reagentes de interesse; iv) é biodegradável e facilmente queimado; v) a sua estrutura porosa possibilita separações cromatográficas e a construção de dispositivos microfluídicos de baixo custo [2].

Nos últimos três anos o papel tem se destacado como plataforma de trabalho para dispositivos microfluídicos. Dispositivos microfluídicos à base de papel são baratos, portáteis, de fácil manuseio e geram resultados rápidos, assim, esses dispositivos são uma ótima alternativa para análises de POC em comparação com dispositivos baseados em polímero ou vidro. As vantagens desses dispositivos despertaram o interesse de inúmeros pesquisadores na busca pelo acoplamento de novos sistemas de detecção para análises de POC em papel, como por exemplo, a detecção eletroquímica [3].

Em 2009, Dungchai et al. descreveram um sistema eletroquímico de detecção para dispositivos à base de papel utilizando eletrodos de carbono e prata construídos através do processo de silk-screen [3]. A detecção eletroquímica é uma alternativa promissora para dispositivos à base de papel devido a sua possibilidade de miniaturização, portabilidade, baixo custo e alta sensibilidade. Outra vantagem adicional da detecção eletroquímica é a simplicidade da instrumentação resultando em um baixo consumo de eletricidade para análises em campo.

Assim, o objetivo desse trabalho visa o desenvolvimento de um dispositivo microfluídico de separação à base de papel com detecção eletroquímica. Para ilustrar a aplicação do dispositivo foi realizada a separação de ácido ascórbico e dopamina em papel trocador catiônico e detecção com eletrodos de ouro depositados sobre o papel. A dopamina (DA) e o ácido ascórbico (AA) são compostos de grande importância biológica e neuroquímica e eles estão, na maioria das vezes, presentes juntos em sistemas biológicos. No entanto, ambas as espécies se oxidam em potenciais muito próximos em eletrodos convencionais dificultando a análise [4]. Dessa forma, fica evidente que a construção de um dispositivo microfluídico de baixo custo e com consumo de amostra reduzido é de suma importância para análises clínicas rápidas desses compostos.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente, canais de 50 mm de comprimento e com largura de 1 – 5 mm foram desenhados utilizando o programa CorelDRAW X5. Com o desenho estabelecido, folhas de papel Whatman No. 1 e trocador catiônico P81

foram colocadas em um impressora Xerox phaser que possui cera na formulação da tinta. Os canais foram impressos nas folhas e em seguida tratados termicamente a 110 °C por cerca de 2 minutos em uma chapa de aquecimento.

Após a construção dos canais, foi construída uma máscara em cobre com capacidade para três eletrodos. Para a construção do sistema de detecção eletroquímico a máscara em cobre foi posicionada sobre a superfície do papel de modo que os contatos fossem estabelecidos na porção hidrofóbica e os eletrodos na porção hidrofílica. Em seguida, um filme de ouro de aproximadamente 200 nm foi depositado sobre a superfície do papel através de um processo conhecido como sputtering utilizando uma pressão de base de 2×10^{-6} mbar e pressão de deposição de 4×10^{-3} mbar. A deposição do filme foi controlada em função do tempo por uma balança de quartzo.

As medidas eletroquímicas foram feitas em um potenciostato/galvanostato modelo PGSTAT 12 da Eco Chemie. O dispositivo microfluídico de separação contendo os três eletrodos em ouro foi utilizado para as medidas eletroquímicas, Figura 1(a). As soluções de dopamina e ácido ascórbico foram preparadas diariamente e todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 1(a) mostra uma foto destacando a região de detecção eletroquímica com os três eletrodos de ouro depositados sobre o papel, e também, as regiões hidrofóbicas que delimitam o caminho da amostra e do eluente pelo dispositivo. Após a construção dos eletrodos, a técnica de voltametria cíclica foi utilizada para fazer a caracterização eletroquímica dos eletrodos de ouro. Como pode ser observado na Fig. 1(b), os eletrodos de ouro apresentam um perfil eletroquímico similar aos eletrodos convencionais desse mesmo metal, onde em $\sim 0,1$ V vs. Au pode ser observado um pico de redução referente à redução do óxido de ouro formado na superfície. O pseudo eletrodo de referência apresenta um deslocamento catódico de potencial de 203 e 244 mV em relação aos eletrodos de calomelano saturado (ECS) e Ag/AgCl, respectivamente, Fig. 1(c). Posteriormente, foi avaliado o efeito da velocidade de varredura (v) na resposta eletroquímica dos eletrodos. Como pode ser observado na Fig. 1(d), as correntes de pico (I_p) para ambos os processos aumentaram em função do aumento de v . Gráficos de I_p vs. $v^{1/2}$ foram plotados e apresentaram um comportamento linear, indicando que o processo redox é controlado pela difusão das espécies eletroativas até a superfície do eletrodo de ouro. A partir dos coeficientes angulares dos gráficos de I_p vs. $v^{1/2}$ foram calculados os coeficientes de difusão da sonda redox. Os valores encontrados foram aproximadamente seis vezes menores quando comparados com resultados obtidos em sistemas eletroquímicos convencionais. A razão para essa diminuição pode ser atribuída devido à presença das fibras de celulose, dificultando a difusão das espécies até a superfície dos eletrodos.

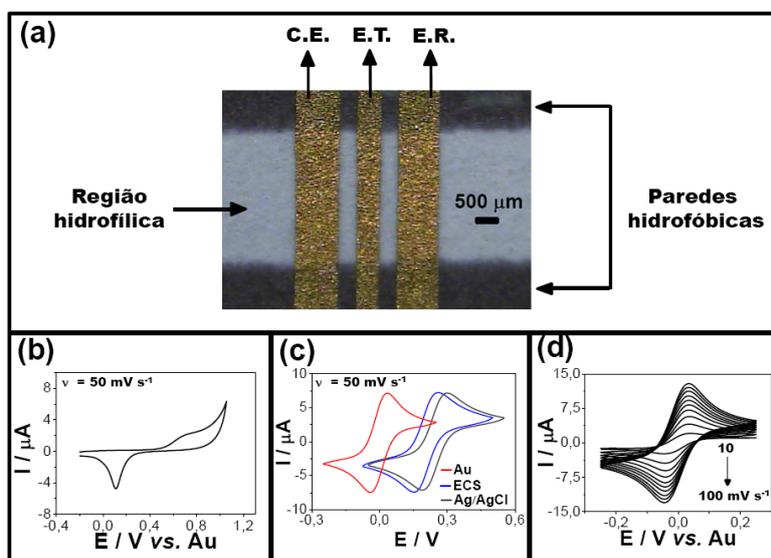


Figura 1: (a) Foto destacando o sistema de detecção eletroquímico com os três eletrodos, contra eletrodo (C.E.), eletrodo de trabalho (E.T.) e eletrodo de referência (E.R.). (b) Voltamograma cíclico em tampão NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 0,1 mol L⁻¹. Voltamogramas cíclicos em KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo Fe(CN)₆^{3-/4-} 5 mmol L⁻¹ para diferentes eletrodos de referência (c) e alterando a velocidade de varredura (d).

Após a caracterização eletroquímica dos eletrodos de ouro, foram feitos estudos para verificar propriedades de separação da coluna de papel. Assim, foram estudados os papéis n.º 1 e P81 da WHATMAN. Após injeções de uma mistura contendo 1 mmol L⁻¹ de dopamina e ácido ascórbico foi observado somente um pico cromatográfico utilizando o papel no. 1. Por outro lado, com o papel P81 pode ser observado um processo de separação em nível de linha de base para os analitos utilizando como eluente uma solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0 (Fig. 2(a)).

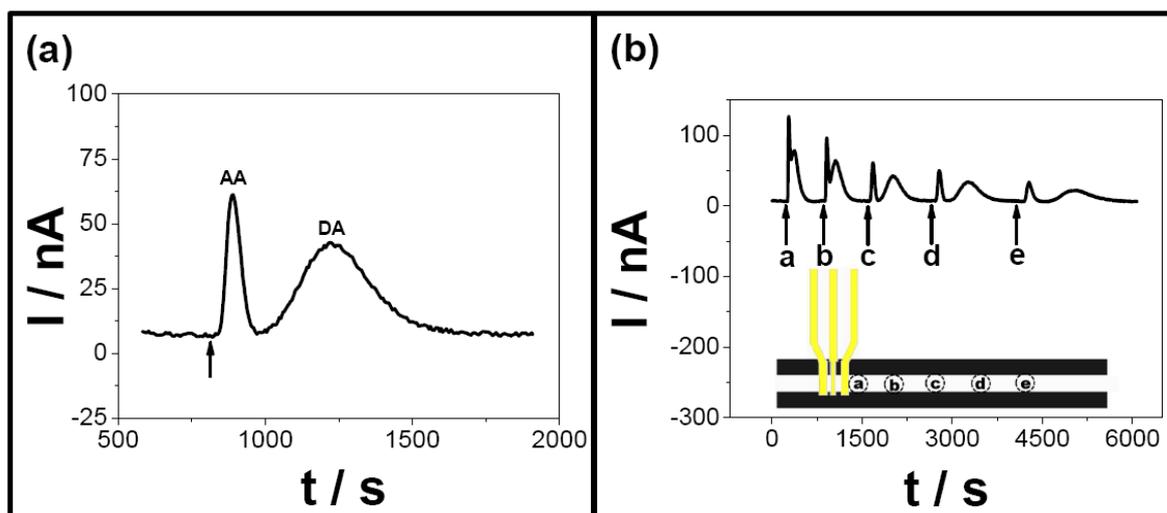


Figura 2: (a) Cromatograma em papel após injeção de 500 nL de uma solução contendo AA e DA a 12 mm do E.T. (b) Injeções de 500 nL de uma solução padrão contendo uma mistura DA e AA em diferentes distâncias em relação ao E.T., a) 3 mm, (b) 7 mm, (c) 12 mm, (d) 17 mm e (e) 22 mm. Condições: eluente tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. $E_{\text{ap}} = 0,4 \text{ V vs. Au}$. Papel WHATMAN P81 com largura do canal de 2,0 mm. Padrões: DA e AA 1 mmol L^{-1} cada. As setas indicam o tempo no qual foram feitas as injeções dos padrões.

O papel P81 apresenta grupos trocadores catiônicos derivados de ácidos fortes e fracos que interagem com a molécula de DA fazendo com que ela apresente um tempo de retenção maior do que o AA. O efeito desses grupos trocadores na separação pode ser facilmente visualizado nos cromatogramas ilustrados na Fig. 2(b). Injeções mais distantes do detector de uma solução contendo AA e DA favorecem o processo de separação. Buscando o menor tempo de análise e uma separação em nível de linha de base a distância de 12 mm foi selecionada. Além desses parâmetros, pH do eluente, volume de amostra e largura dos canais foram avaliados e as maiores respostas foram observadas em pH 5,0, 500 nL e 2 mm, respectivamente. As condições de maior resposta foram selecionadas e utilizadas na construção da curva analítica, a qual apresentou uma faixa linear de 0,05 até $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para ambos os analitos. Os limites de detecção ficaram na ordem de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. O coeficiente de variação ($n = 3$) para adições de AA e DA 1 mmol L^{-1} cada foi menor que 4,0 %.

O dispositivo proposto é uma ferramenta analítica simples, portátil e com baixo consumo de amostra, sendo assim, uma alternativa muito atraente para análises rápidas em locais de necessidade.

AGRADECIMENTOS: FAPESP, CAPES, CNPq, INCTBio.

REFERÊNCIAS

- [1] WARSINKE, A., "Point-of-care testing of proteins", *Anal. Bioanal. Chem.* 393: 1393–1405, 2009.
- [2] PELTON, R., "Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics", *Trends Anal. Chem.* 28(8):925–942, 2009.
- [3] DUNGCHAI, W., CHAILAPAKUL, O., HENRY, C.S., "Electrochemical detection for paper-based microfluidics", *Anal. Chem.* 81: 5821–5826, 2009.
- [4] ROBINSON, D.L., HERMANS, A., SEIPEL, A.T., WIGHTMAN, R.G., "Monitoring rapid chemical communication in the brain", *Chem. Rev.* 108: 2554–2584, 2008.

DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS BASEADA NO DESENVOLVIMENTO DE BIOCENSORES AMPEROMÉTRICOS EMPREGANDO MATERIAIS DE CARBONO NANOESTRUTURADOS

Mayara Brezolini Rocha¹, Arnaldo César Pereira¹

1 DCNAT/Universidade Federal de São João Del Rei, São João del Rei – MG.

mayarabr@hotmail.com

RESUMO: Neste trabalho, desenvolveu-se um biossensor para a detecção de compostos fenólicos baseado em diferentes materiais de carbono nanoestruturados, sendo esses, amostras de xerogeis modificadas com melamina e úreia, xerogel padrão sem modificação, nanotubo de carbono e grafite. Empregou-se como material biológico, a enzima peroxidase obtida a partir do extrato vegetal de abobrinha. A otimização do biossensor amperométrico (utilizando como matriz nanotubo de carbono) foi avaliada através de voltametria cíclica. Foram investigados a quantidade de enzima, pH, tampão e concentração de peróxido de hidrogênio sendo possível observar uma maior sensibilidade para o biossensor preparado na presença de 10 µL de extrato enzimático por mg de material, quando as medidas eletroquímicas eram realizadas em meio de solução tampão fosfato pH 6,5, contendo 10 µmolL⁻¹ de peróxido de hidrogênio. A utilização de fontes naturais para a extração de material biológico é bastante atrativa, tornando a análise extremamente vantajosa economicamente.

Palavras-chave: Biossensor amperométrico, nanotubo de carbono, compostos fenólicos, peroxidase.

INTRODUÇÃO

Atualmente devido aos graves e variados poluentes presentes no meio ambiente um crescente investimento em pesquisa na área de desenvolvimento de dispositivos para o monitoramento ambiental vem sendo observado. Ou seja, o desenvolvimento de metodologias de determinação e quantificação de diversas substâncias com rapidez, seletividade e sensibilidade é uma tendência da área de pesquisa em química ambiental. Todas estas características são encontradas nos biossensores, que apresentam possibilidade de detecção de substâncias em tempo real, preservando ao máximo as condições reais existentes na natureza. Além disso, possuem baixo custo de construção e estocagem, facilidade de automação com a construção de equipamentos simples e portáteis [1].

No que tange ao aspecto ambiental, sabe-se que os compostos fenólicos são amplamente distribuídos no meio ambiente, proveniente de processos industriais como, por exemplo, plásticos, tintas, fármacos, pesticidas, resinas, antioxidantes e, principalmente, papel e celulose, além disso, pertencem a uma classe de substâncias químicas característica com diferentes e importantes implicações em áreas distintas do conhecimento, com destaque para o campo da medicina e ambiental. Devido aos riscos para a saúde e para o meio ambiente causados pela exposição aos compostos fenólicos tóxicos, existe um consenso universal a respeito da necessidade de monitoramento contínuo destes contaminantes nos cursos de águas naturais e nos inúmeros efluentes industriais descarregados nestes recursos hídricos [2].

A determinação de compostos fenólicos é efetuada principalmente por meio de técnicas espectrofotométricas e cromatográficas [3]. No entanto, a versatilidade das técnicas eletroquímicas e os menores limites de detecção comumente obtidos em relação às espectrométricas, bem como seus baixos custos de aquisição quando comparados às técnicas cromatográficas fazem com que sejam amplamente aplicadas na determinação de compostos fenólicos. Assim, devido às suas características únicas, tais como: seletividade; relativo baixo custo de construção e estocagem; potencial para miniaturização; facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para uma análise rápida de monitoramento “on line”, os sensores eletroquímicos representam uma ferramenta promissora para complementar as técnicas existentes.

O objetivo deste trabalho foi a preparação de um biossensor usando como suporte diferentes materiais de carbono, e o extrato de abobrinha como fonte natural enzimática de peroxidase para a determinação da concentração de compostos fenólicos em amostras ambientais.

PARTE EXPERIMENTAL

I. Obtenção do extrato bruto

Após lavagem e secagem, 100,0 g de abobrinha (Cucurbita pepo) descascada são picados e homogeneizados em um liquidificador com 200 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ (pH 7), contendo 10,0 g de agente protetor (PVP: polivinilpirrolidona) por 5 minutos. Em seguida, o homogenato é filtrado em quatro camadas de gazes e centrifugado a

3450 r.p.m. durante 20 min. A solução sobrenadante é armazenada em refrigerador a 4°C e usada como fonte enzimática da peroxidase.

II. Caracterização da atividade enzimática

II.1 Extração das enzimas e medida da atividade

A atividade da enzima é determinada por meio de espectroscopia de UV/Visível medindo-se a variação de absorbância (470 nm) do tetraguaiacol (molécula sonda) formado na reação enzimática. O equipamento usado foi o espectrofotômetro Cary 50 da Varian. Nessa determinação são usados 0,2 mL da solução sobrenadante, 2,7 mL da solução de guaiacol 0,05 mol.L⁻¹ preparado em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7 e 0,1 mL da solução de peróxido de hidrogênio a 25°C. Uma unidade de atividade (UA) é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto nas condições mencionadas. Neste trabalho, os resultados da atividade do material bruto (abobrinha) obtidos foram apresentados em Unidades/mL.

II.2 Imobilização do extrato enzimático nas amostras de carbono – atividade da enzima no eletrodo de trabalho

Os biossensores preparados a base dos diferentes materiais carbonáceos (nanotubo de carbono, xerogéis e grafite) foram preparados homogeneizando 10,0 mg de cada material e 50 µL de extrato enzimático por 20 minutos. Depois adicionou 25 µL de nujol à mistura e homogeneizou por 15 minutos. A pasta obtida foi introduzida numa cavidade presente no eletrodo de trabalho.

Na avaliação da atividade da enzima imobilizada os eletrodos foram mergulhados numa cubeta com 2,5mL de solução de peróxido de hidrogênio na concentração de 4x10⁻³ mol/L e em intervalos de cinco minutos foram adicionados 100µL de solução de Hidroquinona na concentração 0,202 molL⁻¹, durante 30 minutos. Para o branco a medida de absorbância é realizada na ausência do material biológico imobilizado. Neste método mede-se o aumento da absorbância a 470nm da p-quinona formada pela reação da hidroquinona com o peróxido de hidrogênio catalisado pela peroxidase imobilizada no biossensor. As medidas foram feitas em duplicata e realizadas em um espectrofotômetro UV-visível (Cary 50 da Varian).

III. Preparação do eletrodo de trabalho (biossensor)

Os biossensores foram preparados homogeneizando 10,0 mg de nanotubo e 100 µL de extrato enzimático (6.809 unidades/mL/g) por 20 minutos. Depois adicionou 30 µL de nujol a mistura e homogeneizou por 15 minutos. A pasta obtida foi introduzida numa cavidade presente no eletrodo de trabalho.

As medidas eletroquímicas foram realizadas num potenciostato modelo PGSTAT302N com o emprego de uma célula eletroquímica de 3 eletrodos. O eletrodo Ag/AgCl foi empregado como referência, e uma espiral de platina como o eletrodo auxiliar.

IV. Otimização do biossensor

Para a otimização do biossensor foram realizados os seguintes estudos: Avaliação da sensibilidade do biossensor preparado com pasta de diferentes materiais de carbono; Efeito da concentração do extrato enzimático; Estudo da influência da concentração do peróxido de hidrogênio; Efeito do pH e Efeito da composição da solução tampão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 8 extratos enzimáticos a partir de fonte natural (abobrinha) em meio de tampão fosfato 0,1 molL⁻¹, na presença de agente protetor utilizado para separar compostos fenólicos naturais do extrato enzimático. Comparando os resultados apresentados na tabela 1, observou-se que o Extrato Enzimático 7 apresentou maior atividade. A diferença entre os valores de atividade enzimática apresentados deve-se ao fato de que as fontes naturais, apresentam origens distintas e foram obtidas em épocas diferentes.

Tabela 1: Atividade enzimática dos extratos brutos, obtidas por meio de medidas realizadas no espectrofotômetro UV-visível (Cary), utilizando o comprimento de onda de 470nm.

<i>Amostras</i>	<i>Atividade (unidades/mL)</i>
Extrato enzimático 1	553
Extrato enzimático 2	701
Extrato enzimático 3	540
Extrato enzimático 4	930
Extrato enzimático 5	1.668
Extrato enzimático 6	824
Extrato enzimático 8	2.044

A atividade enzimática do extrato imobilizado foi determinada de acordo com procedimento descrito no item II.2. Observou-se que a maior atividade enzimática foi obtida quando o extrato enzimático foi imobilizado sobre o nanotubo de carbono, e isso se deve à alta capacidade de adsorção apresentada por este material, por moléculas grandes como as enzimas.

Outro ponto importante no desenvolvimento de um biossensor é o conhecimento da melhor quantidade de material biológico a ser utilizada. Foram preparadas várias pastas de NTC com diferentes quantidades de extrato enzimático (μL de extrato por mg de pasta de NTC) no intervalo de 3 a 12 μL e a melhor sensibilidade foi obtida com 10 μL de extrato por mg de NTC. Acima desta concentração, provavelmente ocorre lixiviação do material biológico para a solução de trabalho, aliado à perda de estabilidade do biossensor desenvolvido.

Outros parâmetros estudados foram: influência da concentração de peróxido de hidrogênio, estudo de pH, e efeito tampão.

A Figura 1 apresenta os Voltamogramas Cíclicos obtidos nas condições operacionais previamente otimizadas. Para tal, empregou-se o biossensor proposto (preparado em matriz de Nanotubo de Carbono) em solução tampão fosfato 0.1 mol/L, pH 6,50, a qual continha soluções do analito (pirocatecol) no intervalo de concentração de $6,7 \times 10^{-7}$ a $6,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

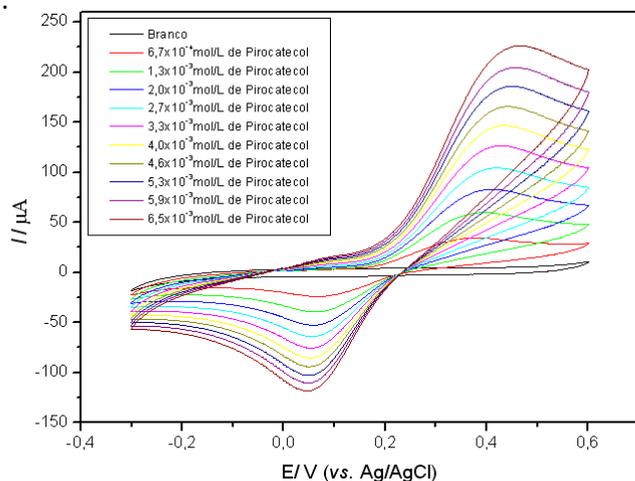


Figura 1: Voltamogramas cíclicos obtidos com o biossensor preparado com pasta de nanotubo de carbono, em solução tampão fosfato 0.1 mol/L, pH 6,50 contendo 10 μL do extrato enzimático. $\mu\text{E} = 0,1$ a $0,6$ V vs. Ag/AgCl com $\mu = 50$ mV s⁻¹.

O biossensor proposto apresentou uma sensibilidade excelente em um intervalo de resposta de 0,6 a 6,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a qual foi ajustada pela equação: Δj ($\mu\text{A cm}^{-2}$) = $-3,5 (\pm 0,9) + 31,9 (\pm 0,5)$ [pirocatecol] ($\mu\text{mol L}^{-1}$), $r=0.9993$ para $n=10$, limite de detecção em torno de $6,7 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e o limite de quantificação de $2,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Estes valores são superiores aos apresentados na literatura [1].

CONCLUSÃO

A atividade enzimática obtida a partir da fonte natural (abobrinha) apresentou baixa atividade e pouca estabilidade comparada com resultados prévio da literatura, porém este extrato ainda pode ser utilizado na imobilização sobre os diferentes materiais empregados.

Na otimização do eletrodo de trabalho utilizando como parâmetro de avaliação a sensibilidade obtida, os melhores resultados foram obtidos empregando nanotubo de carbono como matriz. A otimização dos parâmetros operacionais indicou que o melhor desempenho ocorreu quando o dispositivo era preparado com 10 μL do extrato enzimático por mg de NTC, além disso, o melhor eletrólito suporte foi a solução tampão fosfato pH 6,5, contendo 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio.

Estes estudos comprovaram que a matriz de nanotubo de carbono é um ótimo ambiente para imobilização de compostos biológicos, pois a sensibilidade e a estabilidade foram bem maiores quando comparadas com outras matrizes (grafite em pó e xerogéis de carbono). Isto justifica o emprego destes novos materiais nanoestruturados que além de boas matrizes de suportes são também ótimos transdutores com excelentes perspectivas no desenvolvimento da eletroanálise. Além disso, a utilização de fontes naturais para a extração de material biológico é bastante atrativa, uma vez que, esse procedimento pode tornar a análise extremamente vantajosa do ponto de vista econômico.

AGRADECIMENTOS: CNPq e FAPEMIG

REFERÊNCIAS

- [1] LOUZADA, E. S., LUCCAS, P.O., MAGALÃES, C. S.; *Revista Analytica* **11** (2004), 52-56.
- [2] STUART, EJE; PUMERA, M. J. *Phys. Chem. C* (2011) 115-130.
- [3] FIAMENGOS, Y.C., STALIKAS, C.D., PILIDIS, G.A., KARAYANNIS, M.I., *Anal. Chim. Acta* **403** (2000) 315-323.

MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS BINÁRIAS: UMA NOVA ESTRATÉGIA PARA AUMENTAR SENSIBILIDADE EM BIOCENSORES AMPEROMÉTRICOS

Cancino, J.^{1,2}, Razzino, C.¹, Zucolotto, V.² e Machado, S.A.S.¹

¹Instituto de Química de São Carlos, São Carlos - SP - Brasil; ²Instituto de Física de São Carlos, São Carlos - SP - Brasil, Universidade de São Paulo. jucancino@iqsc.usp.br

RESUMO: A proposta de um novo dispositivo bioeletroquímico enzimático eficiente, na qual a enzima acetilcolinesterase imobilizada sobre monocamada auto-organizada binária [self-assembled monolayers (SAM_{mix})] constituída dos alcanotióis ácido 11-mercaptopundecanóico (AMU) e 2-mercaptopetanol (C₂OH) em eletrodo de ouro foi avaliada. O desempenho dos eletrodos modificados frente à hidrólise da acetiltiocolina foi investigado via voltametria cíclica e medidas amperométricas, revelando um rápido aumento na corrente catódica com pico bem definido com a adição de acetiltiocolina na solução eletrolítica. O biossensor amperométrico desenvolvido com a plataforma binária de alcanotióis mostrou uma linearidade frente ao pesticida carbaril na região de concentração entre 0 a 1,75x10⁻⁶ mol L⁻¹. Os valores dos limites de detecção e quantificação foram de LD=3,45x10⁻¹⁰ mol L⁻¹ e LQ=1,15x10⁻⁹ mol L⁻¹, respectivamente. Utilizando a equação cinética e Michaelis-Menten calculou-se um K_M^{app} de 0,62x10⁻³ mol L⁻¹, indicando que a arquitetura empregada possui grande vantagem no desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos para aumentar/melhorar as propriedades catalíticas de enzimas.

Palavras-chave: Alcanotióis; Biossensor Amperométrico; Monocamadas Auto-Organizadas; Acetilcolinesterase.

INTRODUÇÃO

Com os avanços provenientes da nanociência e nanotecnologia em estudos para aplicação em medicina e áreas correlatas, mudanças ocorreram em diversas áreas da pesquisa, entre elas a eletroquímica. A fim de se adequar a essas mudanças, surge a subárea *bioeletroquímica*, que se preocupa em estudar processos de transferência de carga entre biomoléculas e transdutores. No entanto, o maior desafio é conseguir reproduzir efeitos biológicos de biomoléculas fora do seu ambiente natural, sem que afetem propriedades importantes como: sítios catalíticos, estrutura molecular e atividade enzimática [1].

Com o intuito de estabelecer uma nova arquitetura na construção de biossensores que pudesse contornar os problemas existentes ao uso de mediadores e reticulantes, foi utilizada uma nova plataforma a base de monocamadas binária de alcanotióis, as quais apresentaram bom desempenho ao transporte de cargas, ainda não aplicado à biossensores. As propriedades estruturais promovidas pela mistura de dois alcanotióis de diferentes tamanhos, faz com que a estrutura em formato de ilhas seja um condutor eficiente [2]. Nesse caso, os alcanotióis de cadeia carbônica curta agem como intermediários da transferência eletrônica entre a molécula da enzima e a superfície do eletrodo, enquanto o alcanotiol de cadeia carbônica longa age como suporte enzimático.

Para que a nova arquitetura pudesse ser aplicada, a escolha da enzima modelo foi realizada de acordo com suas propriedades físico-químicas [3]. Nesse caso, a enzima acetilcolinesterase (AChE) foi escolhida devido às suas características de carga já conhecidas da literatura; além de ser amplamente utilizada no desenvolvimento de biossensores amperométricos baseado no modelo de inibição da atividade da enzima para determinação de pesticidas [4]. Nesse trabalho, um arranjo de microeletrodos formados pela mistura binária de alcanotióis foi utilizado para aumentar a transferência eletrônica através dos alcanotióis de cadeia menor enquanto os alcanotióis de cadeia maior promoviam suporte para a estrutura enzimática AChE. As propriedades eletrônicas da enzima e do eletrodo modificado promoveram as interações necessárias. Devido à simplicidade e robustez inerente do sistema enzimático, a nova plataforma para biossensores foi aplicada nesse sistema, a fim de avaliar se era possível ou não essa nova abordagem na construção de biossensores sem o uso de mediadores e/ou reticulantes químicos.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os alcanotióis ácido 11-mercaptopundecanóico e 2-mercaptopetanol, a enzima acetilcolinesterase (E.C. 3.1.1.7, tipo VI-S, 425,94 U mg⁻¹) tipo *Electrophorus electricus* (enguia elétrica) e o substrato iodeto de acetiltiocolina (ATI) foram obtidos da Sigma-Aldrich. O pesticida Carbaril com 99% de pureza, da Bayer.

Após limpeza eletroquímica, os eletrodos eram imersos em solução etanólica 1.0x10⁻³ mol L⁻¹ do alcanotiol por 2 horas. A modificação da superfície de ouro com a SAM_{mix} foi conduzida pela imersão por 2 horas do eletrodo de ouro em solução etanólica contendo uma mistura dos alcanotióis nas concentrações 1x10⁻³ mol L⁻¹ 11-AMU e 1,2x10⁻⁴ mol L⁻¹ C₂OH. Após a formação das SAM, os eletrodos foram imersos em solução 1mg ml⁻¹ da enzima AChE deixando a

adsorção da enzima ocorrer por aproximadamente 12 horas. Em seguida, os eletrodos foram armazenados em solução tampão pH=6,5 antes da sua utilização.

O desempenho do biossensor foi avaliado pelo método de inibição frente ao pesticida carbaril. Para isso, diferentes concentrações do pesticida foram utilizadas na incubação do biossensor em uma cela de incubação. Uma solução estoque de carbaril em acetonitrila com concentração $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizada nas adições na cela de incubação de 10 mL em PBS pH 6,5. Os experimentos amperométricos foram conduzidos em cela eletroquímica contendo solução $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ATI preparado diretamente em 10mL de PBS pH 6.5. O biossensor Au/SAM_{mix}/AChE foi testado pela curva amperométrica i-t em potencial de 300 mV (versus Ag/AgCl/KCl). O limite de detecção foi determinado considerando a variação padrão de 10 medidas amperométricas da solução do branco (S_B) e a inclinação da curva analítica como $LD=3S_B/b$, de acordo com as normas da IUPAQ [5].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa nova abordagem um arranjo de microeletrodos formados pela mistura binária de alcanotióis foi utilizado para aumentar a transferência eletrônica através dos alcanotióis de cadeia menor enquanto os alcanotióis de cadeia maior promoviam suporte para a estrutura enzimática [4,11]. O método é baseado na combinação das cargas que os grupos da superfície do eletrodo e da estrutura enzimática possuem. O comportamento eletroquímico do novo transdutor para biossensor foi investigado por voltametria cíclica com os eletrodos de Au, Au/SAM_{mix} e Au/SAM_{mix}/AChE.

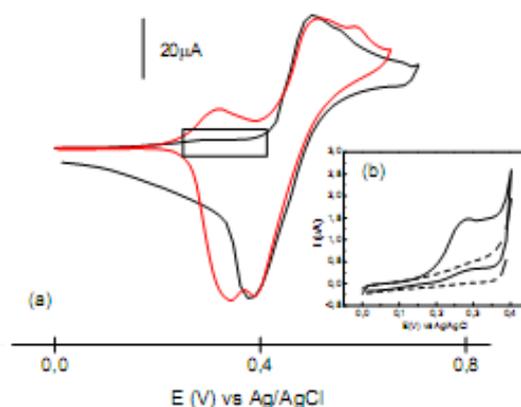


Figura 1. Voltamogramas cíclicos dos biossensores Au/SAM_{mix}/AChE e Au/C₂OH/AChE em ATI $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH=6,5. Inset (–) biossensor construído com monocamada de C₂OH e (---) biossensor com monocamada de AMU nas mesmas condições anteriores. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

A Figura 1 mostra a diferença no comportamento das três arquiteturas. O voltamograma vermelho mostra o pico de oxidação da tiocolina, hidrólise do produto da ATI, catalisada pela enzima AChE imobilizada sob Au/SAM_{mix}. A corrente de pico, $1,23 \times 10^{-5} \text{ A}$, é muito maior, cerca de 10 vezes, comparado aos biossensores construídos com um alcanotiol. Além disso, o potencial de oxidação para o biossensor Au/SAM_{mix}/AChE desloca negativamente comparado aos outros biossensores. Esse comportamento é relacionado à presença dos arranjos de microeletrodos que a mistura dos alcanotióis promove, esse resultado mostra uma plataforma condutiva para a transferência eletrônica, além de promover a reação em potencial mais baixo do que as estruturas simples. Comparando os valores de correntes do pico da oxidação da tiocolina quando a enzima é imobilizada em uma plataforma mista de alcanotióis, tem-se um valor de corrente de $1,23 \times 10^{-5} \text{ A}$, cerca de dez vezes maior que quando a AChE é imobilizado apenas em C₂OH, onde a corrente possui um valor de $1,46 \times 10^{-6} \text{ A}$. Esta diferença pode estar relacionada com a transferência de massa, por difusão esférica semi-infinita, característico de microeletrodos, assim como com a orientação da enzima quando adsorvida em um plataforma de alcanotióis de cadeia carbônica longa. Já para a superfície totalmente recoberta com alcanotióis de cadeia curta, normalmente a enzima fica pouco orientada devido à baixa compatibilidade geométrica com a monocamada. Esta característica é bem discutida na literatura.

Utilizando o método de Lineweaver-Burk foi possível calcular o K_M^{app} do biossensor. O valor encontrado de $K_M^{app} = 0,62 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para o biossensor Au/SAM_{mix}/AChE é relativamente baixo, comparado a $1,74 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ valor encontrado na literatura [6]. Isso implica que o eletrodo apresenta uma configuração ideal para que a enzima catalise eficientemente a hidrólise da ATI, isto é, a enzima está operando em alta capacidade catalítica. A imobilização da enzima AChE no eletrodo modificado pela mistura binária de alcanotióis exibiu uma excelente atividade eletrocatalítica para a oxidação da tiocolina sem adição de mediadores de elétrons. A resposta catalítica mostrou dependência linear para ATI entre as concentrações 0 a $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O valor da constante aparente de Michaelis-Menten calculada foi de $K_M^{app} = 0,62 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, mostrando uma alta afinidade.

Uma série de experimentos foi realizada envolvendo medidas da resposta do biossensor Au/SAM_{mix}/AChE antes e após incubação na solução do pesticida com diferentes concentrações. A relação entre a porcentagem de inibição, I%, e a concentração do pesticida com variação entre 0 a $1,75 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ é apresentada na Figura 2.

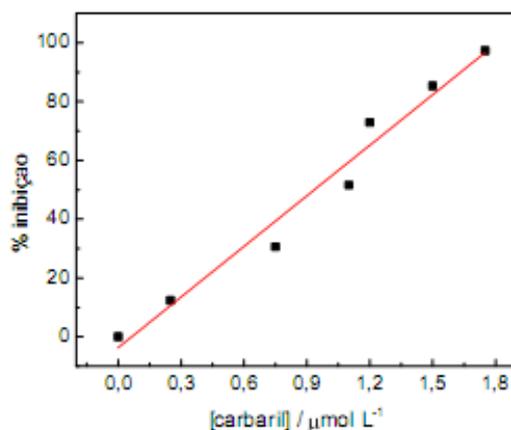


Figura 2. Curva analítica da inibição da AChE frente ao pesticida carbaril em concentrações de $0,25$ a $1,75 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em PBS pH = 6,5.

Observa-se que a concentração do pesticida e a inibição da resposta enzimática aumentam de maneira linear, com porcentagens de inibição variando de 12,4% a 97,3%. A curva linear correspondente é $y = 5,73 \cdot 10^7 x - 3,62$ com coeficiente de correlação de 0,9678. O limite de detecção foi determinado considerando a variação padrão de 10 medidas amperométricas da solução do branco (S_B) e a inclinação da curva analítica como $LD = 3S_B/b$, de acordo com as normas da IUPAQ [5]. O desvio padrão obtido da média aritmética das correntes de 10 brancos foi de $S_B = 6,59 \times 10^{-9}$ A. Os limites de detecção e quantificação calculados foram de $LD = 3,45 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ e $LQ = 1,15 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ ($b = 57,3 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$) respectivamente. Os valores encontrados para o biossensor Au/SAM_{mix}/AChE são menores comparado aos descritos na literatura, indicando que a nova arquitetura proposta neste trabalho é eficaz.

CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi utilizada uma estratégia simples para obter um transdutor eletroquímico eficaz para imobilização de enzimas, baseado em monocamadas auto-organizadas binárias produzidas a partir de dois alcanotióis em eletrodo de ouro. Para esse estudo a enzima acetilcolinesterase foi utilizada como enzima modelo. O desempenho do eletrodo com a nova arquitetura frente à hidrólise da ATI foi investigada via voltametria cíclica e medidas amperométricas, revelando um rápido aumento na corrente catódica com pico mais definido quando ATI foi adicionado à solução eletrolítica.

A hidrólise da tiocolina pode ser detectada a 310 mV (Ag/AgCl/KCl), em PBS pH 6,5, com um valor da constante de Michaelis-Menten aparente de $K_M^{\text{app}} = 0,62 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. O valor baixo da constante sugere que a arquitetura empregada nesse trabalho oferece um ambiente favorável para a enzima operar com alta atividade catalítica. Os valores de $LD = 3,45 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ e $LQ = 1,15 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ representam a alta sensibilidade que o transdutor oferece para a reação enzimática. Assim, a principal contribuição desse trabalho foi desenvolver uma nova plataforma nanoestruturada, tendo em vista o entendimento dos processos de transporte de carga em SAMs mistas e sistemas biológicos.

AGRADECIMENTOS: FAPESP e CAPES.

REFERÊNCIAS

- [1] Murphy, L. "Biosensors and Bioelectrochemistry". *Bioinorganic Chemistry*, 10: 177-184, 2002.
- [2] Cancino, J.C. "Eletrodos modificados com camadas auto-organizadas de alcanotióis: uma abordagem sobre a transferência eletrônica". Orientador: Sergio Antonio Spinola Machado. – São Carlos: 2008. 125p. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de concentração Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.
- [3] Silmana, I.; Sussman, J.L. "Acetylcholinesterase: How is structure related to function?" *Chemico-Biological Interactions*. 175: 3–10, 2008.
- [4] Razzino, C.A. "Desenvolvimento, caracterização e utilização de um nanobiossensor enzimático para a determinação de carbaril". Orientador: Sergio Antonio Spinola Machado. – São Carlos: 2007. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de concentração Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.
- [5] Long, G.L.; Winefordner, J.D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.*, 55, 712A-724A, 1983.
- [6] Sen, S.; Gülce, A.; Gülce, H. Polyvinylferrocenium modified Pt electrode for the design of amperometric choline and acetylcholine enzyme electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 1261–1268, 2004.

AVALIAÇÃO DO ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO MODIFICADO COM PbO_2 PELO MÉTODO SOL-GEL NA ANÁLISE DE CARBARIL

Milena Elias Teixeira, Ivana Cesarino, Sergio A.S. Machado

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos – SP – Brasil.

miteix@iqsc.usp.br

RESUMO: Eletrodos de diamante dopado com boro (DDB) modificado diretamente pelo método Sol-gel com óxido metálico, especificamente com PbO_2 , foi desenvolvido para análise de carbaril, utilizando voltametria de onda quadrada. A caracterização eletroquímica mostrou que o eletrodo DDB foi modificado com PbO_2 e que o pré-tratamento favoreceu a adsorção de espécies envolvidas na reação de desprendimento de oxigênio. O limite de detecção para o eletrodo PbO_2 /DDB na análise de carbaril foi aproximadamente duas vezes menor que o encontrado para o eletrodo DDB sem modificação, demonstrando que a presença de óxido de chumbo na superfície do eletrodo DDB apresentou vantagens no sinal analítico do carbaril.

Palavras-chave: Diamante Dopado com Boro, PbO_2 , Sol-gel, Carbaril.

INTRODUÇÃO

Os filmes de diamante dopado com boro (DDB) têm sido largamente utilizados como material eletródico em estudos eletroanalíticos [1-3], uma vez que possuem uma extraordinária estabilidade química, baixas correntes capacitivas em um extenso intervalo de potencial e boa reprodutibilidade dos resultados, se devidamente pré- tratados [4,5]. Aproveitando-se dessas qualidades, vários autores utilizam eletrodos DDB para estudar a oxidação ou combustão eletroquímica de compostos orgânicos especialmente para o tratamento de águas residuais [6,7].

O método Sol-gel permite a síntese de uma ampla gama de composições e propriedades que podem ser facilmente obtidas variando os precursores, os parâmetros de deposição e as condições do tratamento térmico de densificação (temperatura, tempo e atmosfera) [8]. Outra vantagem do método Sol-gel é a possibilidade de produzir óxidos metálicos multicomponentes bastante homogêneos com uma elevada pureza e a facilidade do controle da estequiometria [9], que são difíceis de serem preparados por outras técnicas. O método Sol-gel tem sido utilizado no nosso grupo de pesquisa com o intuito de produzir recobrimentos contra a corrosão [9] e de materiais eletrocatalíticos para as reações de decomposição da água [10]. A possibilidade de utilização de alkóxidos como precursores e densificados em atmosfera isenta de oxigênio foi reportada inicialmente pelo nosso grupo [11] e os depósitos assim formados mostram excelente qualidade e pureza, já que estes alkóxidos contêm quantidades suficientes de oxigênio para a formação de óxidos metálicos. Essa metodologia permite a deposição de óxidos metálicos pelo método Sol-gel em substâncias que são reativas com o oxigênio.

O carbaril (1-naftil N-metilcarbamato) é um inseticida usado para o controle de pragas em várias culturas como abacaxi, algodão, maçã, tomate, entre outras, além do uso como moluscicida e acaricida. A exposição dos humanos a este composto pode causar a inibição da enzima colinesterase, originando problemas neurológicos. Diante da necessidade do monitoramento de resíduos deste composto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [12] estabeleceu os limites máximos de resíduos (LMRs) permitidos para o carbaril em diferentes culturas agrícolas.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento eletroquímico do carbaril sobre o eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) modificado diretamente pelo método Sol-gel com PbO_2 e desenvolver uma metodologia, utilizando voltametria de onda quadrada (SWV), para sua futura aplicação em alimentos.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Instrumentação e métodos.

Experimentos de voltametria cíclica (CV) e voltametria de onda quadrada (SWV) foram realizados utilizando um sistema eletroquímico modelo VoltaLab PGZ402 Radiometer e PGSTAT30 Autolab, respectivamente. A célula eletroquímica foi montada com um sistema convencional de três eletrodos: eletrodo DDB não-modificado e modificado com PbO_2 como eletrodo de trabalho, um $Ag/AgCl/KCl$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrodo de referência e uma placa de Pt como eletrodo auxiliar. Todos os experimentos foram realizados à temperatura controlada ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). Os experimentos de SWV foram realizados com frequência de 10 Hz, amplitude de pulso de 100 mV, incremento de potencial de 2 mV, ao longo de um intervalo relevante potencial, em solução tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) e os experimentos de CV foram realizados em solução H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 10 mVs^{-1} .

Produtos químicos e soluções.

Todas as soluções foram preparadas com água purificada em sistema Milli-Q Millipore (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). As soluções Sol-gel foram preparadas com acetilacetato de Pb(II) em uma mistura de etanol + ácido acético (3:2, v/v). A concentração final dessa solução foi de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Solução Nafion® 5% em uma mistura de álcoois alifáticos inferiores e água foi utilizada para o revestimento dos depósitos.

Preparação dos eletrodos de trabalho.

Placas de DDB foram preparadas pelo Centro de Suisse Electronique et de Microtechnique SA (CSEM), Suíça, utilizando a técnica *deposição de vapor químico* assistido por *filamento* quente (HF-CVD) com a temperatura do filamento no intervalo $2440\text{-}2560 \text{ }^\circ\text{C}$ e uma mistura gasosa contendo metano, H_2 e trimetil-boro. O teor de boro final foi da ordem de 8000 ppm. As placas de DDB foram utilizadas como eletrodo de trabalho e como substrato para a modificação de superfície realizada pelo método Sol-gel. Um pré-tratamento térmico em $400 \text{ }^\circ\text{C}$ foi aplicado por 30 min na placa de DDB antes do revestimento. A solução de acetilacetato de Pb(II) foi transferida para a superfície do diamante por pincelamento, utilizando-se um pincel Tigre nº 1. Após cada pincelada, o eletrodo era colocado em uma mufla a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ pelo tempo de 5 min para secagem. Este procedimento foi repetido por cinco vezes para preparação do eletrodo PbO_2/DDB . Finalmente, o eletrodo foi densificado pelo tempo de 1 h em mufla sob temperatura de $400 \text{ }^\circ\text{C}$ e em atmosfera de Argônio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização eletroquímica do eletrodo PbO_2/DDB foi realizada em solução H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e comparada com o eletrodo DDB sem modificação, como apresentado na Figura 1. O efeito do pré-tratamento anódico ($3,0 \text{ V}$, 30 min) seguido do pré-tratamento catódico ($-3,0 \text{ V}$, 30 min) para ambos os eletrodos também foi realizado. Observa-se que o pré-tratamento para os dois eletrodos DDB favorece a adsorção de espécies envolvidas na reação de desprendimento de oxigênio, que acontece a potenciais menos positivos. O eletrodo de DDB não-modificado (Figura 1A) não apresentou nenhum processo redox no voltamograma cíclico. Entretanto, quando o eletrodo DDB é modificado com óxido de chumbo (Figura 1B) observa-se um incremento nas correntes capacitivas e processos redox do PbO_2 . Além disso, a mudança do potencial associado à reação de desprendimento de oxigênio, para valores menos positivos é certamente devido à presença do Pb na superfície do DDB.

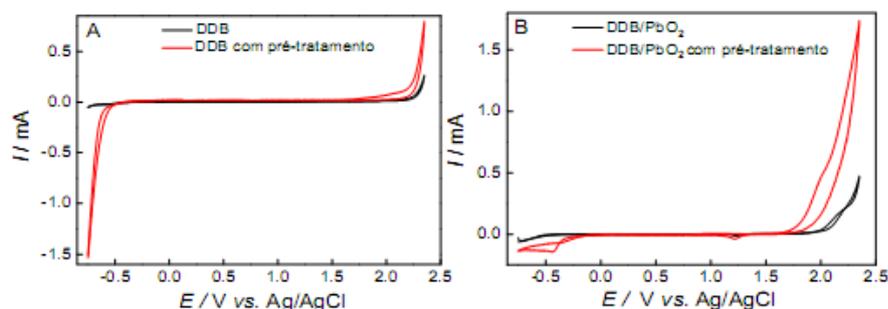


Figura 1. Voltamogramas cíclicos em solução H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para: **A)** eletrodo DDB e **B)** eletrodo PbO_2/DDB com (—) e sem (—) efeito do pré-tratamento por 30 min nos potenciais de $+3,0$ e $-3,0 \text{ V}$.

Parâmetros que afetam a corrente de pico voltamétrica foram otimizados em solução tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0 utilizando SWV, e os melhores resultados foram obtidos com os seguintes parâmetros: frequência de 10 Hz, amplitude de pulso de 100 mV, incremento de potencial de 2 mV, potencial e tempo de pré-tratamento $-1,1 \text{ V}$ por 10 s. Após, curvas analíticas para carbaril foram realizadas para ambos os eletrodos e são apresentadas na Figura 2. O eletrodo DDB não-modificado (Figura 2A) apresentou uma região linear no intervalo de $5,0\text{-}34,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de acordo com a equação: $I_{\text{pa}} (\mu\text{A}) = 10,9 (\mu\text{A}) + 1,3 (\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}) [\text{carbaril}]$, com $r = 0,996$ e limite de detecção de $2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Já para o eletrodo PbO_2/DDB (Figura 2B), a corrente de pico anódico foi linearmente proporcional à concentração de carbaril na região de $5,0\text{-}29,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $0,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. A equação de regressão linear é: $I_{\text{pa}} (\mu\text{A}) = 15,1 (\mu\text{A}) + 3,3 (\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}) [\text{carbaril}]$, $r = 0,998$. O limite de detecção para o eletrodo PbO_2/DDB foi aproximadamente duas vezes menor que o encontrado para o eletrodo DDB sem modificação, demonstrando que a presença de PbO_2 na superfície do eletrodo DDB apresentou vantagens no sinal analítico do carbaril. Além disso, esse limite de detecção é baixo o suficiente em relação ao limite máximo de resíduo permitido pela ANVISA para determinar carbaril em culturas como abacaxi, banana, feijão, maçã e repolho.

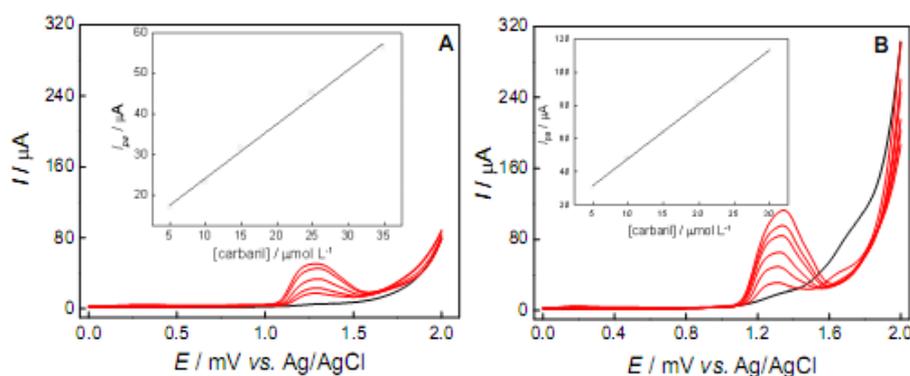


Figura 2. Curvas analíticas para o pesticida carbaril obtidas por SWV para: **A)** Eletrodo DDB e **B)** Eletrodo PbO₂/DDB. No detalhe: dependência linear das concentrações de carbaril com as correntes de pico anódico.

CONCLUSÕES

A caracterização eletroquímica mostrou que o eletrodo DDB foi modificado com PbO₂ e que o pré-tratamento favoreceu a adsorção de espécies envolvidas na reação de desprendimento de oxigênio. O eletrodo PbO₂/DDB apresentou maior sensibilidade para análise de carbaril quando comparado com o eletrodo DDB sem modificação, mostrando-se promissor para análise desse pesticida em amostras de alimento.

AGRADECIMENTOS: CNPq e fapesp Processo no 2010/11567-3.

REFERÊNCIAS

- [1] MANIVANNAN A., SEEHRA M.S. and FUJISHIMA A., "Detection of mercury at the ppb level in solution using boron-doped diamond electrode", *Fuel Process. Technol.* 85: 513–519, 2004.
- [2] CODOGNOTO L., MACHADO S.A.S. and AVACA L.A., "Square wave voltammetry on boron-doped diamond electrodes for analytical determinations", *Diam. Relat. Mat.* 11: 1670–1675, 2002.
- [3] MUNA G.W., TASHEVA N. and SWAIN G., "Electro-oxidation and Amperometric Detection of Chlorinated Phenols at Boron-Doped Diamond Electrodes: A Comparison of Microcrystalline and Nanocrystalline Thin Films", *Environ. Sci. Technol.* 38: 3674–3682, 2004.
- [4] SUFFREDINI H.B., PEDROSA V., CODOGNOTO L., MACHADO S.A.S., ROCHA-FILHO R.C. and AVACA L.A., "Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment", *Electrochim. Acta* 49: 4021–4026, 2004.
- [5] SALAZAR-BANDA G.R., ANDRADE L.S., NASCENTE P.A.P., PIZANNI P.S., ROCHA-FILHO R.C. and AVACA L.A., "On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments", *Electrochim. Acta* 51: 4612–4619, 2006.
- [6] BELLAGAMBAR., MICHAUD P.A., COMNINELLIS C. and VATISTAS N., "Electro-combustion of polyacrylates with boron-doped diamond anodes", *Electrochem. Comm.* 4: 171–176, 2002.
- [7] CODOGNOTO L., MACHADO S.A.S. and AVACA L.A., "Selective oxidation of pentachlorophenol on diamond electrodes", *J. Appl. Electrochem.* 33: 951–957, 2003.
- [8] GALLARDO J., DURAN A., GARCIA I., GELIS J.P., ARENAS M.A. and CONDE A., "Effect of Sintering Temperature on the Corrosion and Wear Behavior of Protective SiO₂-Based Sol-Gel Coatings", *J. Sol-Gel Science and Technology* 27: 175–183, 2003.
- [9] ATIK M., LIMA-NETO P., AVACA L.A. and AEGERTER M.A., "Sol-Gel Thin Films for Corrosion Protection", *Ceramics International* 21: 403–406, 1995.
- [10] MATTOS-COSTA F.I., LIMA-NETO P., MACHADO S.A.S. and AVACA L.A., "Characterisation of surfaces modified by sol-gel derived Ru_xIr_{1-x}O₂ coatings for oxygen evolution in acid medium", *Electrochimica Acta*, 44: 1515–1523, 1998.
- [11] PERDOMO F.L., LIMA-NETO P., AEGERTER M.A., AVACA L.A., "Sol-Gel Deposition of ZrO₂ Films in Air and in Oxygen-Free Atmospheres for Chemical Protection of 304 Stainless Steel: A Comparative Corrosion Study", *J. Sol-Gel Science and Technology* 15: 87–91, 1999.
- [12] ANVISA, Internet site adress: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B14094-1-0%5D.PDF> acessado em 02/04/2011.

EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS DE RUTÊNIO NA MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS IMPRESSOS PARA A DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA

Viviane Gomes Bonifacio¹, Eduardo H. Bindewald², Eduardo C. Neiva², Aldo J. G. Zarbin², Márcio F. Bergamini², Luiz H. Marcolino-Junior² e Orlando-Fatibello-Filho¹.

1 - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos – SP

2 – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-PR

gomesbonifacio@yahoo.com.br

RESUMO: No presente trabalho são apresentados os principais resultados obtidos para eletrodos impressos a base de carbono, modificados com nanopartículas de rutênio com tamanho médio de 4,1 nm e estrutura hexagonal, obtidas a partir de uma modificação no método poliol. O eletrodo proposto foi avaliado para a quantificação de dopamina, os resultados obtidos apresentaram uma magnitude de corrente de pico anódica foi cerca de 150 vezes maior para eletrodos modificados em comparação a eletrodos de mesma área geométrica não modificados, sugerindo um ganho significativo de área ativa. Depois de avaliadas as melhores condições, uma curva analítica linear no intervalo de concentração de dopamina $3,98 \times 10^{-4}$ a $3,10 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $3,98 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ foi obtida. **Palavras-chave:** nanopartículas de rutênio, dopamina, sensores eletroquímicos.

INTRODUÇÃO

O emprego de nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos tem levado ao desenvolvimento de metodologias para a quantificação de diversas espécies. Em geral, o uso de materiais nanoestruturados na modificação de eletrodos está ligado ao ganho em alguns processos tais como o aumento na velocidade do transporte de massa e a maior área ativa do eletrodo, quando em comparação com os materiais convencionais [1].

Em relação à construção destes sensores, os métodos de modificação de eletrodos com nanopartículas metálicas (NPs) descritos na literatura geralmente envolvem a eletrodeposição de um íon metálico, o que não garante o controle de tamanho e forma das partículas obtidas. Dessa forma, apesar de requerer um maior tempo no processo de síntese, a rota química de obtenção de NPs garante que as propriedades da escala nanométrica sejam preservadas.

O Rutênio tem recebido grande atenção nos últimos anos devido à sua grande aplicabilidade na construção de sensores eletroquímicos em substituição aos eletrodos a base de carbono, com o intuito de melhorar tanto a seletividade como a sensibilidade nos procedimentos.

A dopamina é um neurotransmissor central, precursor metabólico da noradrenalina e da adrenalina, que atua em receptores específicos, presentes no sistema nervoso central, nos vasos mesentéricos, renais e nas coronárias. É utilizada para o tratamento de diversos tipos de choque e da hipotensão grave após infarto agudo do miocárdio, dilatando os vasos sanguíneos renais e aumentando dessa forma o fluxo de sangue [2].

Desta forma, no presente trabalho descreve-se o comportamento eletroquímico de um eletrodo impresso a base de carbono, modificado com nanopartículas de rutênio, para a determinação voltamétrica de dopamina. Os principais parâmetros referentes à resposta eletroquímica do eletrodo modificado foram avaliados a fim de se obter os melhores resultados em termos de sensibilidade e seletividade.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As nanopartículas de rutênio (RuNPs) utilizadas neste trabalho foram sintetizadas pelo Grupo de Química de Materiais (GQM) da UFPR, a partir de uma modificação no método poliol [3]. Uma massa de 1,0 mg de nanopartículas foi dispersa em 1,0 mL de água destilada obtendo-se assim o material para a modificação dos eletrodos.

A modificação de um eletrodo impresso (BVT Technologies®, modelo AC1W4R1) composto de um eletrodo de trabalho de grafite ($A = 7,8 \times 10^{-3}$ cm²), contra eletrodo de platina e pseudo-eletrodo de referência de prata foi realizada com o auxílio de micropipeta pela adição direta de 20 µL da suspensão de RuNPs sobre a superfície do eletrodo de trabalho, seguida da evaporação do solvente. As medidas voltamétricas foram realizadas com o auxílio de um Potenciostato/Galvanostato µAutolab® Type III, gerenciado pelo software GPES 4.9 EcoChemie®. O eletrodo de referência externo utilizado em todas as medidas foi o de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e um eletrodo de platina como eletrodo auxiliar.

Estudos do volume de RuNPs adicionado à superfície do eletrodo, eletrólito suporte, variação do pH e velocidade de varredura foram realizados. A caracterização física das RuNPs foi realizada utilizando a técnica de difratometria de raios X (DRX).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização Eletroquímica das RuNPs

As amostras foram caracterizadas pela técnica de difratometria de raios X, onde foram observados a formação de nanopartículas de rutênio hexagonal com tamanho aproximado de 4,1 nm.

Eletrodos impressos foram modificados com uma suspensão de RuNPs e submetidos a medidas voltamétricas para caracterizar o comportamento voltamétrico deste material. Os ciclovoltagramas obtidos são mostrados na Figura 1. Nessa figura, podem ser observados picos de corrente referentes a oxidação em 1,06 V (E_{pa}) e a redução em 0,74 V (E_{pc}) atribuídos ao par redox $Ru^{2+}/RuOx$, sugerindo um processo quasi-reversível para o sistema.

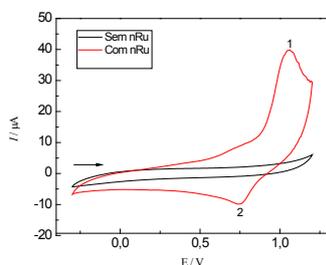


Figura 1 - Voltamogramas obtidos utilizando um EI modificado com RuNPs (—) e não modificado (—) em meio de KNO_3 0,1 mol L^{-1} (pH 5,5), $v = 20$ mV s^{-1} .

A Figura 2 apresenta os voltamogramas lineares obtidos para um EI não modificado na ausência (A) e presença (B) de dopamina $7,94 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , assim como para o EI modificado com RuNP na ausência (C) e presença (D) de dopamina $7,94 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , empregando como eletrólito suporte uma solução de KNO_3 0,1 mol L^{-1} (pH = 2,0). Observando-se os resultados obtidos para ambos os eletrodos, é possível verificar um aumento significativo das correntes de pico o EI modificado com RuNP, decorrente da sua maior área superficial. Comparando-se os valores de sensibilidade obtidos para um EI modificado e não modificado, observa-se um valor cerca de 150 vezes maior para o eletrodo modificado.

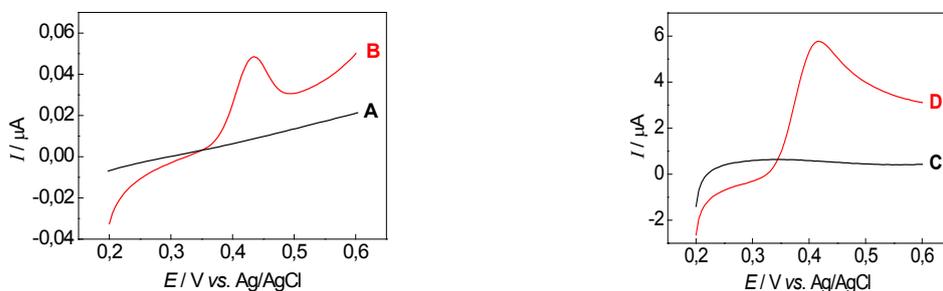


Figura 2 - Voltamogramas obtidos para um EI não modificado na ausência (A) e presença (B) de dopamina $7,94 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , e para o EI modificado com RuNPs na ausência (C) e presença (D) de dopamina $7,94 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , em uma solução de KNO_3 0,1 mol L^{-1} (pH = 2,0).

Otimização dos Parâmetros Experimentais

Depois de verificado o melhor desempenho para o EI modificado, foi investigada a influência de diversos parâmetros experimentais sobre a resposta voltamétrica. Inicialmente estudou-se o efeito do volume da suspensão contendo RuNPs adicionado ao eletrodo de trabalho no intervalo de 5,0 a 30 μL . As correntes de pico referentes ao processo redox da dopamina em uma solução de KNO_3 0,1 mol L^{-1} contendo $7,94 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} do analito aumentaram significativamente até 20 μL mantendo-se praticamente constante para valores maiores. Dessa forma, um volume de 20 μL foi escolhido para estudos posteriores.

O efeito do pH foi avaliado no intervalo de 2,0 a 6,0 (ajustando-se os valores de uma solução de KNO_3 0,1 mol L^{-1} com HNO_3 ou KOH). A determinação de dopamina em meio altamente ácido é pouco usual em função da protonação do grupo amino presente na molécula, que dificulta sua oxidação. Entretanto, os melhores resultados utilizando-se o sensor proposto foram obtidos para uma solução pH 2,0 sendo então este valor escolhido. Tal fato evidencia a participação das RuNPs na eletro-oxidação da dopamina. Para o estudo da velocidade de varredura, foram avaliadas velocidades no intervalo de 5 a 150 mV s^{-1} . O melhor perfil voltamétrico foi obtido para uma velocidade de 25 mV s^{-1} que então foi a escolhida. A variação da corrente de pico tanto anódica como catódica com a raiz quadrada

da velocidade de varredura indicou que os processos de oxidação e redução da dopamina são característicos de um transporte de massa controlado por difusão.

Curva analítica

Após a otimização das condições experimentais para o procedimento proposto, medidas voltamétricas, foram realizadas utilizando-se soluções de dopamina em diferentes concentrações a fim de se obter uma curva analítica. A Figura 3 apresenta os voltamogramas, assim como os registros dos valores de corrente de pico anódico que geraram uma relação linear com a concentração de dopamina no intervalo de $3,98 \times 10^{-4}$ a $3,10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ representada pela equação $(I_{pa} / \mu\text{A}) = -0,24153 + 2,33473C$, onde C é a concentração de dopamina em mmol L^{-1} com um coeficiente de correlação de 0.9977 ($n = 5$) e com um limite de detecção de $3,98 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (3σ do branco / slope)

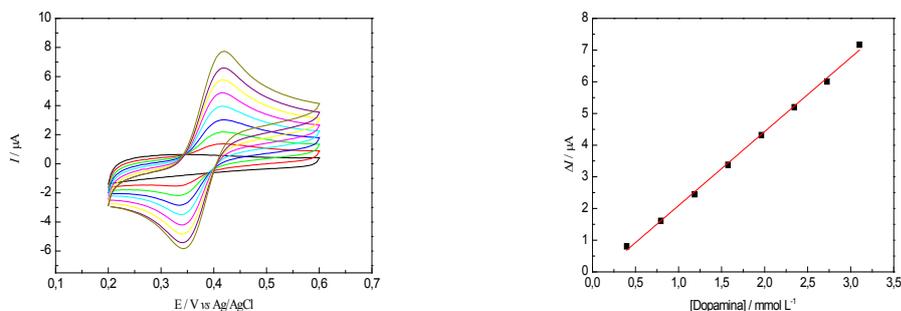


Figura 3 – Voltamogramas e curva analítica para soluções de dopamina, em meio de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH } 2,0$), $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

CONCLUSÕES

O uso de eletrodos impressos (EI) modificados com RuNPs mostrou ser um procedimento simples, barato e reprodutível quando aplicado na determinação de dopamina. Em comparação com o EI não modificado, os resultados obtidos em termos de magnitude de corrente e perfil voltamétrico são significativamente melhores.

AGRADECIMENTOS

CNPq (Proc. 577536/2008-7), Fundação Araucária (219/2010, prot. 15687), UFPR, UFSCar.

REFERÊNCIAS

- [1] Campbell, F.W., R.G. Compton, “*The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. Analytical and Bioanalytical Chemistry*”, 2010. 396(1): p. 241-259.
- [2] Lupetti; K. O., Ramos, L. A., Fatibello-Filho, O. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea americana*)
- [3] Couto G. G. *et al.*, “Nickel nanoparticles obtained by a modified polyol process: Synthesis, characterization, and magnetic properties”, *Journal of Colloid and Interface Science* **311**, 461, 2007.

DESENVOLVIMENTO DE BIOCSENSOR ELETROQUÍMICO À BASE DE EXTRATO DO LICOR DE ACAÍ (*EUTERPE OLERACEAE* MART.) PARA DETECÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Maricely J.U. Toro (PG) e Maria D.P.T. Sotomayor (PQ)

Instituto de Química –UNESP, Araraquara – SP – Brasil. maruria12@hotmail.com

RESUMO: Descreve-se a construção de um biossensor para a detecção de compostos fenólicos, empregando pasta de carbono modificada com extrato do licor de açaí o qual contém a enzima peroxidase. A preparação da pasta assim como as condições de análise foram otimizadas em relação à quantidade de enzima, eletrólito suporte, pH e parâmetros relacionados à voltametria de onda quadrada, que foi a técnica eletroquímica usada para obtenção das medidas, usando hidroquinona (HQ) como mediador de elétrons. Os resultados mostraram que o biossensor proposto é promissor na detecção sensível de hidroquinona, e na seguinte etapa será aplicado na análise de amostras ambientais e cosméticas.

Palavras-chave: biossensores, açaí, peroxidase, compostos fenólicos.

INTRODUÇÃO

O açaizeiro é palmeira de ampla distribuição na Amazônia, constituindo produto de grande relevância sócio ambiental e econômico para a região norte do Brasil. Explorado principalmente de forma extrativista, dadas as grandes populações da espécie na floresta, predomina nos estados do Amapá e Pará. Rico em enzimas, antocianinas e gordura é muito consumido na região Amazônica. O açaí é comercializado, principalmente, na forma de polpa utilizada na fabricação de doces, sorvetes, licores e, ainda, uma bebida saborosa conhecida na região como licor de açaí. Um dos grandes problemas do consumo do açaí é sua alta perecibilidade, devido à presença das enzimas presentes no fruto [1].

Assim, aproveitando a existência da enzima peroxidase nesse fruto, este trabalho teve como objetivo a construção de um biossensor à base de pasta de carbono modificada com licor de açaí para a detecção de compostos fenólicos. Para isto, foi avaliada a atividade enzimática da peroxidase em polpa de açaí do tipo A (*Euterpe oleraceae* Mart), congelada, obtida no comércio local do Pará.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Extração da peroxidase da polpa de açaí de açaí

A enzima peroxidase foi obtida da polpa do açaí segundo o procedimento a seguir: 30 g da polpa de açaí foram pesadas e homogeneizadas com 30 mL de solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 6,0) durante 5 minutos e a seguir a mistura obtida foi filtrada sob vácuo. O filtrado obtido foi armazenado em frasco âmbar a 4 °C, até seu uso.

Preparação dos biossensores

O biossensor, nas condições otimizadas foi preparado misturando-se por 15 minutos, 250 mg de grafite em pó com 1 mL de extrato-fosfato do licor de açaí e 1 mL de glutaraldeído ao 2,5% (m/v) preparado em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 6,0). A mistura foi deixada secar à temperatura ambiente por 12 horas e a pasta de carbono modificada foi obtida pela adição de 80 mg de óleo mineral. Uma porção adequada da pasta foi tomada para preencher a cavidade de 4 mm de diâmetro por 1 mm de profundidade, de um eletrodo adequado para o uso de pastas de carbono.

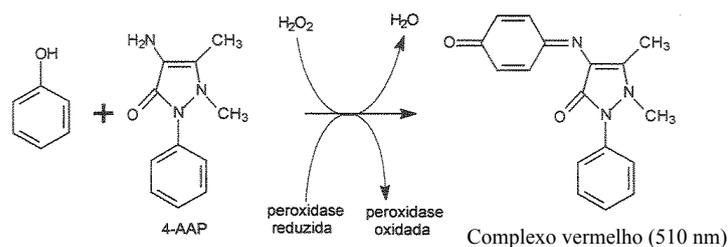
Medidas eletroquímicas.

As medidas eletroquímicas foram realizadas com o auxílio de um potenciostato da Autolab® utilizando-se cela eletroquímica convencional de três eletrodos empregando como eletrodo de referência o de Ag|AgCl,KCl_{sat}, uma espiral de Pt como eletrodo auxiliar e o biossensor à base de licor de açaí como trabalho. Foram empregadas as técnicas de voltametria cíclica, no intervalo de potencial de -0,3 a 0,9 V e velocidade de varredura de 0,02 V s⁻¹; e, voltametria de onda quadrada, nas condições otimizadas, em potencial de -0,2 a 0,2 V, frequência de 20 Hz, amplitude de 100 mV, incremento de 10 mV. Todas as medidas foram realizadas em 10 mL de eletrólito suporte de solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹ de; p H 6,0) contendo 3,92 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio.

Determinação da Atividade Enzimática

A atividade enzimática da peroxidase obtida da polpa de açaí foi determinada medindo-se a absorvância em 510 nm, utilizando-se a metodologia descrita Sotomayor [2] e que se baseia na condensação que ocorre entre a

4-aminoantipiridina (4-AAP) e o fenol, na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, formando um complexo colorido vermelho escuro como se mostra na seguinte reação



Esta medida foi realizada misturando em cubeta espectrofotométrica de 3,00 mL, 1,5 mL de peróxido de hidrogênio na faixa de concentrações entre $2,7 \times 10^{-5}$ e $3,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; 1,4 mL de solução de fenol $0,17 \text{ mol L}^{-1}$ com aminoantipiridina $0,0025 \text{ mol L}^{-1}$ e 100 μL do extrato fosfato do licor de açaí contendo a enzima. Com os dados espectrofotométricos foi calculada uma atividade para a peroxidase de 16 U g^{-1} de licor comercial de açaí.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1A são apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos com o biossensor à base de polpa de açaí. Na Figura 1B é mostrada a correspondente curva analítica obtida para hidroquinona, cuja quantificação foi baseada na regeneração da peroxidase pela oxidação do composto fenólico para quinona, com a subsequente redução da quinona na superfície do biossensor a $0,1 \text{ V}$ vs Ag/AgCl (Figura 1A).

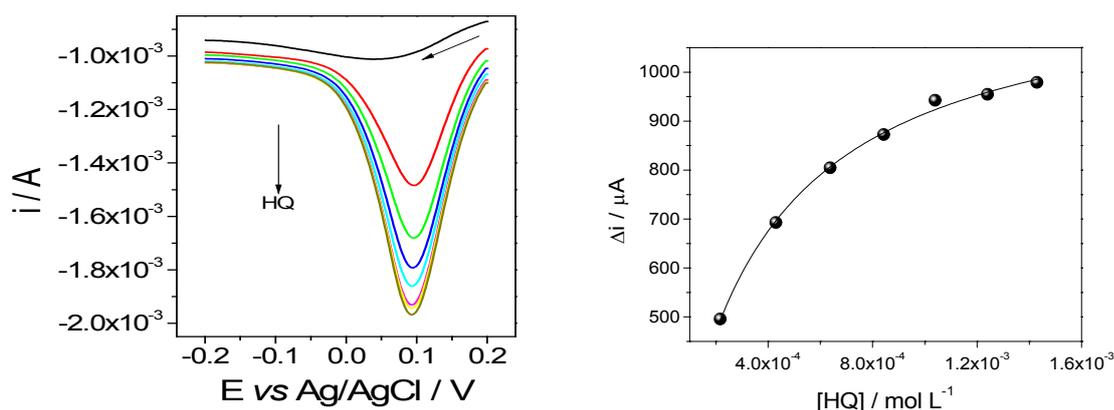


Figura 1. A) Voltamograma de onda quadrada obtido com o biossensor à base de açaí e adições crescentes de hidroquinona. B) A correspondente curva analítica, plotada até a saturação.

Observa-se da Figura 1B, que o perfil de resposta do biossensor é hiperbólico, tal como esperado, mostrando uma região linear na faixa de $7,5 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, que se ajusta à equação:

$$\Delta i / \mu\text{A} = 299(\pm 7) + 950.269 (\pm 1.548) [\text{HQ}] / \text{mol L}^{-1} \quad (q.1)$$

O limite de detecção e de quantificação foram calculados sob as condições otimizadas, obtendo-se os valores de $22 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $73 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Foi calculada também a constante aparente de Michaelis-Menten () para o biossensor proposto, usando o gráfico do duplo recíproco (Figura 2), obtendo-se um valor de $3,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

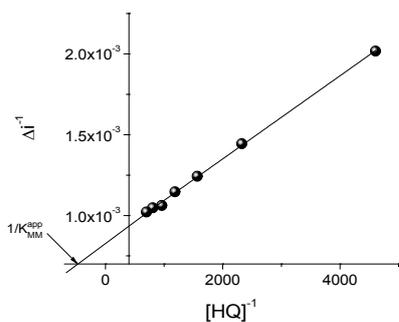


Figura 2. Grafico de Lineweaver – Burk ou duplo recíproco para o biossensor à base de licor de açaí.

CONCLUSÕES

O biossensor desenvolvido à base de pasta de carbono modificado com enzima peroxidase extraída do licor de açaí, mostrou-se promissor na detecção de hidroquinona. Na seguinte etapa este biossensor será aplicado na análise de amostras ambientais e cosméticas.

AGRADECIMENTOS: CNPq e FAPESPA

REFERÊNCIAS

- [1] MONTEIRO, S. Açaí: da fruta exótica a vedete de consumo. *Frutas e Derivados*, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 29-32, 2006.
- [2] SOTOMAYOR, M.D.P.T., “Construção e Aplicação de Optodos em Sistemas Analíticos baseados em variações de p H” *Tese de Doutorado UNICAMP*, 2000.

DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR POTENCIOMÉTRICO À BASE DE NANOTUBOS DE CARBONO MODIFICADOS COM H₂TSPP PARA A DETERMINAÇÃO DE COBRE

Saimon Moraes Silva¹, Dilton Martins Pimentel¹, Fernando Roberto Figueirêdo Leite¹, Lauro Tatsuo Kubota², Flávio Santos Damos¹ e Rita de Cássia Silva Luz¹

¹ Departamento de Química - UFVJM, Diamantina - MG - Brasil. ² Instituto de Química da UNICAMP, Campinas – SP – Brasil. saimonmoraes@bol.com.br

RESUMO: O presente trabalho propõe o desenvolvimento de um sensor para a determinação potenciométrica de cobre por redissolução química empregando um eletrodo de grafite pirolítico de plano basal modificado com Tetrasulfonatofenil porfirina (H₂TSPP) adsorvido sobre Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas (NCPM). Os parâmetros que influenciam a resposta do eletrodo, tais como as quantidades de NCPM e de H₂TSPP, pH, concentração da solução tampão, tempo de deposição e potencial aplicados foram investigados em busca de uma maior sensibilidade para o sistema desenvolvido. Sob condições experimentais e operacionais otimizadas, o sensor desenvolvido proporcionou resposta linear no intervalo de 3,98 a 188 µmol L⁻¹ (R = 0,9998), apresentando-se como um dispositivo de potencial aplicação para a determinação de cobre em diferentes materiais.

Palavras-chave: Cobre; Sensor; Tetrasulfonatofenil porfirina; Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas

INTRODUÇÃO

O íon cobre participa diretamente de vários processos biológicos, tais como respiração, transporte de ferro, proteção ao estresse oxidativo, produção de hormônio peptídeo, crescimento das células sanguíneas, etc. No entanto, o cobre também está envolvido com reações redox que geram o radical hidroxila, reponsável pela depreciação de lipídios, proteínas e DNA [1]. Conseqüentemente a determinação desse íon em diversos materiais, bem como o seu controle ambiental são procedimentos de extrema importância.

Dentre os métodos utilizados para a determinação de cobre em diferentes amostras, merecem destaque os métodos eletroanalíticos, principalmente os que utilizam a Potenciometria de Redissolução Química (PRQ), por possibilitarem análises a níveis de traços, determinação simultânea, além de proporcionarem alta sensibilidade, seletividade, simplicidade e baixo custo das análises [2].

Neste contexto, o presente trabalho descreve o desenvolvimento de um sensor potenciométrico com redissolução química para a quantificação de íons cobre utilizando um Eletrodo de Grafite Pirolítico de Plano Basal (GPPB) modificado com o ionóforo Tetrasulfonatofenil porfirina (H₂TSPP), adsorvido sobre Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas (NCPM), o qual foi denominado GPPB/NCPM/H₂TSPP.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 128 N (Eco Chemie) e uma célula eletroquímica de 10 mL onde foram inseridos um eletrodo auxiliar de platina, um eletrodo referência de Ag/AgCl_(sat) e um eletrodo de trabalho formado por GPPB (Área = 0,28 cm²).

O eletrodo de GPPB foi modificado com a adição direta sobre sua superfície de 20 µL de suspensão contendo 1 mg de NCPM e 1 mg do ionóforo dissolvidos em 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, o eletrodo modificado foi deixado para secar em estufa a 60 °C durante 10 min. O comportamento eletroquímico do eletrodo GPPB/NCPM/H₂TSPP e do eletrodo GPPB não modificado, foi avaliado por Voltametria de Pulso Diferencial na ausência e presença de íons cobre.

Os parâmetros que influenciam a resposta do eletrodo, tais como as quantidades de NCPM e de H₂TSPP, pH e concentração da solução tampão, tempo de deposição e potencial aplicados na PRQ foram investigados em busca de melhor sensibilidade analítica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos com o eletrodo GPPB não modificado na ausência (Fig. 1, curva 1) e presença (Fig. 1, curva 2) de íons cobre e comparados com voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo GPPB/NCPM/H₂TSPP na ausência (Fig. 1, curva 3) e presença (Fig. 1, curva 4) do mesmo analito. Comparando-se os voltamogramas obtidos com o eletrodo GPPB/NCPM/H₂TSPP (Fig. 1, curva 4) com o GPPB não modificado (Fig. 1, curva 2), verificou-se um aumento significativo na corrente de pico catódica (I_{pc}) promovido pela modificação do eletrodo.

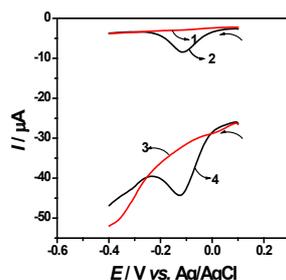


Figura 1: Voltamogramas de pulso diferencial referentes ao eletrodo GPPB não modificado na ausência (1) e presença (2) de cobre e voltamogramas de pulso diferencial referentes ao eletrodo GPPB/NCPM/H₂TSPP na ausência (3) e presença (4) de cobre. [Cobre] = 0,1 mmol L⁻¹. Eletrólito: 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,0). Velocidade de varredura = 20 mV s⁻¹. Amplitude de pulso = 20 mV.

A influência da concentração de NCPM no processo de modificação do eletrodo foi investigada preparando-se soluções desse composto em diferentes concentrações (0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mg mL⁻¹), mantendo-se a quantidade de ionóforo em 2,0 mg mL⁻¹ e utilizando-se DMSO como solvente. As melhores respostas obtidas foram alcançadas quando se utilizou nanotubos nas concentrações 3,0 e 4,0 mg mL⁻¹ (Tabela 1). Em concentrações abaixo de 3 mg mL⁻¹ observou-se uma menor resposta para o sensor provavelmente devido a imobilização de uma quantidade insuficiente de nanotubos na superfície do eletrodo a qual proporcionou uma pequena adsorção do ionóforo na superfície do mesmo. Portanto, escolheu-se para os estudos subsequentes uma concentração de 3,0 mg mL⁻¹.

Tabela 1: Influência da concentração de NCPM na resposta obtida por Potenciometria de Redissolução Química. [Cu²⁺] = 0,1 mmol L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. [H₂TSPP] = 2,0 mg mL⁻¹.

[NCPM] (mg mL ⁻¹)	dt/dE	[NCPM] (mg mL ⁻¹)	dt/dE
0,5	5654	3,0	8869
1,0	6112	4,0	8873
2,0	7317	-	-

A influência da concentração do ionóforo no processo de modificação do eletrodo também foi investigada preparando-se soluções desse composto em diferentes concentrações (1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 mg mL⁻¹), utilizando-se DMSO como solvente. A maior resposta analítica foi alcançada quando se utilizou o ionóforo na concentração de 2,0 mg mL⁻¹ (Tabela 2) e, portanto, esse valor de concentração foi utilizado para os estudos posteriores.

Tabela 2: Influência da concentração de ionóforo na resposta obtida por Potenciometria de Redissolução Química. [NCPM] = 3,0 mg mL⁻¹. [Cu²⁺] = 0,1 mmol L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0.

[Ionóforo] (mg mL ⁻¹)	dt/dE	[Ionóforo] (mg mL ⁻¹)	dt/dE
1,0	3082	2,5	8044
1,5	4685	3,0	7934
2,0	8871	-	-

Valores abaixo de 2,0 mg mL⁻¹ proporcionaram resultados inferiores devido a necessidade de se utilizar uma quantidade suficiente do ionóforo para suportar o analito na superfície do eletrodo. Já em quantidades acima de 2,0 mg mL⁻¹ tem-se um excesso do ionóforo responsável pela diminuição do sinal analítico.

A influência do pH na redução eletroquímica de cobre foi investigada por potenciogramas de redissolução obtidos em soluções 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato de diferentes valores de pH (6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8). A melhor sensibilidade e o melhor perfil potenciométrico foram obtidos em pH 7,0 (Tabela 3) e, portanto, esse valor foi utilizado nos experimentos subsequentes.

Tabela 3: Influência do pH da solução tampão na resposta do sensor potenciométrico. [Cu²⁺] = 0,1 mmol L⁻¹. [NCPM] = 3,0 mg mL⁻¹; [H₂TSPP] = 2,0 mg mL⁻¹.

pH	dt/dE	pH	dt/dE
6,0	4305	7,5	8530
6,5	5580	8,0	8480
7,0	8870	-	-

Em seguida estudou-se a concentração da solução tampão fosfato, pH 7,0, em concentrações de 0,025, 0,050, 0,100, 0,150 e 0,200 mol L⁻¹ as quais foram preparadas a fim de se avaliar a resposta do eletrodo modificado. As maiores respostas foram obtidas quando foi utilizado o eletrólito em concentrações acima de 0,150 mol L⁻¹ (Tabela 4). A partir dessa concentração garantiu-se que a eletroneutralidade do eletrodo foi mantida, sendo, então, esse valor utilizado nos experimentos subsequentes.

Tabela 4: Influência da concentração da solução tampão fosfato (pH 7,0) na resposta obtida por Potenciometria de Redissolução Química.

[Tampão fosfato] (mol L ⁻¹)	dt/dE	[Tampão fosfato] (mol L ⁻¹)	dt/dE
0,025	8089	0,150	95621
0,050	8293	0,200	95698
0,100	8872	-	-

Os potenciais de deposição do cobre estudados foram: -1,0, -0,6, -0,4, -0,3, -0,25, -0,20 e -0,15 V. Observou-se que o sinal analítico aumentou significativamente de -1,0 a -0,25 V. Em potenciais entre -0,25 e -0,15 V, a resposta foi máxima e constante. Neste sentido, foi escolhido o potencial de deposição de -0,25 V. Finalmente, variou-se o tempo de deposição em 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 s e observou-se uma pré-concentração máxima do cobre em 240 s. Após esse tempo o sinal do sensor reduziu-se significativamente.

Após a otimização dos parâmetros experimentais e operacionais, o sensor desenvolvido proporcionou uma resposta linear no intervalo de 3,98 a 188 µmol L⁻¹ para o cobre (n=7) e um coeficiente de correlação linear igual a 0,9998.

CONCLUSÕES

O sensor desenvolvido apresentou-se como uma promissora alternativa para a determinação potenciométrica de cobre em diferentes materiais com grande simplicidade e baixo custo.

AGRADECIMENTOS: FAPEMIG E CNPQ.

REFERÊNCIAS

- [1] HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., “The importance of free-radicals and catalytic metal-ions in human-diseases”, *Molecular Aspects of Medicine* 8 89-193, 1985.
- [2] COBELO-GARCÍA A., PREGO R., “Chemical speciation of dissolved copper, lead and zinc in a ria coastal system: the role of resuspended sediments”, *Analytica Chimica Acta* 524 109-114, 2004.

DEGRADAÇÃO ELETROQUÍMICA DO DESREGULADOR ENDÓCRINO METIL PARABENO EM ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO

Juliana R. Steter, Dawany Dionísio, Robson S. Rocha, Douglas W. Miwa, Marcos R.V. Lanza e Artur J. Motheo

Instituto de Química de São Carlos - USP, São Carlos - SP – Brasil. jsteter@usp.br

RESUMO: Neste trabalho são descritos os ensaios da oxidação eletroquímica do metil parabeno utilizando eletrodo de diamante dopado com boro (BDD). O efeito de diferentes densidades de corrente (2,5 a 100 mA cm⁻²) em meio aquoso contendo Na₂SO₄ como eletrólito suporte foi investigado. De forma geral, a taxa de remoção de COT e consumo energético aumentaram segundo o aumento da densidade de corrente aplicada, enquanto os valores de eficiência de corrente (EC) diminuíram, pois maiores densidades de corrente favorecem a reação de desprendimento de oxigênio.

Palavras-chave: oxidação eletroquímica, desregulador endócrino, eletrodo de diamante dopado com boro.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve um considerável aumento na concentração de substâncias químicas presentes no meio ambiente, provocado pelo desenvolvimento de novos processos de produção agrícola e industrial, bem como pelo adensamento da população nos centros urbanos. Muitas destas substâncias são classificadas como poluentes emergentes, dentre as quais, destaca-se uma classe de contaminantes ambientais potencialmente tóxicos, os desreguladores endócrinos [1]. Um desregulador endócrino ou disruptor endócrino (do inglês *endocrine disruptor*) é um composto com atividade capaz de provocar alterações no sistema endócrino de um organismo [2]. Dentre estas substâncias, os parabenos formam uma classe de conservantes muito comuns e amplamente utilizados na indústria de alimentos e de produtos de saúde e cuidados pessoais (HPC: health and personal care). Com a indicação de que os parabenos foram, recentemente, encontrados em tumores de mama, possivelmente procedentes de sua aplicação na pele pelo uso de desodorantes, filtros solares, cremes ou sprays, várias citações e revisões têm sido publicadas, classificando-os como desreguladores endócrinos [3].

Dessa forma, de acordo com essas considerações, esforços vêm sendo realizados, em termos de pesquisa, desenvolvimento e aplicação de processos para tratamento mais eficiente de esgotos e águas residuais, visando o uso de métodos relacionados à degradação destas substâncias. Dentre estes métodos destacam-se os processos oxidativos avançados (POAs). Esses processos envolvem a geração *in situ* de espécies altamente oxidantes, tais como o radical hidroxila (HO•) [4] e são descritos como sendo uma importante classe de tecnologias utilizadas na aceleração de processos de oxidação (ou até mesmo na remoção total de contaminantes) de uma ampla variedade de poluentes orgânicos presentes na água e no ar.

O radical hidroxila pode ser produzido por meio de reações químicas, fotoquímicas, eletroquímicas e sonoquímicas e pode reagir com as substâncias orgânicas por adição eletrofílica, abstração de hidrogênio e transferência de elétrons [5]. Um dos processos mais promissores para a oxidação de contaminantes orgânicos é o eletroquímico, pois apresentam uma série de vantagens como versatilidade, compatibilidade¹ ambiental² e facilidade de automação. Quando a eletroxidação das substâncias orgânicas ocorre via radicais HO•, o processo é denominado direto. Os eletrodos SnO₂-Sb, PbO₂ e BDD (diamante dopado com boro), por exemplo, são bons materiais para a eletroxidação direta de substâncias orgânicas, de acordo com as equações a seguir.



Neste trabalho é apresentado o estudo de oxidação eletroquímica do metil parabeno (metil-*p*-hidróxi benzoato), utilizando-se eletrodo de diamante dopado com boro (BDD), mediante a aplicação de diferentes densidades de corrente (25-100 mA cm⁻²) em meio de Na₂SO₄ (0,05 mol L⁻¹) como eletrólito suporte. Investigou-se a velocidade aparente da reação de degradação (k min⁻¹), remoção de carbono orgânico total (COT), eficiência de corrente associada ao COT (%) e consumo energético (KW h m⁻³).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Reagentes e equipamentos

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água deionizada (Milli-Q, Millipore Inc., > 18 M Ω). O metil parabenho foi adquirido da Aldrich e o eletrólito suporte (Na₂SO₄) da Mallinckrodt. A concentração de eletrólito foi ajustada para concentração de 0,05 mol L⁻¹, correspondendo à força iônica de 0,3 para todos os experimentos realizados. As eletrólises galvanostáticas foram realizadas em célula cilíndrica (400 mL) utilizando-se ECS (eletrodo de calomelano saturado) como eletrodo de referência, duas placas de titânio (2 cm² de área cada uma) como eletrodo auxiliar e como eletrodo de trabalho o BDD (9,62 cm²), mantendo-se constante a temperatura em 25 °C. A concentração inicial de metil parabenho em solução de Na₂SO₄ foi de 100 mg L⁻¹. As medidas eletroquímicas foram feitas em um potenciostato Autolab (modelo PGSTAT30N).

Análises

As medidas de absorção no UV-Vis foram realizadas a 25 °C em um espectrofotômetro MultiSpec-1501-Shimadzu acoplado a um modelo acessório de controle de temperatura CPS-Controller, monitorando-se o $\lambda = 254$ nm, diluição da amostra (1:100) em H₂O deionizada. Análises dos produtos de reação foram realizadas em um HPLC (Shimadzu LC-10AD VP) com coluna de fase reversa (Zorbax SB-C18 250 x 4,6 mm), utilizando-se acetonitrila/ H₂O como fase móvel (40:60, v/v). A concentração de metil parabenho foi monitorada em um detector (SPD-10A VP) em 254 nm, faixa de temperatura 30-85 °C e velocidade de fluxo 1 mL min⁻¹. A remoção de carbono orgânico total (COT) foi analisada em um TOC-V_{CPII}, Shimadzu. A eficiência de corrente (EC) pode ser calculada segundo a equação (4):

$$E = \frac{(COT_i - COT_f) F V}{8 I t} \quad (4)$$

onde COT_i e COT_f são as determinações de COT inicial e final (g L⁻¹), respectivamente, F é a constante de Faraday (96487 C mol⁻¹), t é o tempo (h), V é o volume de solução (L), I é a intensidade de corrente aplicada (A), 8 é o equivalente de massa de oxigênio (g eq⁻¹).

O consumo de energia da oxidação eletroquímica CE (KW h m⁻³) pode ser calculado de acordo com a equação (5):

$$CE = \frac{U I t}{V} \quad (5)$$

onde U é a média do potencial de célula (V), I é a intensidade de corrente aplicada (A), t é o tempo (h) e V é o volume (m³).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As eletrólises galvanostáticas do metil parabenho foram realizadas durante 2 horas, variando-se a densidade de corrente aplicada. A Figura 1 mostra que o decaimento de concentração em função do tempo, obedece à cinética de primeira ordem, com constantes de velocidade aparente da ordem de 10⁻³ min⁻¹ e os melhores resultados obtidos correspondem aos processos onde se aplicou 75 e 100 mA cm⁻².

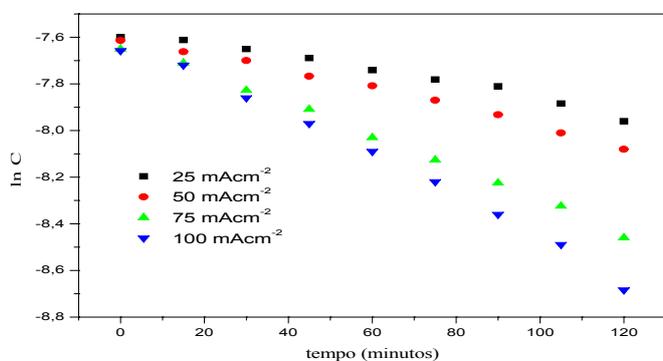


Figura 1: Decaimento da concentração do metil parabenho em função da densidade de corrente aplicada.

Conforme mostrado na Tabela 1, o consumo energético (KW h m^{-3}) aumenta de acordo com o aumento da densidade de corrente, enquanto os valores de EC diminuem; indicando que o aumento de corrente favorece a reação de desprendimento de oxigênio. Verificou-se um aumento das taxas de remoção de COT para densidades de corrente maiores (30,8 e 39,41%, respectivamente para 75 e 100 mA cm^{-2}).

Tabela 1: Parâmetros relativos à oxidação galvanostática do metil parabenol (100 mg L^{-1})

j/mAcm^{-2}	E_{cel} (V)	CE (KW h m^{-3})	COT _{remoção} (%)	EC (%)	K (min^{-1})	Concentração final (mg L^{-1})
25	8,23	11,79	21,8	3,75	2,93	73,94
50	12,09	34,76	28,4	2,44	3,85	65,46
75	15,47	66,65	30,8	1,77	6,77	44,85
100	18,99	108,79	39,4	1,69	8,51	35,84

Foi realizada também, uma eletrólise “extensiva” a 100 mA cm^{-2} durante 5 horas e foi observado pelas análises do decaimento da concentração em função do tempo (Figura 3) e de UV-Vis (Figura 4) que em aproximadamente 3 horas de eletrólise a concentração do parabenol aproximou-se de zero e obteve-se uma alta taxa de remoção de TOC foi de 79,8%.

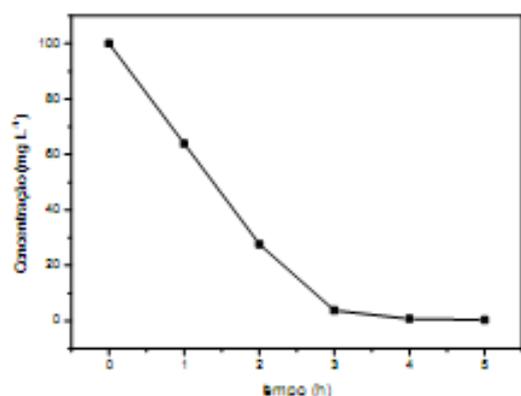


Figura 2: Variação da concentração de metil parabenol em função do tempo da eletrólise a 100 mAcm^{-2} durante 5 horas.

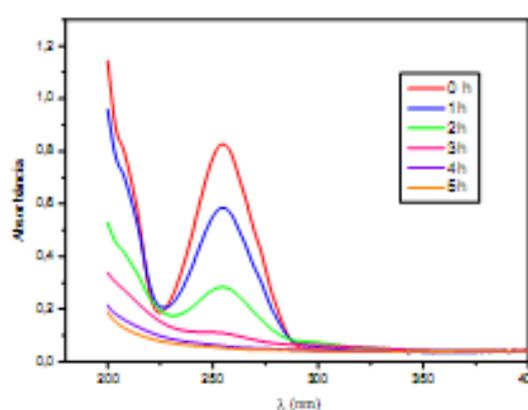


Figura 3: Espectro UV-Vis de entre 200 e 400 nm. Diluição 1:10 em H_2O .

CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que a remoção eletroquímica do metil parabenol é mais eficiente quando maiores densidades de corrente são aplicadas e que ao aumentar o tempo reacional, em aproximadamente, 3 horas a concentração do parabenol é reduzida praticamente a zero.

AGRADECIMENTOS: CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] BILLA D.M., DEZOTTI M., “Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências”, *Química Nova*, 30:651-666, 2007.
- [2] NOGUEIRA J.M.F., “Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitoração de sistemas aquáticos”, *Química Nova*, 88:65-71, 2003.
- [3] DOUGHERT J.A., SWARZENSKI P.W., DINICOLA R.S., “Occurrence of herbicides and pharmaceutical and personal care products in surface water and groundwater around Libert Bay, Puget Sound, Washington”, *Journal of Environmental Quality*, 35:1173-1180, 2010.
- [4] BUXTON G.V., GREENSTOCK C.L., HELMAN W.P., ROSS A.B., “Critical review of rate constants for reactions of hydroxyl electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\text{HO}^\bullet/\text{O}^\bullet$)”, *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 17:513-886, 1988.
- [5] PERA-TITUS M., GARCÍA-MOLINA V., BAÑOS M.A., GIMÉNES J., ESPLUGAS S., “Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation process: a general review”, *Applied Catalysis B: Environmental*, 47:219-256, 2004.

IMPEDIMETRIC BIOSENSOR BASED GOLD NANOPARTICLES AND CRAMOLL LECTIN FOR BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE

Maria D.L. Oliveira^{1*}, Cesar A.S. Andrade², Maria T.S. Correia¹,
Luana C.B.B. Coelho¹, Pankaj R. Singh³, Xiangqun Zeng³

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil, ²Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil, ³Department of Chemistry, Oakland University, 2200 Squirrel Road, Rochester, MI 48309, USA. m_danielly@yahoo.com.br

ABSTRACT: We report the development of a new selective and specific electrochemical biosensor for bacterial lipopolysaccharide (LPS). The impedimetric biosensor is fabricated by self-assembled CramoLL lectin on the PVM-AuNPcys-modified gold electrode through electrostatic interaction. The measurements of cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) showed that $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ reactions on the gold electrode surface were blocked due to the procedures of modified electrode with PVM-AuNPcys-CramoLL. The binding of a specific CramoLL to LPS recognition could be detected by measurements of the impedance change. In the majority of the experiments the lectin retained its activity as observed through their interaction with LPS from *E. coli*, *S. marcescens*, *S. enterica* and *K. pneumoniae*. The utility of this sensor for selective discrimination of bacterial lipopolysaccharides types with high sensitivity has been achieved.

Keywords: Impedance; cyclic voltammetry; lipopolysaccharide; lectin

INTRODUCTION

In the past few years, there is an increasingly interest to obtain new biodevices for rapid detection of lipopolysaccharides (LPS), since they are common pathogens mainly in humans, animals and plants. LPS, also known as an endotoxin, are the major surface-exposed structural component of the outer membrane of gram-negative bacteria [1] and composed of three distinct regions: lipid A, core oligosaccharide, and O-specific antigen. The O-specific chain is an antigenic polysaccharide composed of a chain of highly variable repeating oligosaccharide subunits, typically three to six monosaccharide residues. Effects of endotoxins exposure on humans include fever, diarrhea, vomiting, septic shock, and disseminated intravascular coagulation. In addition, detection of bacterial LPS from strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* have important role in research, industry, food control, public health and biodefense.

The LPS molecule is a virulence determinant in *K. pneumoniae* and its aggregation with capsular polysaccharide has been implicated in tissue damage that typically results from active *K. pneumoniae* lobar pneumonia. *Klebsiella* O antigens is composed of two discrete repeat-unit structures of D-galactan. *S. marcescens* is an opportunistic pathogen and its endotoxins cause endocarditis, meningitis, urinary tract infections, and bloodstream infections. LPS from *S. marcescens* exhibit a linear polysaccharide composed by D-glucose-L-rhamnose disaccharide. *E. coli* is the most common pathogen associated with urinary tract infections (UTIs) in women, and accounts for 70-90% of community-acquired infections. In addition, LPS from *E. coli* K-235 showed that the repetitive subunit sugar residues consist of glucosamine, galactosamine, glucose, galactose, rhamnose. *S. enterica* remains a major cause of food-borne gastroenteritis worldwide. Many cases of human salmonellosis are attributed to consumption of infected poultry meat and eggs; the vast majority of cases being the result of *S. enterica* serovar Enteritidis or serovar Typhimurium [2]. LPS from *S. enterica* contain around 20 repeats of a common main-chain trisaccharide unit consisting of D-mannose, L-rhamnose, and D-galactose.

New methods for label-free detection of bacterial LPS with high accuracy, low cost and less processing time are generally involved the use of lectins, a class of proteins which exhibit a specific affinity to carbohydrates moieties. Therefore, we exploited this binding characteristic to recognize sugar residues as a basis for the biosensor design for different bacteria. In this work we applied a self-assembly technology to develop a rapid and sensitive electrochemical biosensor for detection of bacterial LPS from of *S. enterica* serovar Typhimurium, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* and *E. coli* using a new lectin isolated from *Cratylia mollis* seeds as selective recognition element. CramoLL is a lectin isolated from *Cratylia mollis* seeds of the Leguminosae family and Dioclineae subtribe that recognize Gly/Man and glycoproteins [3]. CramoLL is involved in many biological activities, such as antitumor action, and its specificity is correlated with the Concanavalin A lectin. CramoLL has monosaccharide binding sites with hydrogen bond interactions between protein and methyl- α -D-mannoside (Me α Man). One molecule of Me α Man in the monosaccharide binding site interacts through direct hydrogen bonds with Asn14, Leu99, Tyr100, Asp207, and Arg227 and through hydrophobic contacts with the side chains of Tyr12, Leu99, and Tyr100.

In this work we applied a self-assembly technology to develop a rapid and sensitive electrochemical biosensor for detection of bacterial LPS from of *S. enterica* serovar Typhimurium, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* and *E. coli* using a new lectin isolated from *Cratylia mollis* seeds as selective recognition element.

EXPERIMENTAL

Hybrid AuNpCys composites were obtained in according to Li et al. [4]. The preparation of AuNpCys was performed with 25 μL L-cysteine solution (10^{-3} M) self-assembled with 450 μL of AuNp for 12 h.

Gold electrode surface was freshly polished prior to use with 0.05 μm $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ paste, and rigorously rinsed with doubly distilled water following each polish. Initially, a 5 μL of PVM (0.2%) solution was coated onto the pretreated electrode and dried in air for 5min, then, the electrode was dipped into AuNpCys solution for 30 min. Subsequently, it was rinsed with buffer and 5 μL of CramoLL solution (1.30 mg/mL) was dropped. The PVM-AuNpCys-CramoLL modified electrode was incubated in a PBS solution containing 0.2% BSA for 20 min at 25°C in order to block the remaining active sites. Finally, the resulting PVM-AuNpCys-CramoLL-BSA electrode was exposed to LPSs from *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* and *E. coli* at different concentrations (200 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ and 25 $\mu\text{g/mL}$) diluted in 10 mM pH 7.4 PBS solution at room temperature. Electrochemical measurements were carried out on a PARSTAT 2263 potentiostat controlled by a computer.

RESULTS AND DISCUSSION

Cyclic voltammograms are shown in Fig. 1. The pretreated bare gold electrode gives a reversible cyclic voltammogram (curve a). After electrode modification with AuNpCys (curve b) and AuNpCys-CramoLL (curve c) a small decrease in the amperometric response were obtained. The formation of the PVM-AuNpCys-CramoLL system on gold electrode is accompanied by a considerable decrease in the amperometric response of the electrode and an increase in the peak to peak separation between the cathodic and anodic waves of the redox probe (curve d).

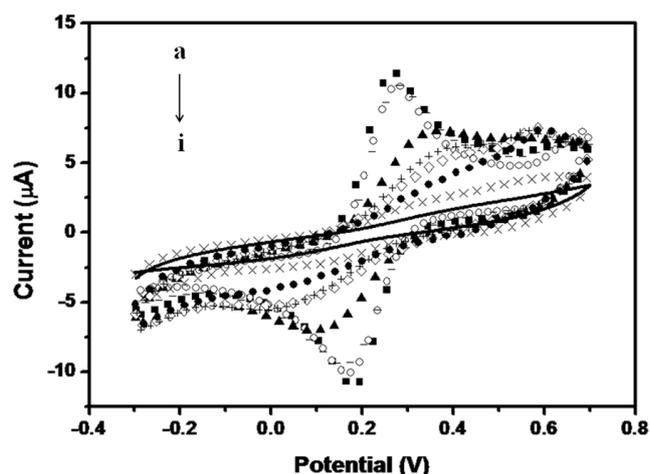


Figure 1 – Cyclic voltammograms of the electrode at different stages: bare gold electrode (■), AuNpCys (○), AuNpCys-CramoLL (-), PVM-AuNpCys-CramoLL (▲), PVM-AuNpCys-CramoLL-BSA (◇), PVM-AuNpCys-CramoLL-BSA-pneumoniae (□), PVM-AuNpCys-CramoLL-BSA-enterica (●), PVM-AuNpCys-CramoLL-BSA-coli (◻) and PVM-AuNpCys-CramoLL-BSA-marcescens (—). Supporting electrolyte 10mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 1:1 + 0.15 M NaCl in PBS 10 mM pH 7.4 solution; scan rate of 80 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

After blocking the free space inside the modified gold electrode with BSA a new decrease of current response is observed (curve f). The decrease of current response confirms that BSA molecules are indeed inserted of the PVM-AuNpCys-CramoLL system, so that they can block the free space. Furthermore the CramoLL biological activity in PVM-AuNpCys-CramoLL-BSA system was evaluated. Curves e and g are demonstrated the CV responses after CramoLL response for LPS from *K. pneumoniae* and *S. enterica* respectively. However, a good response was obtained for *E. coli* (curve h) and *S. marcescens* (curve i) that reflects specific CramoLL interaction to complex carbohydrates as bacterial LPS.

Fig. 2 shows the results of Faradaic impedance spectroscopy on the bare gold electrode (curve a), AuNpCys-modified gold electrode (curve b), AuNpCys-CramoLL-modified gold electrode (curve c), PVM-modified gold electrode (curve d), PVM-AuNpCys-CramoLL-modified gold electrode (curve e) and PVM-AuNpCys-CramoLL-BSA-modified gold electrode (curve f) in the presence of the $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. It can be seen that the gold bare electrode exhibits an almost straight line that is characteristic of a diffusional limiting step of the electrochemical process. When the bare gold electrode was dipped into the AuNpCys colloidal solution, the EIS of the AuNpCys-modified electrode was similar to that of the bare gold electrode. The PVM molecules obstructed the charge transfer of the electrochemical probe and contribute to the increase of the semicircle diameter (Fig. 2, curve d). After being modified with the PVM-

AuNpCys-CramoLL system, the EIS of the PVM-AuNpCys-CramoLL-modified electrode shows a higher interfacial charge transfer resistance (Fig. 2, curve e). The impedance change of the modified process showed that the CramoLL lectin and PVM attached to the gold electrode surface. When the PVM-AuNpCys-CramoLL-BSA was finally obtained, the interfacial resistance increased again, which indicated the formation of the sensor layer and that introduction of BSA hinder the electron transfer (Fig. 2, curve f).

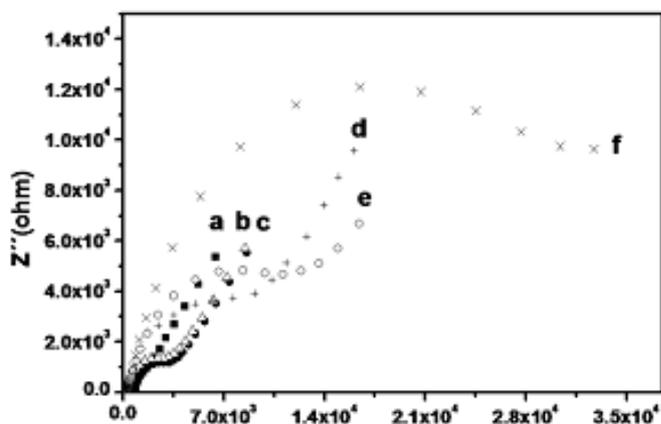


Figure 2 – Nyquist plots for the stepwise modification process: bare gold electrode (■), AuNpCys (●), AuNpCys-CramoLL (□), PVM layer (+), PVM-AuNpCys-CramoLL (○) and PVM-AuNpCys-CramoLL-BSA (□). Supporting electrolyte 10mM $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ 1:1 + 0.15 M NaCl in PBS 10 mM pH 7.4 solution; frequency range at 100mHz to 100 kHz.

CONCLUSION

CV and EIS were applied to evaluate the LPS detection in the presence of $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ redox probe. CramoLL interacted selectively with LPS from *S. marcescens*, *E. coli*, *S. enterica* and *K. pneumoniae* demonstrating, this way, that CramoLL system can be used to detect the presence of complex glycoconjugates.

ACKNOWLEDGEMENTS: CAPES, FACEPE.

REFERENCES

- [1] PRESTON, A., MANDRELL, R.E., GIBSON, B.W., APICELLA, M.A., “The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria”, *Crit. Rev. Microbiol.* 22, 139-180, 1996.
- [2] BEAL, R.K., WIGLEY, P., POWERS, C., HULME, S.D., BARROW, P.A., SMITH, A.L. “Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge”, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 100, 151-164, 2004.
- [3] SHARON, N. “Lectin Carbohydrate Complexes of Plants and Animals - an Atomic View”, *Trend. Biochem. Sci.* 18 (1993) 221-226.
- [4] LI, X., WU, J., GAO, N., SHEN, G., YU, R., “Electrochemical performance of L-cysteine-goldparticle nanocomposite electrode interface as applied to preparation of mediator-free enzymatic biosensors”, *Sens. Actuators B* 117, 35-42, 2006.

AN IMPEDIMETRIC BIOSENSOR FOR DETECTION OF DENGUE SEROTYPE AT PICOMOLAR CONCENTRATION BASED ON GOLD NANOPARTICLES-POLYANILINE HYBRID COMPOSITES

Maria D.L. Oliveira^{1*}, Helena P.O. Nascimento², Celso P. de Melo³,
Gilcelia J.L. Silva², Marli T. Cordeiro⁴, Cesar A.S. Andrade²

¹Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil, ²Centro Acadêmico de Vitória, UFPE, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil, ³Departamento de Física, UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil, ⁴Laboratório Central de Saúde Pública – PE and Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz. m_danielly@yahoo.com.br

ABSTRACT: *In this work, we describe the preparation and characterization of a novel gold nanoparticles-polyaniline hybrid composite (AuNpPANI) with SH-terminal groups that, due to its ability of immobilizing dengue serotype-specific primers 1, 2 and 3 (ST1, ST2 and ST3), can be used for the development of biosensors. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) were performed. CV and EIS results demonstrated that the AuNpPANI can immobilize ST1, ST2 and ST3, formed AuNpPANI-ST complexes. Well-defined cyclic voltammograms characteristic of a diffusion-limited redox process were observed both for the bare gold electrode and after these electrodes have been modified by the adsorption of AuNpPANI or AuNpPANI-ST. The AuNpPANI-ST(1–3) systems were able to recognize the dengue serotype of different patients at picomolar concentrations. CV and EIS results showed unequivocal evidence of an existing interaction between dengue serotype-specific primers and their complementary genomic DNA targets.*
Keywords: *Impedance spectroscopy; cyclic voltammetry; dengue; polyaniline.*

INTRODUCTION

The dengue virus causes more illness and death than any other arbovirus diseases, particularly in developing countries, where dengue viral infections are reaching plague proportions. Detection and classification of the dengue virus requires 4–5 days for its isolation and cultivation. PCR methods can rapidly detect the viral RNA from the patients' serum in the viremia phase but their more widespread use is hindered not only due to the possibility of sample contamination, but also their characteristic demands of high technological support. Hence there is a need for diagnostic methods that, in a reliable manner, could identify the disease and allow the treatment of the dengue virus infection still in its initial stage. Ideally, dengue biosensors should also be able to detect the presence of an analyte in minutes while using small volumes of sample. Dengue virus infection may be subclinical (with no apparent symptoms), and its symptoms are similar to those of malaria, influenza, typhus, and other virus infections. In addition, no specific therapeutic treatment is available for preventing or curing the virus infection caused by dengue virus [1]. For dengue diagnosis the enzyme linked immunosorbent assay and immunofluorescence assay are the gold standard serological tests. Although, new methods for diagnosis of dengue virus employing biosensors are the current demand to prevent the spread of the disease.

Use of DNA biosensor for the detection of nucleic sequences holds an enormous possibility for disease diagnosis, drug screening, and forensic analysis. Many techniques including electrochemistry, surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance have been used for the development of DNA biosensors. Electrochemistry techniques offer sensitivity and selectivity at low cost for the detection of selected DNA sequences associated with human disease and electrochemical biosensors for DNA hybridization present attractive capacity for converting the hybridization event into an analytical signal.

In the last two decades, conductive polymers have attracted much interest due to their high conductivity, ease of preparation, good environmental stability, and large variety of possible applications in areas such as light emitting, electronic devices, and chemical sensors. Polyaniline (PANI) has been proven particularly useful in the development of biosensors. In especial, polymer–nanoparticle composite materials have attracted the interest of a number of researchers, due to their synergistic and hybrid properties derived from their diverse components [2].

In this work, we describe the development a sensitive layer based on gold nanoparticles-polyaniline hybrid composite (AuNpPANI) that can be used for monitoring the hybridization of dengue serotype virus, while requiring the use of small volumes and low concentrations of the analyte. We have applied self-assembly techniques based on the initial chemical adsorption of SH-terminal groups of AuNpPANI on the gold electrode surface and on the subsequent electrostatic interaction between the (positively charged) AuNpPANI and the (negatively charged) serotype-specific primers.

EXPERIMENTAL

Hybrid organic-inorganic composites were obtained in according to de Melo and collaborators [3]. The AuNpPANI-modified electrode was obtained by dropping AuNpPANI solution on the bare gold electrode surface at 25 °C for 2min. Then, the AuNpPANI-modified electrode was rinsed with ethanol solution to remove non-adsorbed particles. The ST immobilization was performed with the AuNpPANI-modified electrode incubated into 0.05 pM probe ST in 10mM phosphate buffer saline (PBS) solution for 5min at room temperature. The immobilized electrode was then rinsed with PBS solution (pH= 7.0) and stored at 4 °C for the hybridization. The hybridization experiments were carried out by immersing the AuNpPANI-ST-modified electrode into different concentrations of genomic DNA target sequence in 10mM PBS solution. Finally, the hybridized electrodes were rinsed with PBS. The scanning electron microscopy images were obtained from a JSM 5900 (JEOL Instruments, Japan) at an acceleration voltage of 15 kV and a working distance of 5 μ m. The serotype specific base sequences (ST) for type 1, 2 and 3 are, respectively:

- Serotype 1 (ST1): 5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'
- Serotype 2 (ST2): 5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'
- Serotype 3 (ST3): 5'-TAACATCATGAGACAGAGC-3'

RESULTS AND DISCUSSION

Fig. 1 shows the cyclic voltammograms obtained for different systems: pure ST1 (Fig. 1a), ST2 (Fig. 1b) and ST3 (Fig. 1c) serotypes, measured at a scan rate of 50mVs⁻¹. The bare gold electrode presents a pair of well-defined redox peaks, showing the reversible process of K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ in solution phase (Fig. 1, curve a). The assemblage of the AuNpPANI composite atop the electrode surface induced a decrease in the peak current (Fig. 1, curve b).

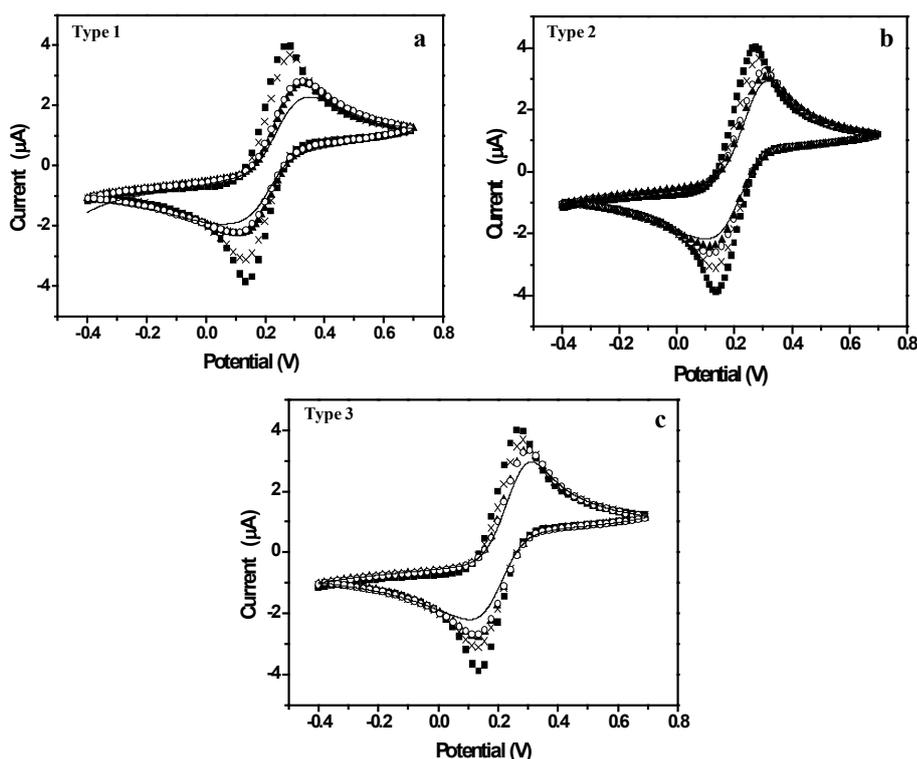


Figure 1 – Cyclic voltammograms of the electrode for serotype 1 (a), serotype 2 (b) and serotype 3 (c) at different stages of the process: bare gold electrode (■), AuNpPANI (×), AuNpPANI-ST (▲), AuNpPANI-ST-DENcomplementary (○) and AuNpPANI-ST-DENnon-complementary (◊). Supporting electrolyte 10mM K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ 1:1 + 0.15 M NaCl in PBS 10 mM pH 7.4 solution; scan rate of 50 mV.s⁻¹.

Finally, curve c in Fig. 1 corresponds to the electrochemical behavior of redox pair after the probe ST has modified the electrode: here, the peak current is lower than that of curve b, in an indication that the probe ST for each dengue serotype has been successfully immobilized on the surface of the modified electrode. The decrease in the peak current could be assigned to the repulsion of K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ by the negatively charged phosphate backbone of probe ST(1–3). After the occurrence of the hybridization of the modified electrode with the target complementary

DEN for ST(1–3), the peak current of redox pair was observed to suffer a further decrease (Fig. 3, curve d). The introduction of complementary genomic DNA increases the negative charge and therefore the repulsion of the redox species. This change in charge upon hybridization induces a further increase in the resistance, in what constitutes the basis for the sensing mechanism of the detector. The AuNpPANI-ST(1–3) system responds to a non-complementary target (AuNpPANI-ST-DENnon-complementary (○)) can be visualized in Fig. 1, which shows no changes in the $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ redox species when compared with the proposed system (AuNpPANI-ST (▲)).

Fig. 2 shows the Nyquist plots of the differently modified electrode when the frequency was varied from 100MHz to 100 kHz. An almost straight line was observed for the bare gold electrode (curve a), which is a characteristic of an electron transfer process controlled by mass diffusion and a low R_{CT} ($8.62 \times 10^2 \Omega$). The assemblage of the AuNpPANI composite on the electrode surface induced an increase in the interfacial R_{CT} (curve b) as compared to the corresponding one of the bare gold electrode, in an indication of a blockage in the electron transfer.

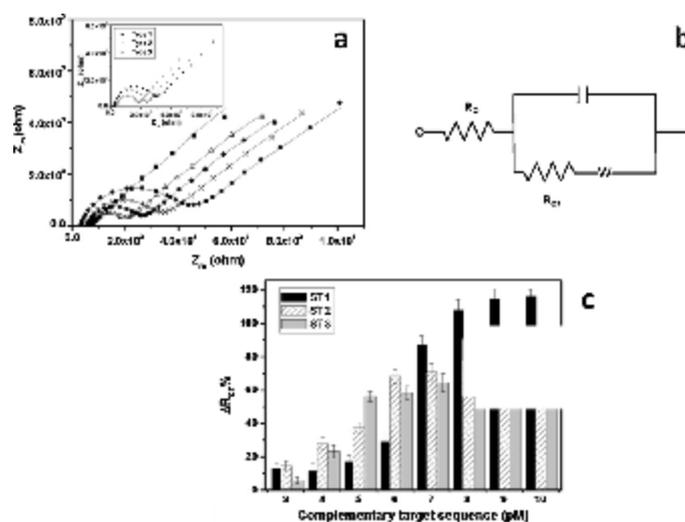


Figure 2 – Nyquist plots of the electrode at different stages: Bare gold electrode (■), AuNpPANI (Δ), AuNpPANI-ST1 (◆), AuNpPANI-ST1-DENcomplementary (●) and AuNpPANI-ST1-DENnon-complementary (×). Supporting electrolyte 10mM $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ 1:1 + 0.15 M NaCl in PBS 10 mM pH 7.4 solution; frequency range at 100mHz to 100 kHz. Inset: Nyquist plots of AuNpPANI-ST(1–3)-DENcomplementary.

Results indicated that the R_{CT} has its value increased to 1.51 kΩ with the further assembly of the AuNpPANI composite. The ST1 immobilization on the AuNpPANI-modified electrode results in an increase of R_{CT} from 1.51 kΩ to 2.12 kΩ (curve c), which could be ascribed to the repulsion of redox probe from the approaching electrode surface by negative-charged phosphate skeletons of ST. After the ST1 probe hybridizes with the DEN1 genome sequence (complementary target), a new increase in the value of R_{CT} to 3.6 kΩ was obtained (curve e), indicating the occurrence of a specific biomolecular interaction. In fact, no similar results were observed for the case of the AuNpPANI-ST-DENnoncomplementary experiments (curve d).

The Randles model (Fig. 3) is used as an equivalent circuit to describe the data of electrochemical impedance measurements; the fitting of the measured spectra is shown in Fig. 4a, where a good agreement can be observed over the entire range of measured frequencies. The general equivalent electric circuit (Randles) includes the ohmic resistance of the electrolyte solution (R_Ω), the Warburg impedance (W) resulting from ion diffusion from the bulk electrolyte to the electrode interface, the double layer (C_{dl}), and the charge-transfer resistance (R_{CT}), which are admitted to exist when the electrolyte solution contains a redox probe. In the AuNpPANI-ST-DEN(1–3) system, R_Ω and W denote, respectively, the bulk properties of the electrolyte solution and the diffusion features of the redox probe in the solution [4].

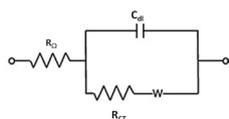


Figure 3 – Equivalent circuit adopted to fit the impedance data.

The best EIS parameters for this system were calculated from the data shown in Fig. 2 and are presented in Table 1. As discussed before, the stepwise increase of the R_{CT} for AuNpPANI, AuNpPANI-ST(1–3) and AuNpPANI-ST(1–3)-DENcomplementary indicate the formation of insulating films of AuNpPANI and DNA on the gold electrode surface. The C_{dl} value largely depends on the dielectric constant of the layer separating the ionic charges and the electrode surface, on the surface area of the electrode, and on the thickness of the separation layer. A large decrease in the C_{dl}

value was observed when the AuNpPANI-TS1 system was introduced with the complementary target. Therefore, we observed that the value of R_{CT} depends on the insulating characteristics of the electrode/electrolyte interface.

Table 1- Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.

Modified electrode	$R_{CT}/k\Omega$	$C_{dl}/\mu F$	$W (\times 10^{-4})$
Bare gold electrode	0.82	10.38	5.36
AuNpPANI	1.50	5.48	3.33
AuNpPANI-ST1	1.92	6.12	3.53
AuNpPANI-ST1-DENcomplementary	3.60	5.30	1.50
AuNpPANI-ST1-DENnon-complementary	2.14	5.51	3.08
AuNpPANI-ST2	1.83	6.73	4.40
AuNpPANI-ST2-DENcomplementary	3.13	5.11	4.25
AuNpPANI-ST2-DENnon-complementary	2.07	6.61	4.36
AuNpPANI-ST3	1.33	5.53	4.28
AuNpPANI-ST3-DENcomplementary	2.19	5.18	4.49
AuNpPANI-ST3-DENnon-complementary	1.50	5.21	4.40

CONCLUSION

EIS and CV measurements showed that redox probe reactions on the modified gold electrodes were partially blocked due the adsorption of AuNpPANI and a progressive blockage was observed at each modification step. The AuNpPANI-ST system exhibited was capable to interact with the complementary target of human patient's dengue genome.

ACKNOWLEDGEMENT: CAPES, FACEPE.

REFERENCES

- [1] GRANT, S., DAVISA, F., LAWA, K.A., BARTONA, A.C., COLLYERA, S.D., HIGSON, S.P.J., GIBSON, T.D., "Label-free and reversible immunosensor based upon an ac impedance interrogation protocol", *Anal. Chim. Acta* 537, 163, 2005.
- [2] FANG, F.F.; CHOI, H. J.; JOO, J., "Conducting Polymer/Clay Nanocomposites and Their Applications", *J. Nanosci. Nanotech.* 8, 1559-1581, 2008.
- [3] DE MELO, C.P., DOS SANTOS, C.G., ANDRADE, C.A.S., "Fluorescent nanoparticle composites themselves, process for the preparation of such composites, and use in rapid diagnosis systems with affinity to biological molecules", Patent PCT/BR2009/000117 (2009).
- [4] NASCIMENTO, H.P.O., OLIVEIRA, M.D.L., DE MELO, C.P., SILVA, G.J.L., CORDEIRO, M.T., ANDRADE, C.A.S., "An impedimetric biosensor for detection of dengue serotype at picomolar concentration based on gold nanoparticles-polyaniline hybrid composites", *Col. Surf. B*, 86, 414, 2011.

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR BIENZIMÁTICO IMOBILIZADO SOBRE MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES EM ALIMENTOS

Andressa Galli¹ e Sergio Antonio Spinola Machado²

¹ Departamento de Química, UEPG - PR - Brasil; ² Instituto de Química de São Carlos - USP, São Carlos - SP - Brasil. andressagalli@gmail.com

RESUMO: Foi desenvolvida uma metodologia para a preparação e aplicação de um biossensor bienzimático confeccionado com as enzimas glicose oxidase e frutose desidrogenase, imobilizadas em camadas auto-organizadas (self-assembled monolayers - SAMs) de cistamina para a quantificação de açúcares em alimentos. Após a modificação do eletrodo de ouro com a SAM de cistamina, biossensores foram construídos e condições foram otimizadas, tais como: concentração do mediador de elétrons tetratiafulvaleno (TTF), porcentagem de glutaraldeído, temperatura e tempo de vida do biossensor. A determinação analítica da D-glicose e da D-frutose foi realizada em eletrólito puro pelo método da adição de padrão e os resultados foram obtidos por cronoamperometria. A corrente de pico de oxidação do TTF aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração e o limite de detecção (LD) obtido foi de $0,26 \text{ mg L}^{-1}$ ($1,44 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). O biossensor foi aplicado em amostras de bebidas dietéticas e não dietéticas, com o propósito de verificar a influência de interferentes e o efeito de matriz.

Palavras-chave: glicose oxidase, frutose desidrogenase, camadas auto-organizadas, biossensor, açúcares.

INTRODUÇÃO

A utilização de biossensores construídos pela imobilização de enzimas em superfícies modificadas com camadas auto-organizadas vem crescendo devido a algumas vantagens relacionadas à melhoria da reprodutibilidade das análises, em função da distribuição mais homogênea da enzima imobilizada na superfície do eletrodo [4]. Além disso, a formação de biossensores em SAMs apresenta propriedades como: estabilidade, ampla faixa de potencial de trabalho e excelente microambiente para atividade biocatalítica das enzimas, pois podem simular membranas biológicas, aproximando o sistema das condições conformacionais ótimas observadas em um ambiente biológico original, permitindo orientar as enzimas sobre a superfície do eletrodo sem desnaturação. Sendo assim, o método de construção de biossensores utilizando SAMs é muito promissor [1] [2] [3].

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação de açúcares em amostras de alimentos utilizando um biossensor bienzimático à base das enzimas glicose oxidase (GOx) e frutose desidrogenase (FDH), construído em SAM de cistamina (CYS).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As medidas de voltametria cíclica e cronoamperometria foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 30 (ECO CHEMIE, Holanda). O eletrodo de trabalho (biossensor) utilizado foi um eletrodo de ouro policristalino ($\Phi = 2,0 \text{ mm}$) embutido em Teflon[®] modificado com a SAM de cistamina, mediador de elétrons tetratiafulvaleno (TTF), enzimas glicose oxidase (GOx) e frutose desidrogenase (FDH) e glutaraldeído (GLU) como agente aglutinante. Como eletrodo referência foi utilizado Ag/AgCl em KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ e como eletrodo auxiliar uma placa de platina com área geométrica de $0,48 \text{ cm}^2$. Como eletrólito suporte foi utilizado tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as otimizações das condições de trabalho, tais como: concentração do mediador de elétrons tetratiafulvaleno (TTF), quantidade das enzimas glicose oxidase (GOx) e frutose desidrogenase (FDH), porcentagem de glutaraldeído (GLU), temperatura, concentração hidrogeniônica e tempo de vida, bem como depois de conhecidos os comportamentos dos biossensores a base de GOx e FDH separadamente, construiu-se a curva analítica para o biossensor Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU por meio da investigação do sinal amperométrico do biossensor com o aumento contínuo da concentração de D-glicose+D-frutose em solução de tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH=6,5.

O potencial de trabalho foi determinado utilizando-se voltametria cíclica, para encontrar o pico de oxidação do mediador de elétrons TTF, que ocorre somente após a adição dos substratos (D-glicose e D-frutose) na célula eletroquímica. O potencial de pico da oxidação do TTF é observado em aproximadamente 200 mV, ou seja, logo após a corrente limite de difusão, garantindo que o máximo de espécies chegue à superfície do eletrodo.

A Figura 1 apresenta o cronoamperograma da determinação simultânea dos carboidratos por meio de adições padrão de uma mistura equimolar de D-glicose e D-frutose, mostrando a dependência da corrente de oxidação do TTF com a adição da solução dos açúcares. Na mesma Figura 1 está inserido o gráfico que mostra a dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF vs a concentração da mistura equimolar de D-glicose+D-frutose. Os limites de detecção ($LD = 3s_b/B$) e quantificação ($LQ = 10s_b/B$) obtidos foram de $0,26 \text{ mg L}^{-1}$ ($1,44 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e $0,91 \text{ mg L}^{-1}$ ($5,05 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), respectivamente.

A potencialidade da metodologia foi, então, testada realizando-se medidas de recuperação em amostras de refrigerantes e adoçantes obtidas no comércio local.

A determinação dos açúcares D-glicose e D-frutose, presentes em grande quantidade em alimentos, como refrigerantes, foi realizada utilizando o biossensor bienzimático Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU em refrigerantes à base de cola não dietéticos, light e dietéticos. Para este estudo foi adicionado à cela eletroquímica uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ de cada amostra em $10,0 \text{ mL}$ de tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH}=6,5$ e por meio de adição de padrão de mistura equimolar de D-glicose+D-frutose foram construídas curvas analíticas, onde foram obtidos valores referentes a menor quantidade detectada dos açúcares, por meio da equação $LD = 3s_b/B$. Estes resultados são apresentados na Figura 2, onde observa-se que os amperogramas para as amostras dos refrigerantes dietético e light apresentaram a mesma magnitude nos valores de corrente, indicando a ausência dos açúcares. Este fato pode ser relacionado com os rótulos dos produtos, os quais indicam que estes alimentos não contêm quantidades significantes de carboidratos. Entretanto, se houver uma quantidade mínima de D-glicose e D-frutose na amostra de refrigerante light, esta diferença de conteúdo em relação à dietética, está abaixo do limite de detecção da técnica.

Já o cronoamperograma para a amostra de refrigerante não dietético (Figura 2), observa-se que existe uma elevada magnitude de corrente durante a medida do branco (sem adição de D-glicose), indicando a presença de D-glicose em uma quantidade significativa, o que demonstra a boa funcionalidade do biossensor.

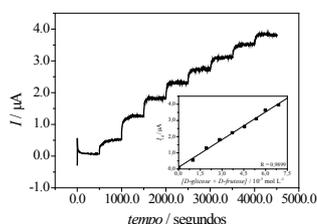


Figura 1. Cronoamperograma obtido para a adição de padrão de D-glicose e D-frutose em meio de solução tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH}=6,5$. Faixa de concentração da mistura equimolar de D-glicose+D-frutose: $0,98 \times 10^{-3}$ a $6,89 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. E aplicado: $0,200 \text{ V vs Ag/AgCl}$. $T=35^\circ\text{C}$. *Inserido:* Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração da mistura D-glicose+D-frutose. Faixa linear de concentração: $0,98 \times 10^{-3}$ a $4,54 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

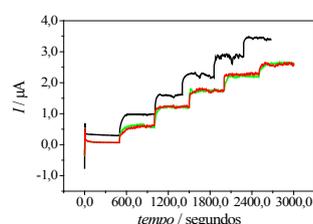


Figura 2. Cronoamperogramas obtidos para a adição de padrão usada na determinação de D-glicose e D-frutose em meio de solução tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH}=6,5$, na presença de refrigerante à base de cola onde: refrigerante não dietético (—); refrigerante light (—) e refrigerante dietético (—). Faixa de concentração de D-glicose+D-frutose: $0,98 \times 10^{-3}$ a $4,54 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. E aplicado: $0,200 \text{ V vs Ag/AgCl}$. $T=35^\circ\text{C}$.

A dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF em função da adição de D-glicose+D-frutose para as amostras de refrigerante dietético e light, está apresentada nas Figuras 3 e 4, respectivamente. A menor quantidade de açúcares detectada para o refrigerante dietético foi de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ ($1,38 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e para o refrigerante light foi de $0,24 \text{ mg L}^{-1}$ ($1,33 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Estes resultados comparados ao LD obtido na curva analítica em eletrólito puro indicam que praticamente não há efeito de matriz.

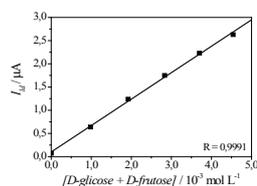


Figura 3. Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-glicose+D-frutose para a amostra de refrigerante à base de cola dietético. Faixa linear de concentração de D-glicose+D-frutose: $0,98 \times 10^{-3}$ a $4,54 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

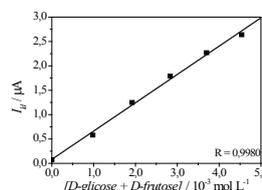


Figura 4. Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-glicose+D-frutose para a amostra de refrigerante à base de cola light. Faixa linear de concentração de D-glicose+D-frutose: $0,98 \times 10^{-3}$ a $4,54 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Para a amostra de refrigerante à base de cola não dietético obteve-se um valor inicial de D-glicose+D-frutose de $17,9 \text{ mg L}^{-1}$ ($9,95 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) de acordo com a Figura 5.

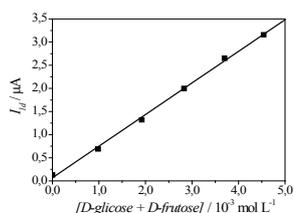


Figura 5. Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-glicose+D-frutose para amostra de refrigerante não dietético.

O efeito de interferentes foi investigado para alguns ácidos orgânicos. Primeiramente, foi adicionada uma alíquota da mistura equimolar de D-glicose e D-frutose até estabilização da corrente e, por conseguinte, foram adicionados separadamente cada um dos possíveis interferentes e finalmente mais uma alíquota da mistura equimolar de D-glicose e D-frutose. Não foi observado respostas de corrente para os compostos verificados, como mostrado na Figura 6.

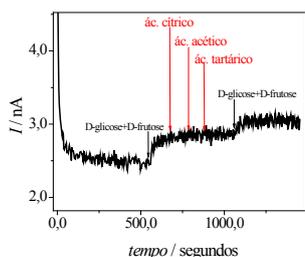
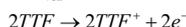
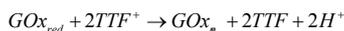
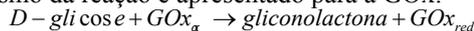


Figura 6. Cronoamperograma obtido do biossensor bienzimático para adições da mistura equimolar de D-glicose+D-frutose com concentração de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de possíveis interferentes orgânicos na concentração de $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH=6,5. E aplicado: $0,200 \text{ V vs Ag/AgCl}$. $T=35^\circ\text{C}$

A dopagem do eletrodo com mediador de elétrons aumentou a seletividade do biossensor, uma vez que a presença do mediador possibilita um potencial de trabalho em uma região mais próxima de zero volts, ou seja, mais imune a interferências de outras espécies eletroativas, minimizando o efeito de interferentes e evitando a desnaturação da enzima. Um exemplo do mecanismo da reação é apresentado para a GOx:



CONCLUSÕES

O dispositivo estudado promoveu resultados consideráveis em termos dos valores das menores quantidades detectáveis dos açúcares em estudo, constituindo uma vantagem característica do sistema desenvolvido neste estudo, bem como uma contribuição importante na área da eletroanálise. Adicionalmente, o biossensor bienzimático apresentou resposta rápida com fácil aplicabilidade e baixo custo, além da eliminação do efeito de matriz.

AGRADECIMENTOS: FAPESP (processo nº 05/00294-8), CAPES – PNPd/2010.

REFERÊNCIAS

- [1] FERRETTI S., PAYNTER S., RUSSEL, D.A., SAPSFORD, K.E. and RICHARDSON, D.J., “Self-assembled monolayers: A versatile tool for the formulation of bio- surfaces”, *Trends Anal. Chem.*19(9): 530-540, 2000.
- [2] MANDLER D. and TURYAN I., “Applications of self-assembled monolayers in electroanalytical chemistry”, *Electroanalysis*8(3): 207-213, 1996.
- [3] ULMAN A., “Formation and structure of self-assembled monolayers”, *Chem. Rev.*96:1533-1554, 1996.
- [4] FREIRE R.S., PESSOA C.A. and KUBOTAL T., “Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos”, *Quim. Nova*26(3):381-389, 2003.

BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO A BASE DE DNA SOBRE NANOTUBO DE CARBONO PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACO PSICOTRÓPICO (ANTIPSIKÓTICO E ANTIDEPRESSIVO)

João Paulo Marco, Arnaldo César Pereira

DCNAT/Universidade Federal de São João Del Rei, São João del Rei – MG

j_p_marco@yahoo.com.br

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de biossensor a base DNA imobilizado sobre a superfície de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) para a detecção do fármaco psicotrópico da classe dos azepínicos: amitriptilina. Investigou-se as variáveis que exercem influência no desempenho deste, tais como: o pH de trabalho, além da composição e concentração da solução tampão empregada como eletrólito suporte. A resposta amperométrica para o analito usando o biossensor proposto apresentou intervalo de resposta linear (0,25 a 1,4 mmol L⁻¹), boa sensibilidade (232,19 µA/ mmol L⁻¹), limites de detecção e de quantificação de 0,13 mmol.L⁻¹ e 0,42 mmol.L⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: Biossensor, nanotubos de carbono, DNA, psicotrópico

INTRODUÇÃO

Na área dos fármacos há uma grande necessidade por novas técnicas que possam ampliar e melhorar os estudos relacionados às interações entre gene, proteínas, ácidos nucleicos e fármacos alvo, buscando: acelerar a descoberta de novos remédios, aperfeiçoamentos dos fármacos já existentes e diminuição do tempo de regulamentação exigido para que um fármaco possa ser administrado com segurança em seres humanos.

Com relação aos agentes psicotrópicos o grande interesse por estudos nesta área deve-se ao baixo conhecimento do mecanismo de ação relacionados aos distúrbios psíquicos bem como da atuação dos fármacos disponíveis atualmente, os quais não são curativos mas apenas aliviam os sintomas através de mecanismos ainda não elucidados [1].

Neste sentido, os biossensores possibilitam o estudo destes fármacos devido às suas características operacionais [2,3] que estão relacionadas fundamentalmente com sua estrutura que utiliza um elemento de reconhecimento de origem biológico (receptor bioquímico), o qual está em contato espacial direto com um elemento de transdução.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

REAGENTES

Nanotubo de Carbono Multi Paredes (MWCNT) foi obtido pela CNT Corporation Ltd, Incheon, Coréia, com diâmetro de 10-40nm e comprimento de 5-20µm; DNA de esperma de arenque foi obtido pela Sigma. Os demais reagentes (ácidos e bases utilizados para ajuste de pH nas soluções) foram de grau analítico. Todas as medidas foram realizadas sob atmosfera de gás nitrogênio e com água deionizada.

MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

As medidas eletroquímicas foram realizadas num potenciostato modelo PGSTAT12 da Ecochemie com o emprego de uma célula eletroquímica de 3 eletrodos. O eletrodo saturado de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) foi empregado como referência, e uma espiral de platina como o eletrodo auxiliar.

O eletrodo de trabalho utilizado foi construído no próprio laboratório. Este dispositivo é basicamente um tubo de vidro de 15 cm de comprimento contendo uma cavidade inferior com 4 mm de diâmetro interno e 1 mm de profundidade. Para a imobilização do DNA na superfície da matriz de MWCNT 100 mg de nanotubo de carbono foram adicionados em 20 mL de uma solução de 0,5 mg / mL de DNA em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH=7, permanecendo sob agitação mecânica durante 3 horas. Logo após, realizou-se a filtração deste material e posteriormente, este era seco por 12 h em temperatura ambiente. Após o processo de secagem preparou-se o eletrodo de trabalho, o qual é constituído de uma pasta deste material utilizando 90 µL de óleo mineral misturando bem até a sua completa homogeneização. Esta pasta foi introduzida na cavidade inferior do tubo de vidro descrito acima, obtendo o eletrodo de pasta de nanotubo de carbono modificado com DNA, a qual foi denominada de MWCNT-DNA.

De modo a avaliar o melhor desempenho obtido com o emprego de MWCNT-DNA na preparação do biossensor, uma pasta contendo apenas MWCNT como material carbonáceo foi preparada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi verificado através de análises voltamétricas o monitoramento do fármaco amitriptilina na concentração de 2 mmol L⁻¹ utilizando eletrodos de trabalho de MWCNT e MWCNT-DNA, conforme a Figura1:

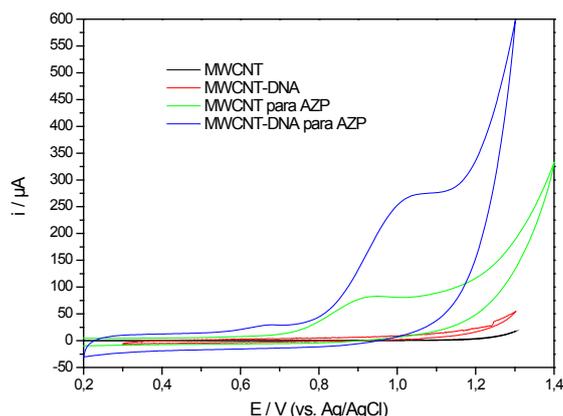


Figura 1 – Voltamogramas cíclicos de amitriptilina (AZP) livre em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹, pH=7 utilizando eletrodo de MWCNT e MWCNT-DNA com velocidade de varredura de 10 mV.

Nos voltamogramas cíclicos pode-se identificar um pico referente a oxidação do fármaco amitriptilina em potencial de 0,94V com eletrodo de trabalho de MWCNT. Com a utilização do eletrodo MWCNT-DNA foi verificado um aumento da corrente de pico anódica do fármaco, que pode ser atribuído ao material biológico imobilizado na matriz carbonácea melhorando, desta forma, a sensibilidade do eletrodo empregado para este analito.

Outro importante aspecto estudado, empregando o biossensor proposto e o analito de interesse (amitriptilina) preparada em meio de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 na concentração de 2,00 x10⁻³ mol L⁻¹, foi a relação entre a corrente de pico anódica e a velocidade de varredura a qual foi variada no intervalo de de 5-100 mV s⁻¹. O comportamento apresentado é similar a processos controlados por difusão, conforme a Figura 2, uma vez que é possível observar uma correlação linear entre a intensidade corrente anódica e a raiz quadrada da velocidade de varredura.

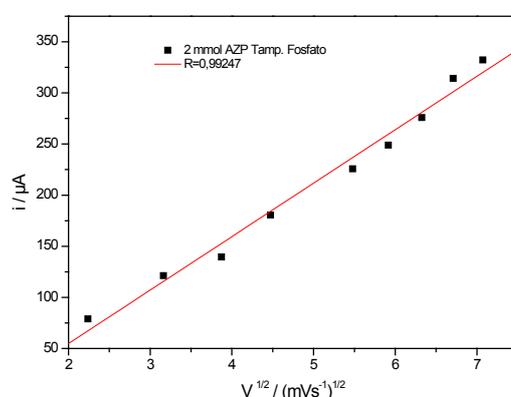


Figura 2 – Dependência da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade obtida para Amitriptilina. Experimento realizado em solução tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹, pH=7.

Em seguida, foram realizados estudos para as variáveis que exercem influência no desempenho do biossensor a fim de melhorar o sinal eletroquímico do eletrodo de trabalho e, para isso, foram levados em consideração fatores como o pH (entre 5 a 8,5), a composição da solução tampão (Tris, Fosfato, Pipes, Acetato e Hepes) e a concentração do tampão (variando 0,1 a 0,3 mol.L⁻¹), além da velocidade de varredura empregada (5 a 100 mVs⁻¹), com os melhores valores encontrados apresentados na Tabela 1:

Tabela 1 – Variáveis Operacionais que exercem influência no desempenho do biossensor (MWCNT-DNA) na determinação de Amitriptilina

Veloc. de varredura	Tampão	Conc. Tampão	pH
50 mV s ⁻¹	Fosfato	0,2 mol.L ⁻¹	7,5

Após a otimização de alguns parâmetros operacionais, empregou-se o eletrodo de trabalho (MWCNT-DNA) a fim de determinar a faixa linear de resposta, a sensibilidade e os limite de detecção e de quantificação do biossensor proposto. As Figuras 3A e 3B, ilustram os voltamogramas cíclicos obtidos com o biossensor proposto na presença de amitriptilina no intervalo de concentração $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ empregando velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} e a correlação linear entre a corrente de pico anódica obtida e a concentração do analito estudado, respectivamente.

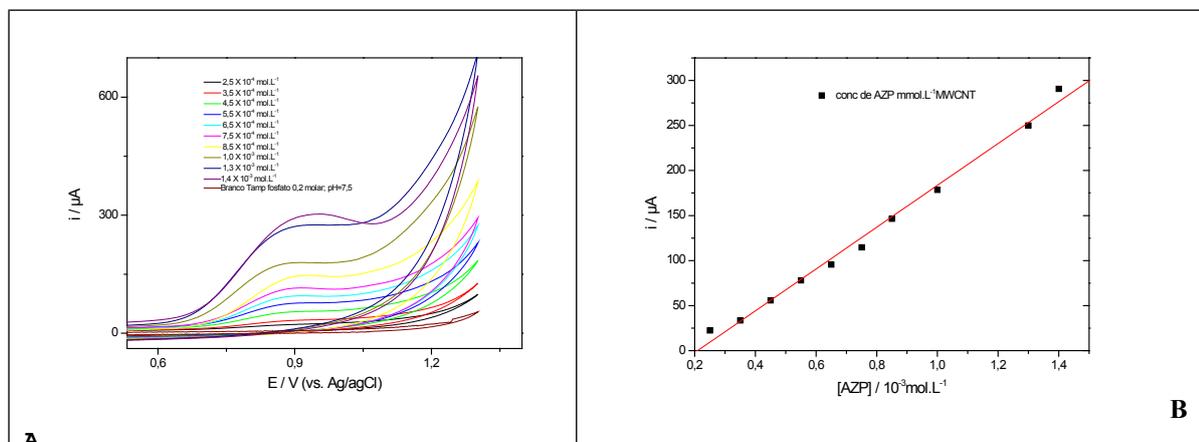


Figura 3 A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o biossensor MWCNT-DNA na presença de amitriptilina, empregando $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e **B) Curva analítica** obtida com o biossensor MWCNT-DNA para o fármaco amitriptilina.

Através da Figura 3B, foi possível determinar que o biossensor proposto apresentou uma faixa linear de resposta para amitriptilina de 0,25 a $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ expressada através da equação: $i(\mu\text{A}) = -48,66 + 232,19 [\text{amitriptilina}] (\text{mmol L}^{-1})$, a qual indica uma sensibilidade de $232,19 \mu\text{A} / \text{mmol L}^{-1}$, bastante superior à apresentada em um trabalho reportado na literatura [4], o que sugere a viabilidade da utilização do dispositivo desenvolvido como suporte para a detecção de amitriptilina de forma muito simples. O limite de detecção, calculado como $(3\sigma_p/S)$ foi de $0,13 \text{ mmol L}^{-1}$ e limite de quantificação de $0,42 \text{ mmol L}^{-1}$.

CONCLUSÕES

Através do desenvolvimento deste trabalho foi possível obter um biossensor a base de DNA utilizando matriz de nanotubo de carbono (MWCNT-DNA) para o monitoramento do fármaco psicotrópico amitriptilina. Uma boa sensibilidade, $232,19 \mu\text{A} / \text{mmol L}^{-1}$, para a detecção do fármaco foi observada e pode ser atribuída a amplificação de sinal promovida pela eficiente imobilização do DNA na matrix de MWCNT. O biossensor desenvolvido (MWCNT-DNA) apresentou intervalo de resposta linear ($0,25$ a $1,40 \text{ mmol L}^{-1}$) com sensibilidade muito boa comparado a trabalho da literatura [3], indicando viabilidade do dispositivo proposto na determinação da amitriptilina.

AGRADECIMENTOS: CAPES, FAPEMIG, CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] Romeiro, L.A.S., Fraga, C.A.M., Barreiro, E.J., “Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da depressão: Uma visão da química medicinal”, *Quim. Nova*, 26, (3): 347-358, 2003.
- [2] Niu, S., Han, B., Cao, W. and Zhang, S., “Sensitive DNA biosensor improved by Luteolin copper(II) as indicator based on silver nanoparticles and carbon nanotubes modified electrode”, *Anal. Chim. Acta* (651):42-47, 2009.
- [3] Wei, X., Hao, Q., Zhou, Q., Wu, J., Lu, L., Wang, X. and Yang, X., “Interaction between promethazine hydrochloride and DNA and its application in electrochemical detection of DNA hybridization”, *Electrochimica Acta* (53):7338-7343, 2008.

SENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETECÇÕES DE DOENÇAS INFECCIOSAS, UTILIZANDO SONDAS DE DNA SOBRE MATRIZ POLIMÉRICA DE POLI(3-AMINOFENOL)

Luciano Pereira Rodrigues¹, Diego Leoni Franco¹,
Ana Graci Brito-Madurro², João Marcos Madurro¹

¹ Instituto de Química - UFU, Uberlândia - MG – Brasil; ² Instituto de Genética e Bioquímica – UFU, Uberlândia – MG – Brasil. jmadurro@ufu.br

RESUMO: O cenário atual na detecção de doenças infecciosas requer novas plataformas capazes de identificá-las nos estágios iniciais de infecção. Matriz de poli(3-aminofenol) apresenta boa estabilidade térmica e eletroquímica com tempo de armazenamento e funcionalizações que permitem interações com grupos fosfato do DNA. Sondas e alvos foram obtidos de genes específicos para câncer de próstata e Hepatite C. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica foi utilizada para avaliação do aumento de resistência em solução contendo um mediador redox e Voltametria de Pulso Diferencial avaliou o aumento na resposta de corrente de oxidação de brometo de etídio. As imobilizações das sondas e detecções dos alvos foram possíveis e otimizações dos sistemas permitiram obter os melhores resultados aliados aos baixos valores de limite de detecção. O trabalho mostrou a possibilidade de utilização do sistema para construção destes genossensores além da versatilidade da matriz para a detecção de outras doenças baseadas em DNA.

Palavras-chave: Poli(3-aminofenol), DNA, biossensor, câncer de próstata, Hepatite C

INTRODUÇÃO

Os dados mais recentes mostram o número de casos no Brasil de câncer de próstata de cerca de 52.350 para o ano de 2010 [1] e de 9.794 casos de Hepatite C para o ano de 2009 [2]. Em ambos os casos, os números não refletem a realidade, visto que as doenças são assintomáticas nos estágios iniciais, e uma grande parcela da população pode estar infectada e não ter conhecimento. O tumor da próstata é detectado exclusivamente pelo exame de toque retal e do antígeno prostático específico (PSA), enquanto que para a Hepatite C, são normalmente utilizados exames sorológicos como ELISA ou RIBA, utilizando antígenos para detecção de anticorpos anti-HCV. Embora eficientes, estes exames não permitem a detecção em estágios iniciais das doenças, são testes com alta demanda de tempo, custo, mão-de-obra especializada além da presença de falso-positivos nas análises [3,4]. Biossensores eletroquímicos apresentam uma solução para o diagnóstico dessas doenças, pela simplicidade do sistema construído com alto nível de especificidade, baixos limites de detecção e de fácil manuseio, podendo ser comercializado como materiais descartáveis de baixo custo [5].

Biossensores de DNA ou genossensores utilizam oligonucleotídeos, produtos de PCR ou DNA nativo como sondas e alvos complementares na sua construção. Embora PSA e peptídeos sintéticos sejam importantes para detecção de câncer de próstata e Hepatite C, respectivamente, outros marcadores estão sendo estudados que envolvem os genes do câncer expressados diferencialmente e do RNA do vírus da Hepatite C [4,6]. Os testes baseados em DNA podem ser realizados em menor tempo, pois já estão presentes no sistema nos estágios iniciais da doença, enquanto que os ensaios imunológicos necessitam de um tempo mínimo para que o corpo desenvolva ou aumente a concentração de anticorpos para combater a doença.

Biossensores eletroquímicos utilizando matrizes poliméricas podem auxiliar na imobilização das sondas biológicas devido à presença de funcionalizações nas superfícies dos eletrodos que permitem uma interação mais específica entre transdutor e camada de reconhecimento [7]. Além disso, outra vantagem de polímeros é a condutividade intrínseca. Polímeros condutores podem aumentar o sinal de detecção [8] como também impedir a adsorção de analitos não-específicos [9].

O polímero derivado de 3-aminofenol já foi formado sobre eletrodos de carbono grafite [10,11]. A possibilidade de presença de grupos funcionais na estrutura foi avaliada [12]. O estudo sugere a formação de um material funcionalizado com estrutura apresentando “*pinholes*”, o que é de interesse para o sistema, visto que pode acomodar mais facilmente a biomolécula de DNA. Assim, o poli(3-aminofenol) foi classificado como um bom candidato como matriz para construção de biossensores de DNA.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a estabilidade do polímero derivado de 3-aminofenol sobre a superfície de grafite e utilizá-lo na construção de genossensores para detecção de câncer de próstata e Hepatite C, utilizando produtos de PCR de regiões conservadas de DNA/RNA.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todas as vidrarias utilizadas foram deixadas em banho de ácido nítrico P.A por 24 horas. A lavagem das vidrarias e o preparo das soluções foram realizadas com água deionizada 18,18 M Ω de um Mili-Q da Gehaka. Os eletrodos de trabalho foram de carbono grafite (ECG) e como auxiliar e referência foram utilizados eletrodos de platina e de Ag/AgCl, KCl (3,0 mol L⁻¹). Os sistemas foram conectados a um potenciostato da CH Instruments modelo 420A. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) foi realizada em um Autolab PGSTAT 302N com módulo FRA-2 da Eco Chimie BV. Os produtos de PCR de câncer de próstata (277 pares de base) e de Hepatite C (257 pares de base) foram dosados em um espectrofotômetro UV-visível da Shimadzu modelo 1650PC. A concentração foi estimada em gel de agarose 0,8 % de acordo com Sambrook *et al* [13].

Voltamogramas cíclicos (VC) obtidos dos eletrodos modificados com o polímero em solução contendo ácido perclórico (0,5 mol L⁻¹) foram realizados para se obter respostas da estabilidade térmica e de tempo de vida do material. Os produtos de PCR foram diluídos em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4) e desnaturados termicamente (5 minutos a 98 °C) para formação das sondas e alvos (simples fitas do DNA). As sondas foram imobilizadas sobre a superfície dos eletrodos por adsorção física (100 ng, 3 minutos à 98 °C). Os alvos complementares foram imobilizados em sequência (100 ng, 15 minutos à 42 °C). Brometo de etídio, quando usado, foi imobilizado a seguir (0,54 mmol L⁻¹, 5 minutos, temperatura ambiente). Após cada etapa de imobilização, os sistemas foram lavados em tampão fosfato. Os experimentos de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) foram realizados na faixa de oxidação do brometo de etídio (+0,3 à +0,7 V) à 20 mV s⁻¹. Os espectros de EIE foram realizados em solução de ferrocianeto de potássio (5 mmol L⁻¹), ferricianeto de potássio (5 mmol L⁻¹) e cloreto de potássio (0,1 mol L⁻¹), e registrados em faixa de frequência variando de 100 KHz à 10 mHz, amplitude de 10 mV e potencial de +0,24 V.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O polímero poli(3-aminofenol) (P3AF) foi produzido de acordo com o trabalho prévio [10]. Após formação, sua resposta eletroquímica foi avaliada em solução contendo apenas ácido perclórico. Estudos de tempo de vida foram realizados deixando-os armazenados à -12 °C por 90 dias. Estudos de estabilidade térmica foram realizados deixando-os em estufa a 98 °C por 2 horas. Observou-se, após esse estudo, que não houve mudança significativa na estrutura e atividade do polímero através de medidas comparativas em ácido perclórico. O material reteve cerca de 88 e 78 % de sua atividade inicial nos experimentos de tempo de vida e estabilidade térmica, respectivamente. Dessa maneira, o polímero pode ser usado para esse trabalho visto que os resultados de tempo de vida do genossensor e a necessidade de suportar temperatura alta para imobilização das sondas de DNA foram satisfatórios.

EIE utilizando apenas os sistemas sonda e sonda/alvo (Figura 1A e Figura 1B) e VPD utilizando sonda/BE e sonda/alvo/BE (Figura 1C e Figura 1D) permitiram observar diferenças significantes pelos diagramas de Nyquist observando-se um maior semicírculo para o sistema contendo apenas o polímero, como já esperado [11]. Com a imobilização da sonda e do alvo, houve um decréscimo e um acréscimo, respectivamente, no tamanho dos semicírculos que refletem diretamente nas resistências à transferência de carga do material com a solução. De fato, os valores de R_{tc} obtidos utilizando circuito equivalente $R_s[(R_{tc,1} Q_{dl,1})(R_{tc,2} Q_{dl,2})]$ são de 5,51 e 5,79 k Ω para as sondas e 8.17 e 8.51 k Ω para sondas/alvo do câncer de próstata e Hepatite C, respectivamente. Do polímero foi de 25,91 k Ω . O decréscimo inicial pode ser explicado pela interação do eletrodo com a sonda, via grupos fosfato que estariam voltados diretamente para as funcionalidades do polímero, diminuindo a resistência com o par redox aniônico, devido ao aumento de transferência de carga proporcionado pela região condutora da simples fita de DNA. Consequentemente, o aumento da resistência com a imobilização do alvo seria pelo fato da hibridização ocorrer deixando os grupos fosfato direcionados para fora do eletrodo, em direção à solução. Como ambos, grupos fosfatos e par redox, são carregados negativamente, ocorre uma repulsão e a resistência aumenta novamente. Isso significa que a EIE, além de permitir observar que a imobilização da sonda foi efetiva e de mostrar diferenças na detecção, sugere o modo em que ambas estão interagindo com a matriz polimérica.

VPD mostram o aumento da resposta de oxidação do BE nos sistemas contendo sonda/alvo. Isso era esperado visto que o BE é considerado um intercalador de DNA, o que significa que sua interação com o DNA nativo é muito maior do que com DNA desnaturado (nesse caso, sistemas contendo apenas as sondas). Nas etapas de lavagem, BE intercalado não será eliminado nos sistemas, proporcionando uma maior concentração na superfície do eletrodo e, consequentemente, maior valor de corrente de oxidação. Após otimização do sistema, a melhor concentração de BE foi de 0,54 mmol L⁻¹ e o melhor tempo de hibridização foi de 15 minutos. Estudos de interferentes foram realizados com alvos não complementares e os resultados foram muito semelhantes aos resultados obtidos contendo apenas as sondas. Os limites de detecção foram de 16 e 19 ng e de quantificação de 54 e 64 ng para o genossensor para câncer de próstata e de hepatite C, respectivamente. O tempo de vida dos sensores foi avaliado em dois meses nas mesmas condições de armazenamento dos eletrodos modificados com o polímero.

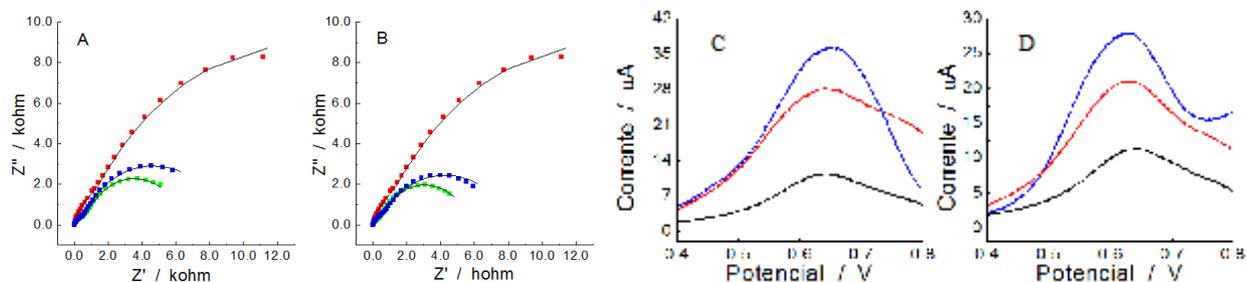


Figura 1: Diagramas de Nyquist realizados em (A) eletrodos de grafite modificados com P3AF (□), sonda de câncer de próstata (□) e sonda/alvo de câncer de próstata (□) e (B) eletrodos de grafite modificados com P3AF (□), sonda de Hepatite C (□) e sonda/alvo de Hepatite C (□) em $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ K}_3\text{Fe}[\text{CN}]_6/\text{K}_4\text{Fe}[\text{CN}]_6$ contendo $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Potencial aplicado de $+0,24 \text{ V}$, amplitude 10 mV . As linhas são referentes aos ajustes realizados às curvas experimentais. VPD usando BE como intercalador em tampão fosfato em eletrodos modificados com P3AF (–), contendo apenas as sondas (–) e contendo as sondas e os alvos complementares hibridizado à 42°C por 15 minutos (–) para (C) produto de PCR de câncer de próstata e (D) produto de PCR da Hepatite C, concentração de BE = $0,54 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $v = 20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, amplitude = 25 mV , tempo do pulso = 60 ms . Concentração de sondas e alvos = 100 ng .

CONCLUSÕES

Foi possível a construção de genossensores para detecção de câncer de próstata e hepatite C sobre poli(3-aminofenol). O polímero apresenta-se estável sob condições de alta temperatura de tempo de armazenamento. As imobilizações puderam ser confirmadas através de EIE e VPD. O sistema de detecção permite diferenciar alvos positivos e negativos além de um baixo limite de detecção e quantificação, mostrando ser um sistema simples e versátil, pois a mesma matriz pode ser utilizada na construção de outros dispositivos genossensores semelhantes.

AGRADECIMENTOS: FAPEMIG, CAPES, CNPq e PROPP/UFU.

REFERÊNCIAS

- [1] Instituto Nacional do Câncer (INCA), www.inca.gov.br, acessado em 28/05/2011.
- [2] Ministério da Saúde do Brasil, <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm>, acessado em 28/05/2011.
- [3] Thompson I.D., Pauler D.K., Goodman P.J., Tangen C.M., Lucia M.S., Parnes H.K., Minasian L.M., Ford L.G., Lippman S.M., Crawford E.D., Crowley J.J., Coltman C.A. "Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level $\leq 4.0 \text{ ng per Milliliter}$ ", *N Engl J Med.* 350(22):2239-2246, 2004.
- [4] Brandão A.B.M., Fuchs S.C.; Silva M.A.A., Emer L.F. "Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura", *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.* 9(3):161-168, 2001.
- [5] Wang J. "Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics", *Anal. Chim. Acta.* 21(10):1887-1892, 2006.
- [6] Schalken J.A., Hessels D., Verhaegh G. "New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 ($DD3^{PC43}$), a highly prostate cancer-specific gene", *Urol.* 62(5):34-43, 2003.
- [7] Nambiar S., Yeow J.T.W. "Conductive polymer-based sensors for biomedical applications", *Biosens. Bioelect.* 26(5):1825-1832, 2011.
- [8] Li C., Bai H., Shi G. "Conducting polymer nanomaterials: electrosynthesis and applications", *Chem. Soc. Rev.* 38(8):2149-2496, 2009.
- [9] Yuqing M., Jianrong C., Xiaohua W. "Using electropolymerized non-conducting polymers to develop enzyme amperometric biosensors" *TRENDS in Biotechnology.* 22(5):227-231, 2004.
- [10] Franco D.L., Afonso A.S., Vieira S.N., Ferreira L.F., Gonçalves R.A., Brito-Madurro A.G., Madurro J.M. "Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties", *Mat. Chem Phys.* 107(2-3):404-409, 2008.
- [11] Franco D.L., Afonso A.S., Ferreira L.F., Gonçalves R.A., Boodts J.F.C., Brito-Madurro A.G., Madurro J.M. "Electrodes Modified With Polyaminophenols: Immobilization of Purines and Pyrimidines", *Pol. Eng. Sci.* 48(10):2043-2050, 2008.
- [12] Sankarapavinasam S. "Permeability and electrocatalytic properties of film prepared by electropolymerization of *m*-aminophenol", *Synth. Met.* 58(2):173-185, 1993.
- [13] Sambrook J.; Fritsch E.F.; Maniatis T, In: *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd Ed.), vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO SOBRE ELETRODO DE GRAFITE PIROLÍTICO MODIFICADO COM CoPc

Ana Paula Mota Ferreira (PG)¹, Ana Caroline F. Santos (IC)¹, Glaucia Tinoco Corrêa (IC)¹, Sônia Maria Carvalho Neiva Tanaka (PQ)¹, Lauro Tatsuo Kubota (PQ)^{2,3}, Auro Atsushi Tanaka (PQ)^{1,3}

¹Departamento de Química, CCET – UFMA, São Luís (MA) - Brasil; ²Instituto de Química, UNICAMP, Campinas (SP) - Brasil; ³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, Campinas (SP) - Brazil. tanaka@ufma.br

RESUMO: Este trabalho apresenta estudos da oxidação do ácido α -lipoico sobre um eletrodo de grafite pirolítico modificado com ftalocianina de cobalto e da otimização das condições experimentais para a sua determinação com as técnicas de voltametria e de cronoamperometria. Análises das curvas analíticas construídas a partir de medidas registradas sob condições experimentais otimizadas para diferentes adições de ácido lipoico no eletrólito resultaram em limites de detecção da ordem de $8,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e de $9,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e limites de quantificação de $2,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e de $3,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, para as técnicas de voltametria e de cronoamperometria, respectivamente.

Palavras-chave: ácido lipoico, eletrodo modificado, ftalocianina de cobalto.

INTRODUÇÃO

O ácido α -lipoico (ácido 1,2-ditiolano-3-pentanoico), também conhecido como ácido tioico, é um antioxidante que possui a capacidade de reprimir radicais livres tanto em meio lipídico quanto aquoso, o que o diferencia dos demais antioxidantes [1]. A capacidade antioxidante do ácido lipoico está localizada no grupamento tiol, que reage diretamente com os radicais oxidantes e pode ser de valor terapêutico em patologias relacionadas à superprodução de radicais livres.

Entre as técnicas empregadas para a determinação do ácido lipoico, podemos destacar a cromatografia líquida de alta eficiência [2] e a eletroforese capilar [3]. Todavia, um número crescente de estudos vem mostrando a necessidade de um procedimento rápido para a avaliação do teor de ácido lipoico e neste sentido técnicas eletroquímicas podem ser empregadas [4,5]. Assim sendo, este trabalho apresenta estudos da oxidação do ácido lipoico (HLip) em soluções aquosas sobre um eletrodo de grafite pirolítico modificado com ftalocianina de cobalto e da otimização das condições experimentais para a sua determinação com as técnicas de voltametria cíclica e cronoamperometria.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula eletroquímica confeccionada em vidro e utilizando platina e calomelano saturado (ECS) como eletrodos auxiliar e de referência, respectivamente, e um grafite pirolítico (GP) como eletrodo base de trabalho.

A superfície do eletrodo GP foi inicialmente submetida a polimentos manuais com lixa de granulometria 2000 e em suspensão aquosa de alumina 0,3 μm . Entre as etapas do polimento e antes da imersão na célula eletroquímica, o eletrodo era lavado com água purificada e, posteriormente, sonificado em água, por 3 minutos, para a remoção de possíveis impurezas impregnadas na superfície do eletrodo.

A modificação da superfície do eletrodo GP com a ftalocianina de cobalto (CoPc) foi realizada pelo método de adsorção irreversível, por meio da imersão do eletrodo GP durante 20 minutos em uma solução $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CoPc em dimetilsulfóxido (DMSO) sob agitação; valores estes estabelecidos após análises dos resultados dos seguintes experimentos: 1) dependência da corrente pico de oxidação do HLip em função do tempo de imersão e 2) dependência da corrente de pico em função da concentração de CoPc em DMSO, para um tempo de imersão de 20 minutos.

As medidas eletroquímicas foram realizadas com o auxílio de um potenciostato $\mu\text{Autolab-2}$ da EcoChemie acoplado a um microcomputador por meio de uma interface GPES.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Voltamogramas cíclicos registrados, a uma velocidade de varredura do potencial de 50 mV s^{-1} , com o eletrodo de grafite pirolítico (GP) em uma solução tampão fosfato (pH 7) na ausência (Fig. 1a) e na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de HLip (Fig. 1b) mostraram que a oxidação do HLip inicia-se em potenciais próximos a 0,65 V vs. ECS e que a corrente atinge um máximo (corrente de pico, I_p) em torno de 0,8 V (potencial de pico, E_p). Experimentos similares realizados com o eletrodo GP modificado com ftalocianina de cobalto (GP/CoPc) mostraram um deslocamento do início da oxidação do HLip para potenciais, cerca de 100 mV menos positivo, com aumento significativo em I_p (Fig. 1c). Estes

resultados indicaram que a modificação do eletrodo GP com CoPc resultou num aumento na atividade eletrocatalítica para a oxidação de HLip em soluções aquosas.

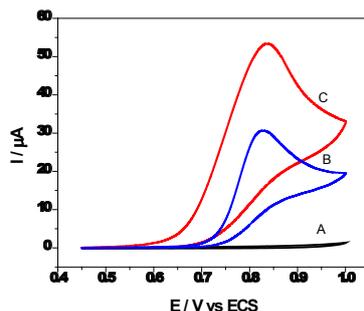
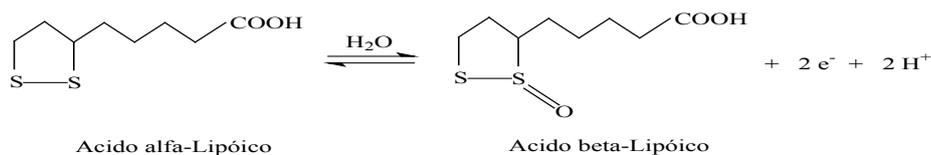


Figura 1. Voltamogramas cíclicos do eletrodo GP na ausência (a) e dos eletrodos GP (b) e GP/CoPc (c) na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de HLip em uma solução tampão fosfato (pH 7) saturada com N_2 . $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Análise dos voltamogramas cíclicos registrados a diferentes velocidades de varredura do potencial (v) no intervalo de 10 a 200 mV s^{-1} mostrou uma relação diretamente proporcional entre I_p e $(v)^{1/2}$, indicando que o comportamento eletroquímico apresentado é característico de um processo irreversível sob controle difusional. A partir destes dados, associados com os extraídos da dependência linear observada entre o potencial de pico E_p com o logaritmo da velocidade de varredura do potencial [6], foi possível estimar o número de elétrons envolvidos na reação como sendo 2 elétrons. Portanto, a reação de oxidação do ácido α -lipoico muito provavelmente resulta na formação de um tiosulfinato, o ácido β -lipoico [7], como principal produto:



Com o propósito de estabelecer as melhores condições analíticas para a determinação de HLip utilizando o eletrodo GP/CoPc, foram realizados experimentos em soluções tampão Britton Robinson (BR) com diferentes valores de pH (variando entre 2 e 12) na presença de $1,0 \text{ mM}$ de HLip e os melhores resultados foram obtidos em pH 7. Além disso, experimentos da influência da natureza do tampão, realizados com 5 diferentes tipos de solução tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,0: 1) BR, 2) fosfato, 3) Macllvaine, 4) Sörensen e 5) ftalato ácido de potássio, indicaram o tampão fosfato como o mais indicado para a continuidade do trabalho.

Voltamogramas de varredura linear registrados numa solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) após adições consecutivas de $20 \mu\text{L}$ de uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de HLip são apresentados na Fig. 2-Esquerda. A curva analítica obtida a partir destes resultados (Fig. 2-Direita) apresentou uma boa linearidade, para uma faixa linear entre $2,0 \times 10^{-6}$ e $9,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com uma sensibilidade de $0,34 \mu\text{A mol L}^{-1}$. Os valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) calculados, de acordo com a IUPAC [8], foram $8,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

A determinação de HLip utilizando o eletrodo GP/CoPc também foi avaliada com a técnica de cronoamperometria. Sob um potencial aplicado de $0,9 \text{ V vs. ECS}$, as correntes também foram registradas após adições consecutivas de $20 \mu\text{L}$ de uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de HLip na solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), e o cronoamperograma resultante é mostrado na Fig. 3-Esquerda. A partir de dados extraídos desta figura, a curva analítica resultante (Fig. 3-Direita) também apresentou uma boa linearidade entre $2,0 \times 10^{-6}$ e $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com uma sensibilidade de $0,30 \mu\text{A mol L}^{-1}$, e valores LD e LQ de $9,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Estes valores são próximos dos obtidos com a técnica de voltametria e apresentados acima. Além disso, os valores apresentados são comparáveis aos reportados na literatura [6,7] e permitem concluir pela viabilidade da utilização do eletrodo GP/CoPc para a determinação de HLip em amostras reais.

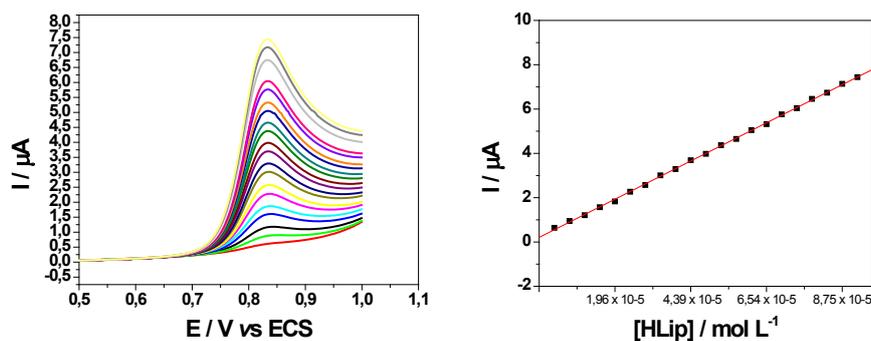


Figura 2. Esquerda: Voltamogramas de varredura linear registrados com o eletrodo GP/CoPC após adições sucessivas de alíquotas de 20 μL de uma solução de HLip $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em uma solução tampão fosfato (pH 7), saturada com N_2 , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Direita: Curva analítica construída a partir das correntes de pico extraídas dos voltamogramas.

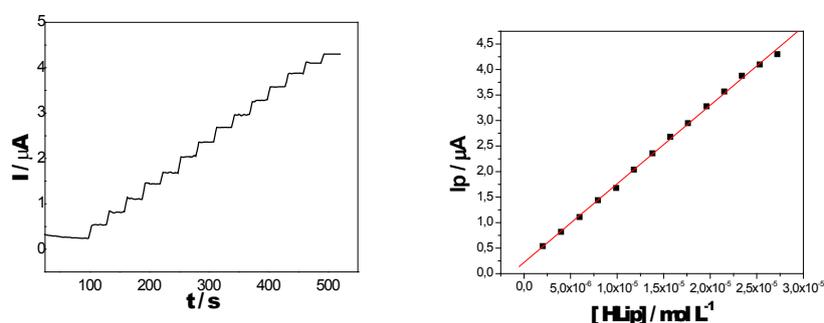


Figura 3. Esquerda: Cronoamperograma registrado com o eletrodo GP/CoPC para adições sucessivas de alíquotas de 20 μL de uma solução de HLip $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em uma solução tampão fosfato (pH 7), saturada com N_2 . Potencial aplicado: 0,9 V vs ECS. Direita: Curva analítica construída a partir das correntes extraídas do cronoamperograma.

CONCLUSÃO

O eletrodo de GP modificado com CoPc apresentou propriedades eletrocatalíticas para a oxidação de ácido lipóico em soluções aquosas e viabilidade para aplicação na determinação deste analito em amostras reais.

AGRADECIMENTOS: CNPq, CAPES, FAPEMA e INCT de Bioanalítica.

REFERÊNCIAS

- [1] Shay, K. P., Moreau, R. F., Smith, E. J., Smith, A. R., Hagen, T. M., *Biochim. Biophys. Acta*, 1790 (2009) 1149.
- [2] Durrani, A.; Schwartz, H.; Nagl, M.; Sontag, G., *Food Chem.*, 120 (2010) 1143.
- [3] Sitton, A., Schmid, M., Gubitz, G., Aboul-Enein, H. Y., *J. Biochem. Biophys. Methods*, 61 (2004) 119.
- [4] Corduneanu, O., Garnett, M., Bret, A. M. O., *Anal. Letters*, 40 (2007) 1763.
- [5] Ziyatdinova, G. K., Grigor'eva, L. V., Budnikov, G. K., *J. Anal. Chem.*, 64 (2009) 185.
- [6] LAVIRON, E. J. *Electroanal. Chem.* 1979, 101, 19.
- [7] BIEWENGA, GP, HAENEN G, BAST A. An overview of lipoate chemistry. in: Fuchs J, Packer L, Zimmer G, ed. *Lipoic Acid in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York, 1997, pp. 1-32.
- [8] IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2nd Edition (1997).

AVALIAÇÃO DE UM ELETRODO MODIFICADO COM FILME DE POLI-1-AMINONAFTALENO PARA A DETERMINAÇÃO DE NORADRENALINA EM AMOSTRA FARMACÊUTICA

Ronaldo C. Faria¹, Sônia Maria C. N. Tanaka², Auro A. Tanaka², Estela P. Troiane¹, Glaucia Tinoco Corrêa (IC)² e Quésia Guedes da Silva²

¹Departamento de Química - UFSCar, São Carlos - SP – Brasil; ²Departamento de Química - UFMA, São Luís - MA - Brasil. quesiaa@hotmail.com

RESUMO: Neste trabalho, um eletrodo modificado com o polímero condutor poli-1-aminonaftaleno (1-PAN) foi pesquisado para a determinação voltamétrica de noradrenalina (ou norepinefrina) em formulações farmacêuticas. O filme de 1-PAN foi produzido eletroquimicamente sobre um eletrodo de platina numa solução contendo o monômero dissolvido em HClO₄. O eletrodo apresentou resposta linear para concentrações de noradrenalina entre 9,90 e 82,5 μmol L⁻¹, com limite de detecção de 0,85 μmol L⁻¹. Para avaliar a seletividade do eletrodo estudou-se o efeito do ácido ascórbico na determinação de noradrenalina.

Palavras-chave: Eletrodo modificado, polímero condutor, poli-1-aminonaftaleno, noradrenalina.

INTRODUÇÃO

Uma família de polímero condutor com aceitável potencialidade refere-se àqueles obtidos a partir de naftilaminas substituídas, como o 1-aminonaftaleno¹ e 1,5-diaminonaftaleno². Poucos exemplos de aplicações destes polímeros condutores são encontrados na literatura³, dentre estes, existem aqueles voltados para o estudo da eletrossíntese e a caracterização de eletrodos modificados com estes materiais⁴. Neste sentido, o poli-1-aminonaftaleno (1-PAN) contendo um grupamento amina, embora ainda pouco conhecido na literatura para aplicações analíticas, têm se mostrado como um interessante sistema para modificação de eletrodos.

Paralelamente, a noradrenalina ou norepinefrina⁵ é um neurotransmissor, do sistema nervoso simpático e sistema nervoso central. Pertencente à família das catecolaminas, a norepinefrina é sintetizada no cérebro, no sistema límbico e nos órgãos de reprodução. Esta molécula está relacionada com o raciocínio e emoções, e uma de suas funções no corpo é manter a tonicidade muscular nos vasos sanguíneos, controlando a pressão sanguínea. Além disso, a noradrenalina encontra-se disponível sob a forma de bitartarato de norepinefrina em ampolas de injeção de uso exclusivamente intravenoso, e é comumente utilizada em unidades hospitalares com a finalidade de elevar a pressão arterial em pacientes hipotensos, bem como durante manobras de ressuscitações cardiopulmonares. Este medicamento é geralmente utilizado diluído em soro fisiológico e a dose deve ser administrada de acordo com o efeito desejado e individualizado para cada paciente. O uso deste fármaco em altas doses e por tempo prolongado, pode provocar graves lesões renais, cutâneas e mesmo cardíacas devido a vasoconstrição excessiva. Assim sendo, é de grande importância o controle rigoroso da qualidade e dosagem dessas formulações injetáveis.

Neste contexto, este trabalho apresenta um estudo envolvendo o desenvolvimento e a avaliação de um eletrodo de platina modificado com poli-1-aminonaftaleno para a determinação voltamétrica de noradrenalina em formulações farmacêuticas.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As medidas voltamétricas foram realizadas em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos. O eletrodo de referência utilizado foi o de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), o eletrodo auxiliar foi uma placa de platina com área de 0,25 cm², e o eletrodo de trabalho utilizado como substrato para a eletropolimerização do 1-PAN foi um disco de platina (área exposta de 0,0314 cm²) embutido em um corpo de vidro conectado a um tarugo de cobre para manter contato elétrico. O filme de 1-PAN foi obtido eletroquimicamente numa solução contendo 0,01 mol L⁻¹ do monômero dissolvido em HClO₄ 1,0 mol L⁻¹. A eletropolimerização foi realizada por meio de voltametria cíclica em um intervalo de potencial entre -0,1 e 0,9 V sob uma velocidade de varredura do potencial de 0,1 V s⁻¹. Após 70 ciclos, obteve-se um filme fino, uniforme e aderente à superfície da Pt. Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas para caracterização morfológica do filme de 1-PAN. Para avaliar a seletividade do eletrodo de 1-PAN, estudou-se o efeito do ácido ascórbico na determinação de noradrenalina. Antes de cada medida, um pré-tratamento catódico no eletrodo era realizado pela aplicação de um potencial de -0,7 V por 3 s.³

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O voltamograma cíclico apresentado na Figura 1 refere-se ao processo de formação do filme de 1-PAN para as quatro primeiras e a última varredura sobre o eletrodo de platina. Na primeira varredura de potencial entre +0,4 a +0,9 V, foi observada uma intensa corrente anódica com a presença de um ombro obtido próximo à +0,75 V, indicando a oxidação eletroquímica do monômero 1-aminonaftaleno neste meio. Para os ciclos sucessivos, realizados entre -0,1 e +0,9 V, a corrente de pico de oxidação do monômero decresce e a potenciais mais negativos é possível visualizar a presença de um par redox bem definido com potenciais de pico +0,35 e +0,25 V correspondentes aos processos anódico e catódico, respectivamente. Verificou-se no final da síntese, a formação de um filme uniforme de coloração marrom escuro aderente à superfície do eletrodo de platina.

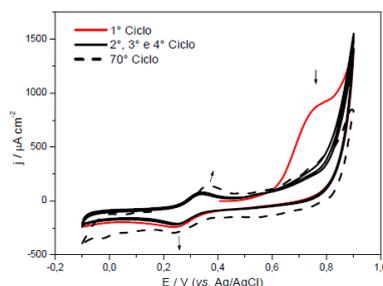


Figura 1: Voltamograma cíclico do crescimento do filme de 1-PAN sobre um eletrodo Pt numa solução de 1-aminonaftaleno $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em HClO_4 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 2 apresenta uma micrografia eletrônica de varredura do filme, obtido a partir do 1-PAN polimerizado eletroquimicamente em meio de HClO_4 . A estrutura do filme apresenta-se regular com a formação de grânulos definidos e distribuídos ao longo da superfície.

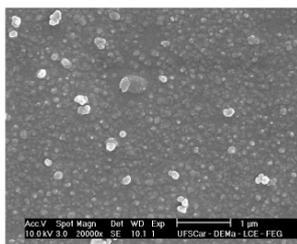


Figura 2: Micrografia da superfície do filme de 1-PAN em escala de $1 \mu\text{m}$. (Condições de síntese: 70 ciclos, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ do monômero e 1 mol L^{-1} de HClO_4).

Para avaliar a seletividade dos eletrodos de 1-PAN estudou-se o efeito do ácido ascórbico na determinação de noradrenalina, por este se tratar de um importante interferente para determinação de catecolaminas em fluidos biológicos. Na Figura 3 estão sobrepostas as curvas analíticas a partir dos voltamogramas de pulso diferencial obtidas com o eletrodo de 1-PAN em diferentes concentrações de noradrenalina, no intervalo de $4,5 \times 10^{-5}$ a $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, na ausência e presença de ácido ascórbico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Observa-se que a presença de ácido ascórbico não interfere de forma significativa na determinação de noradrenalina.

Na Tabela 1 estão reunidos os resultados obtidos dos parâmetros analíticos estudados para a determinação de noradrenalina utilizando o eletrodo de 1-PAN, e na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos na determinação voltamétrica de noradrenalina com o uso do eletrodo de 1-PAN em amostras de ampolas de injeção. Os resultados foram comparados com os obtidos por método espectrofotométrico, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira⁶.

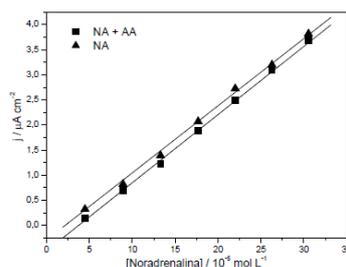


Figura 3: Curvas analíticas para noradrenalina nas concentrações: $4,5, 8, 9,13, 17, 22, 26$ e $30 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, no eletrodo de 1-PAN, na ausência (▲) e na presença (■) de ácido ascórbico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela1: Parâmetros analíticos para determinação de noradrenalina

NORADRENALINA						
Eletrodo	Repetibilidade (DPR %)	Recuperação (%)	Curva Analítica	r	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
1-PAN	1,62	94,8 \pm 104	$-0,10 + 0,49 \times 10^5 [\text{NA}] \text{ mol L}^{-1}$	0,998	0,85	2,83

Tabela 2: Resultados da determinação de noradrenalina presente em formulação farmacêutica, obtidos utilizando o método voltamétrico (eletrodo de 1-PAN) e o método espectrofotométrico

Amostras	Valor Rotulado	Noradrenalina / mg mL ⁻¹			
		Espectrofotométrico ^a	Voltamétrico (1-PAN) ^a	Er ^b (%)	Er ^c (%)
A	1,00	0,99 \pm 0,02	0,98 \pm 0,02	-1,01	-2,00
B	1,00	0,98 \pm 0,01	0,99 \pm 0,01	1,02	-1,00
C	1,00	0,99 \pm 0,01	1,01 \pm 0,02	2,02	1,00

^amédia \pm desvio padrão (n=3)
^bmétodo voltamétrico vs. espectrofotométrico
^cmétodo voltamétrico vs. valor rotulado

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o eletrodo 1-PAN foram concordantes com o método comparativo, o que sugere a possibilidade de aplicação em formulações farmacológicas de noradrenalina.

AGRADECIMENTOS: FAPEMA, CNPq e CAPES

REFERÊNCIAS

- [1] HUANG, S-S; LIN, H-G & YU, R-Q. "Electrocatalysis of a chemically modified poly(1-naphthylamine) film electrode". *Analytica Chimica Acta*, 262 (2), 331, 1992.
- [2] JACKWSKA, K.; BUKOWSKA, J & JAMKOWSKI, M. "Synthesis, electroactivity and molecular structure of poly(1,5-diaminonaphthalene)". *J. Electroanal.Chem.*, 388 (1): 101, 1995.
- [3] SILVA Q.G., BARBOSA, N.V. TROIANI, E.P. & FARIA, R.C. "Electrochemical Determination of Norepinephrine on Cathodically Pretreated Poly(1,5-diaminonaphthalene) Modified Electrode". *Electroanalysis*, 23, 1, 2011.
- [4] HUANG, S-S; LI, J.; LIN, H-G & YU, R-Q. "Electropolymerization of 1- naphthylamine and the structure of the polymer film". *Mikrochimica Acta*, 117:145, 1995.
- [5] SEOL, H.; JEONG, H. & SEUNGWON, J. "A selective determination of norepinephrine on the glassy carbon electrode modified with poly(ethylenedioxyppyrrrole dicarboxylic acid) nanofibers". *J. Solid State Electrochemistry*, 13 (12): 1881, 2010.
- [6] *Farmacopéia Brasileira*. 4ª ed., n° 226, Parte 1. São Paulo: Organização Andrei Editora S.A, 2003.

BIOELETRODO BASEADO EM MATRIZ FTO/POLI(3-AMINOFENOL) PARA DETECÇÃO DE LESÃO CARDÍACA

Luciano. P. Rodrigues¹, Lucas F. de Paula¹, Lucas F. Ferreira²,
Adamo F. G. do Monte³, Ana G. B. Madurro⁴, João M. Madurro¹

¹ Instituto de Química - UFU, Uberlândia - MG - Brasil; ² Instituto de Ciências e Tecnologia - UFVJM, Diamantina - MG - Brasil, ³ Instituto de Física - UFU, Uberlândia - MG - Brasil, ⁴ Instituto de Genética e Bioquímica - UFU, Uberlândia - MG - Brasil. jmadurro@ufu.br

RESUMO: Atualmente os diagnósticos clínico, eletrocardiográfico e bioquímico do infarto agudo do miocárdio IAM não são eficazes, sendo necessário desenvolver técnicas analíticas como os biossensores que geram resultados rápidos, específicos e sensíveis. Este trabalho mostra o desenvolvimento, via síntese eletroquímica, da matriz FTO/poli(3-aminofenol) e sua aplicação na construção de um bioeletrodo, por incorporação de anti-troponina T, o qual detectou seletivamente o marcador de lesão cardíaca troponina T através da espectroscopia de impedância eletroquímica. Adicionalmente este anticorpo foi modificado com biotina, sendo sua afinidade à estreptavidina explorada no design do sistema tipo "sanduíche" que também detectou seletivamente a troponina T por fotoluminescência de pontos quânticos.

Palavras-chave: Lesão cardíaca, FTO, poli(3-aminofenol), impedância eletroquímica, pontos quânticos.

INTRODUÇÃO

O infarto agudo do miocárdio (IAM), conhecido como ataque cardíaco, é um processo que pode levar à necrose de parte do músculo cardíaco por falta de aporte adequado de nutrientes e oxigênio, causado geralmente pela formação de um coágulo arterial. No Brasil o IAM mata aproximadamente 66.000 pessoas por ano, sendo que 60 % destes óbitos acontecem na primeira hora após o início dos sintomas. O diagnóstico precoce estimula o desenvolvimento de técnicas analíticas como os biossensores que geram resultados rápidos, específicos, sensíveis e de baixo custo. A lesão cardíaca libera no sangue macromoléculas como a creatinofosfoquinase (CK) e as troponinas (cTn) [1] que se mostraram altamente específicas e sensíveis na detecção precoce dos danos causados no organismo pela necrose das células miocárdicas [2]. No biossensor imunológico (imunossensor), o analito ou alvo pode ser um antígeno (troponina T) que é reconhecido seletivamente por um material biológico como o anticorpo anti-troponina T, imobilizado em um. A imobilização de biomoléculas no transdutor pode ser realizada através de ligação covalente, adsorção, ligação cruzada e oclusão. Eletrodos quimicamente modificados (EQM) com polímeros estão sendo aplicados como transdutores na construção de biossensores. Dentre os materiais eletródicos convencionais utilizados em biossensores, estão o ouro, platina, grafite, etc e outros menos usuais como os vidros condutores de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) [3] e índio (ITO). Os polímeros podem ser classificados como não condutores, semicondutores ou condutores, sendo que nesta última classe, as investigações têm sofrido uma rápida aceleração, cuja obtenção via metodologia eletroquímica é a mais relatada, através de diferentes técnicas como a voltametria cíclica, a potenciostática e a galvanostática, configurando sistemas com propriedades elétricas e analíticas interessantes, que dependem essencialmente das condições da síntese. Os polímeros não-condutores normalmente apresentam grande resistência elétrica, sendo o filme formado muito mais fino do que os filmes poliméricos condutores. Devido à sua fina espessura, os substratos e produtos difundem-se mais rapidamente e podem ser utilizados como matrizes suporte para a imobilização de biomoléculas. Os imunossensores podem ser construídos para detecção direta (*label free*) ou indireta que requererem um marcador que monitore a reação de afinidade entre o anticorpo e o antígeno. Um método direto, poderoso e sensível de detecção é a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), já para os métodos indiretos, os pontos quânticos parecem superar os fluoróforos convencionais em função das suas propriedades fotofísicas [4]. Este trabalho tem como objetivo desenvolver um bioeletrodo baseado na modificação eletroquímica do FTO por eletropolimerização de 3-aminofenol (3AMF) e aplicá-lo na detecção de lesão cardíaca por espectroscopia de impedância eletroquímica e fotoluminescência (PL) de pontos quânticos.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Preparação do poli(3-aminofenol) em FTO: As soluções foram preparadas com água deionizada por um sistema Millipore Milli-Q (18,2 MΩcm⁻¹). Solução de 3AMF em ácido sulfúrico aquoso foi deaerada em N₂ ultra-puro antes da eletropolimerização que foi realizada por voltametria cíclica numa célula de três compartimentos, alimentada por um potenciostato modelo 420A (CH Instruments). O eletrodo de trabalho usado foi de FTO 1cm² (Flexitec Eletrônica Orgânica). O eletrodo auxiliar utilizado foi de platina 2 cm². Os potenciais foram referenciados a um eletrodo de Ag/AgCl saturado. **Produção do bioeletrodo:** Três soluções foram adicionadas aos eletrodos de FTO/P3AMF, sendo elas:

solução do anticorpo anti-cTnT (300ng/cm²), solução de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e solução de N-hidroxi-succinimida (NHS), ambas a 10 mmol.L⁻¹, na proporção 2:1:1 (v/v) e incubados a 4 °C “overnight”. Para retirada dos anticorpos não ligados foi realizada uma lavagem em PBS. Em seguida adicionou-se glicina a 5 mmol.L⁻¹ por 30 min. Posteriormente nova lavagem em PBS e adição de solução de BSA 0,5 % por 30 min. **Biotinilação do anticorpo anti-cTnT:** A conjugação do anti-cTnT à biotina (anti-cTnT-B) foi viabilizada segundo protocolo [5]. **Dot Blot:** Foram sensibilizados anti-cTnT em membrana de nitrocelulose 0,22 µm. Em seguida foi adicionado o alvo específico (cTnT) (positivo) e uma proteína irrelevante (anti-cTnI) (negativo). As membranas foram sondadas com anti-cTnT-B e conjugado estreptavidina-peroxidase (S-HRP), e revelado com adição de tetracloreto de 3,3'-diaminobenzidina (DAB w/Co[®]) e Uréia/H₂O₂/NaCl. **Deteccção por EIE:** A cTnT (900ng/cm²) foi detectada em solução aquosa de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] 5 mmol.L⁻¹ em potenciostato AUTOLAB, no intervalo de freqüência de 10⁶ a 10⁻² Hz, em potencial de +0,24 V. **Deteccção por PL:** A cTnT (900ng/cm²) foi detectada por fotoluminescência, na qual os pontos quânticos de CdSe/ZnS (Qdot-525[®]) foram excitados a 405 nm, sendo sua emissão detectada por um espectrômetro acoplado a uma fotomultiplicadora.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os voltamogramas obtidos nas eletropolimerizações do 3AMF em FTO apresentam perfis semelhantes aos voltamogramas obtidos para outros polímeros em substratos vítreos condutores, como por exemplo, o polipirrol em FTO e o politiofeno em ITO [6]. O pico de oxidação do monômero é observado em +1,23 V e um pico de redução do polímero ocorre entre +0,25 V e -0,2 V com uma corrente muito baixa, assim como observado na eletropolimerização do 3AMF em eletrodo de grafite [7]. O FTO/P3AMF é um material translúcido com espessura média de 375±75 nm, de elevada rugosidade, capaz de atrair estruturas catiônicas e repelir estruturas aniônicas em pH neutro. Os espectros de FTIR indicam a presença de grupamentos -OH e -NH₂ livres no material polimérico, apresentando extensão de conjugação, comprovada por UV/Vis. Medidas elétricas de condutividade pelo método das duas pontas indicaram que o material tem caráter passivante, em concordância com as os resultados de EIE em que um aumento de 1400% na resistência foi evidenciado após a modificação do FTO pelo P3AMF. A imobilização do anti-cTnT neste EQM foi viabilizada ligando covalentemente, via carbodiimida, os grupamentos de amins primárias livres na malha polimérica aos carboxilatos do anticorpo, configurando uma ligação amida estável na produção do bioeletrodo, o qual detectou a cTnT por método direto, cujos espectros de impedância apresentados como diagramas de Nyquist (Figura 1a) possibilitaram a construção de circuito equivalente único (Figura 1b) em que as simulações dos dados experimentais estão apoiadas por baixos erros estatísticos.

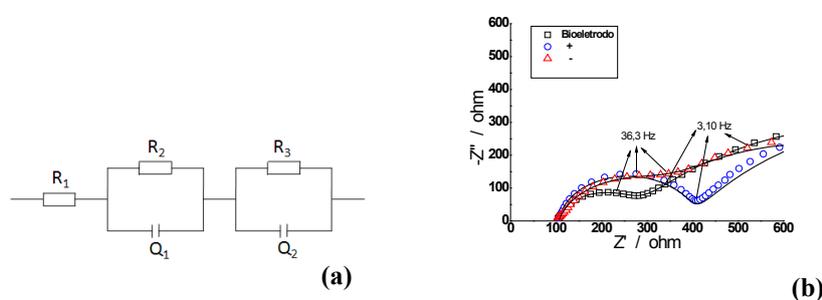


Figura 1: (a) Diagrama de Nyquist (Z'' vs. Z') para medidas de impedância em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ para o bioeletrodo (branco), o controle (+) troponina T e o controle (-) anti-troponina I; (○) *Fitting*; (b) Circuito equivalente proposto para simulação dos dados experimentais.

Os espectros de detecção por EIE apresentaram dois semicírculos, estando o primeiro associado à resistência a transferência de carga (R_{tc}) que traz informações analíticas relevantes, uma vez que o bioeletrodo reconhece a cTnT (controle +) fazendo com que o valor R_{tc} atinja 289,5 Ω. O estudo de interferente realizado em paralelo substituiu o alvo específico pelo inespecífico anti-cTnI (controle -) que não apresentou afinidade pelo bioeletrodo, pois após a lavagem sob agitação em PBS, a biomolécula foi removida, fato comprovado pelo valor de $R_{tc}=165,7$ Ω ser muito semelhante ao do bioeletrodo $R_{tc}=155,9$ Ω, uma vez que o R_{tc} é um importante parâmetro para avaliar a seletividade de um imunossensor impedimétrico. A detecção por método indireto exigiu a marcação do anti-cTnT com os pontos quânticos, que foi realizada através de biotinilação, uma vez que a biotina possui elevada afinidade pela estreptavidina, que por sua vez estava ligada ao CdSe/ZnS. Pela metodologia de *dot blot* (Figura 2) foram comprovadas a biotinilação e a funcionalidade do “sanduíche” anti-cTnT/cTnT/anti-cTnT-B, demonstrando que a marcação com biotina não atrapalhou os sítios biológicos dos anticorpos que reconheceram simultaneamente os antígenos que possuíam mais de um epítipo.

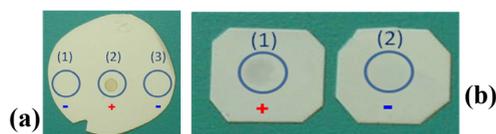


Figura 2: Ensaios de “dot blot”: (a) (1) anti-cTnI e em (3) com anti-cTnT-B. Em (2) com cTnT; (b) em (1) e (2) com anti-cTnT. Em (1) adicionado alvo específico cTnT e em (2) proteína irrelevante anti-cTnI; As membranas foram sondadas com anti-cTnT-B e S-HPR. Revelou-se com DAB® e DAB w/Co®, respectivamente, e H₂O₂.

A detecção indireta do alvo específico por luminescência dos pontos quânticos proporcionou um *design* em que o sistema se acoplava ou desacoplava em função da presença/ausência do alvo específico. Os pontos quânticos CdSe/ZnS utilizados luminescem em 525 nm, sendo os espectros de fotoluminescência para o bioeletrodo (branco), controle (+) e controle (-) disponíveis na Figura 3.

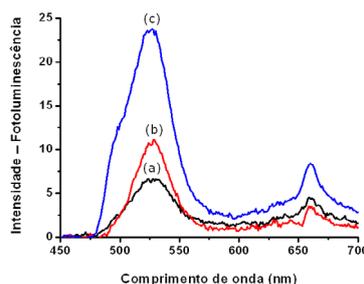


Figura 3: Espectros de fotoluminescência: (a) Bioeletrodo (b) Anti-troponina I (-) (c) Troponina T (+).

Comparando a intensidade da fotoluminescência verifica-se uma proporção positivo:bioeletrodo igual a 4, demonstrando o sucesso do reconhecimento da cTnT pelo bioeletrodo. No estudo de interferente observou-se uma proporção negativo:bioeletrodo igual a 2.

CONCLUSÕES

O marcador específico de lesão cardíaca troponina T foi detectado qualitativamente pela técnica de *dot blot* e quantitativamente usando o bioeletrodo baseado na matriz FTO/poli(3-aminofenol), através do método direto de espectroscopia de impedância eletroquímica e indireto por fotoluminescência de pontos quânticos CdSe/ZnS, ambos na concentração de 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

AGRADECIMENTOS: CAPES, CNPQ, FAPEMIG, PROPP/UFU.

REFERÊNCIAS

- [1] HAMILTON B.H. and HOLLANDER J.E., “Diagnosing acute coronary syndrome in the ED: Improvements from the first decade of the twenty-first century”, *Emergencias* 22:293-300, 2010.
- [2] Saengera A.K., Beyraub R., Braunc S., Coorayd R., Dolcie A., Freidankb H., Giannitsisf E., Gustafsong S., Handyg B., Katusf H., Melansohn S.E, Panteghinie M., Venged P., Zornf M., Jarolimh P., Brutoni D., Jarauschi J. and Jaffea A.S., “Multicenter analytical evaluation of a high-sensitivity troponin T assay”, *Clin. Chim. Acta* 412:748-754, 2011.
- [3] EGUILUZ K.I.B., SALAZAR-BANDA G.R., FUNES-HUACCA M.E., ALBERICE J.V., CARRILHO E., MACHADO S. A. S. and AVACA L. A., “Sequence-specific electrochemical detection of Alicyclobacillus acidoterrestris DNA using electroconductive polymer-modified fluorine tin oxide electrodes”, *Analyst* 134:314-319, 2009.
- [4] JAMIESON T., BAKHSHI R., PETROVA D., POCKOCK R., IMANIB M. and SEIFALIAN A. M., “Biological applications of quantum dots”, *Biomaterials* 28:4717-4732, 2007.
- [5] HARLOW E. and LANE D., “Labeling Antibodies with Biotin”, Cold Spring Harb Protoc, doi:10.1101/pdb.prot4286 (2006).
- [6] Uygun A., “DNA hybridization electrochemical biosensor using a functionalized polythiophene”. *Talanta* 79:194-198, 2009.
- [7] FRANCO D. L., AFONSO A. S., VIEIRA S. N., FERREIRA L. F., GONÇALVES R. A., MADURRO A. G. B. and MADURRO J. M., “Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties”, *Mater. Chem. Phys* 107:404-409, 2008.

BASE DE CARBONO CERÂMICO MODIFICADO COM FTALOCIANINA DE NÍQUEL

¹Márcio Luiz Módolo (PG), ¹Gabriel Kozahoski de Toledo (IC), ¹Eryza Guimarães Castro (PQ)
²Cristiane Andrade Pessoa (PQ), ¹Sérgio Toshio Fujiwara (PQ).

¹Departamento de Química- UNICENTRO, Guarapuava – PR – Brasil. ²Departamento de Química- UEPG, Ponta Grossa - PR - Brasil; marciom10@hotmail.com

RESUMO: Neste trabalho realizou-se a síntese do carbono cerâmico pelo do processo sol gel fazendo uso de um planejamento fatorial 2⁴. Os materiais obtidos foram introduzidos em tubos plásticos com a inserção de um fio condutor de níquel-crômio, as propriedades eletroquímicas dos eletrodos produzidos foram investigadas através da técnica de voltametria cíclica e sua caracterização morfologia foi realizada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, espectros FT-IR e difratometria de raio-X. O eletrodo que apresentou melhor sensibilidade e reversibilidade foi o preparado com 35 µL de NaOH 12 mol.L⁻¹ e proporção 60/40% m/m (grafite/metiltrimetoxisilano, MTMS). Utilizando as condições que possibilitaram a melhor sensibilidade e reversibilidade foi preparado um eletrodo incorporando a ftalocianina de níquel, esse eletrodo apresentou um par redox em aproximadamente 0,3V vs Ag/AgCl, foram realizados estudos de pH e estabilidade do eletrodo obtido para verificar a potencialidade do mesmo como futuro sensor eletroquímico para espécies de interesse.

Palavras-chave: carbono cerâmico, eletrodos modificados, processo sol-gel, ftalocianina de níquel.

INTRODUÇÃO

A utilização de materiais porosos, tais como sílica, na construção de eletrodos quimicamente modificados teve um grande desenvolvimento a partir do início na década de 90, juntamente com o advento dos eletrodos de pasta de carbono modificados e tem crescido exponencialmente até os dias atuais^[1]. Tais materiais por apresentarem áreas superficiais elevadas possibilitam um extraordinário aumento na superfície ativa e conseqüentemente na sensibilidade e velocidade das reações eletroquímicas. No entanto, uma grande desvantagem é que estes não são condutores da eletricidade, o que a princípio por si só não os credencia à utilização em processos eletroquímicos^[2]. Como solução para estes problemas, recentemente tem havido um crescente interesse por parte de muitos pesquisadores^[3,4] numa nova geração de materiais que apresentam uma alta condutividade elétrica, os chamados eletrodos de carbono cerâmico (ECC). Tais tipos de eletrodos foram primeiramente propostos pelo grupo de Lev e colaboradores^[5] e desde então estes têm sido aplicados na determinação de diversas espécies de interesse^[6].

A principal vantagem destes materiais em relação aos demais eletrodos a base de carbono é que estes combinam as propriedades do processo sol-gel tais como, obtenção de materiais porosos nanoestruturados versáteis com alta área superficial e a condutividade dos materiais de carbono, possibilitando assim a obtenção de um eletrodo de superfície renovável, no entanto mais robusto e de alta estabilidade. Devido a essas propriedades, a incorporação de espécies eletroativas no ECC é bastante fácil e interessante, aumentando dessa forma a sua gama de aplicações em determinações eletroanalíticas.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Preparou-se a mistura hidrolisada contendo 1,5 mL de etanol, além de duas quantidades distintas de catalisador (HCl ou NaOH) 12 mol L⁻¹ [30 µL referente ao nível (-) e 70 µL ao nível (+)]. Adicionou-se ainda, quantidades variadas de tetraetoxisilano (TEOS) / metiltrimetoxisilano (MTMS), mantendo-se o sistema sob agitação magnética durante 5 minutos, as quantidades de TEOS/MTMS e grafite obedeceram às seguintes proporções 50% de grafite no nível (-) e 60% de grafite no nível (+). Para a obtenção do ECC, o sol-gel de carbono foi empacotado em um tubo de plástico rígido (área exposta de aproximadamente 0,2 cm²), inserindo-se um fio condutor de níquel-crômio, para o contato elétrico. Os eletrodos obtidos foram submetidos ao processo de secagem à temperatura ambiente (2 semanas) e no vácuo (1 semana).

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se uma cela eletroquímica contendo três eletrodos: eletrodo de trabalho (ECC), eletrodo de referência (Ag/AgCl) e contra eletrodo de platina. Tais medidas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato Epsilon Bas Cell Stand C3 no Laboratório de Materiais e Compostos Inorgânicos (LabMat) - UNICENTRO. As medidas eletroquímicas dos ECC foram analisadas com relação as correntes de pico anódica (I_{pa}) e a variação de potenciais (ΔE) dos respectivos voltamogramas cíclicos obtidos na presença de 2,0 mL de ferrocianeto de potássio 1,0x10⁻² mol.L⁻¹ em meio a 10,0 mL de eletrólito suporte NaCl (0,5 mol.L⁻¹). Todos os ensaios por voltametria cíclica foram realizados entre os potenciais de -0,2 à 0,8 V com velocidade de varredura fixada em 50 mV/s. Os resultados voltamétricos obtidos para os eletrodos preparados nas diferentes condições estão mostrados na Tabela 1. A síntese do ECC modificado com NiPc foi baseado no eletrodo que forneceu as melhores respostas

voltamétricas, ou seja, o ensaio 8 utilizando MTMS como precursor. Dissolveu-se 25 mg de NiPc em 25 mL de etanol com auxílio de ultrassom durante 15 minutos a 25°C. Dessa solução se retirou 0,75 mL, aonde foi acrescentado 0,6mL de MTMS e 35 μL de NaOH 12 mol.L⁻¹, sob constante agitação durante 5 minutos. Após adicionou-se 0,9g de grafite em pó, sob agitação magnética por 3 minutos. O gel formado foi empacotado em um tubo (1cm de altura e área exposta de aproximadamente 0,2 cm²), inserindo-se um fio condutor de níquel-crômio, para o contato elétrico. O material ficou secando durante 3 semanas a temperatura ambiente.

Para verificar a morfologia e estrutura dos materiais realizou micrografias. As micrografias foram obtidos em um Microscópio Eletrônico de Varredura ZEISS DSM 960, essas medidas foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC), na Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

Tabela 1. Planejamento fatorial 2⁴ para otimização dos eletrodos de carbono cerâmico preparados com TEOS e MTMS

	Catálise	Qtidade (μL)	Proporção	TEOS	MTMS
				ΔE (mV)	ΔE (mV)
1	HCl	30	50/50	184	191
2	HCl	30	60/40	172	178
3	HCl	70	50/50	222	258
4	HCl	70	60/40	254	226
5	NaOH	30	50/50	152	133
6	NaOH	30	60/40	134	126
7	NaOH	70	50/50	141	110
8	NaOH	70	60/40	136	76

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Analisando-se os resultados obtidos, uma maior reversibilidade foi observada nos eletrodos preparados por catálise básica, (ensaio 8 com MTMS). O material obtido por essa rota catalítica tem uma tendência a ser meso poroso, explicando a maior reversibilidade desses eletrodos. As lamelas de carbono cerâmico formadas durante o processo sol-gel por catalise básica (BT e BM) são de tamanho inferior a aquelas formadas por catálise ácida (AT e AM), conforme figura 1. Nota-se ainda nestas figuras, que há uma menor agregação das lamelas, indicando uma menor compactação, formando materiais compósitos com maior grau de porosidade.

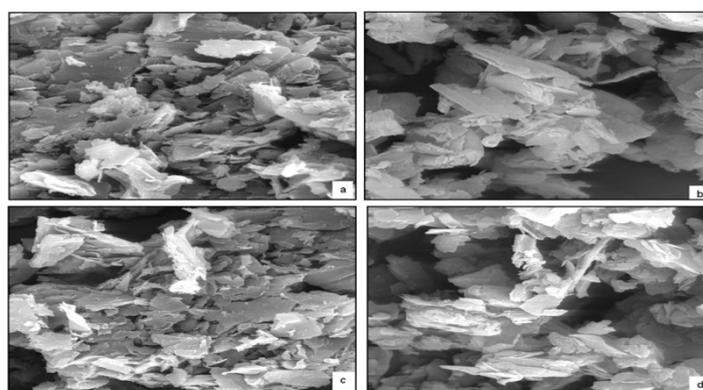


Figura 1: Imagens de Microscopia eletrônica de varredura para os materiais (a) AT, (b) BT, (c) AM, (d) BM (aumento de 2000X escala = 10 μm).

Fazendo uma correlação entre as micrografias obtidas, com a resposta eletroquímica dos mesmos, sugere-se que o material obtido pela rota catalítica básica apresenta uma estrutura morfológica menos compactada, o que facilita o processo de transferência de elétrons na interfase eletrodo-solução, proporcionando uma maior reversibilidade e melhor definição dos picos voltamétricos. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura promovem a síntese dos eletrodos de carbono cerâmico através da catálise ácida, esses trabalhos relatam que a catálise básica produz materiais quebradiços e a estabilidade desses eletrodos é muito baixa, no entanto até o presente momento não observou-se desestruturação dos eletrodos sintetizados.

Ftalocianinas específicas como as de ferro e níquel são usadas em reações como agentes catalisadores homogêneos e heterogêneos. O macrocíclico funciona como um agente catalisador, onde o estado de oxidação do metal central sofre alteração durante o processo de transferência de elétrons. Desta forma, conseguindo prender este composto numa superfície condutora de eletricidade, tal como eletrodos de carbono cerâmico, poderá se observar uma atividade eletrocatalítica.

A figura 2 mostra a voltametria cíclica do ECC correspondente ao ensaio 8 modificado com ftalocianina de Níquel(NiPc).

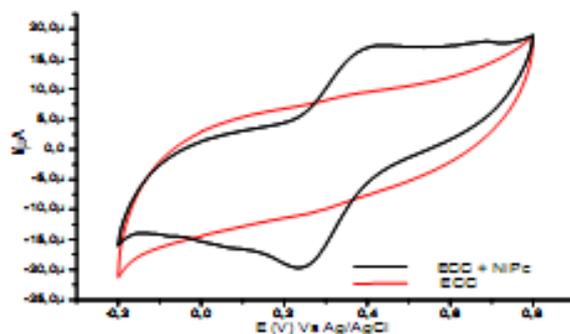


Figura 2: Voltamograma cíclico de ECC com e sem NiPC em 0,5 mol/L de NaCl, $v = 50$ mV/s

A figura 3a mostra os voltamogramas obtidos com o eletrodo de carbono cerâmico modificado com NiPc em vários valores de pH. A figura 3b demonstra que a amplitude de corrente do par redox fica estável até 120 ciclos, mostrando a estabilidade do eletrodo sintetizado.

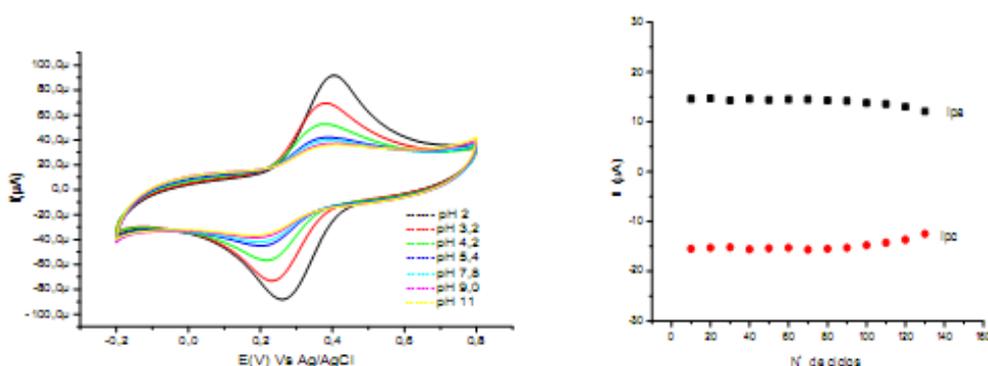


Figura 3a: Influência do pH da solução nos voltamogramas obtidos como o ECC modificado com NiPc em 0,5 mol/L de NaCl, $v = 50$ mV/s.

Figura 3b: Variação da I_{pa} e I_{pc} após sucessivas varreduras utilizando ECC modificado com NiPC em 0,5 mol/L de NaCl, $v = 50$ mV/s

A figura 3a mostra uma maior intensidade de corrente anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) em valores de pH baixo, este fato está associado a maior presença de íons H^+ nesses valores de pH, intensificando os valores de corrente anódica e catódica.

CONCLUSÕES

A partir da análise do planejamento fatorial pode-se constatar uma maior reversibilidade para os ECCs preparados por catálise básica, fato muito relevante, visto que a maior parte dos trabalhos encontrados na literatura utilizam a catálise ácida para síntese dos ECC. O ECC modificado com NiPc apresentou um par redox em aproximadamente 0,3V vs Ag/AgCl que é estável e apresenta maiores intensidades de corrente anódica e catódica em valores de pH baixo, indicando a potencialidade do ECC modificado com NiPc para a construção de sensores.

AGRADECIMENTOS: UNICENTRO, CNPq, FUNdação araucária, CAPES e LIEC

REFERÊNCIAS

- [1] Pereira, A. C.; Santos, A. S.; Kubota, L. T.; *Quím. Nova.* **2002**, 25, 1012.
- [2] Francisco, M. S. P.; Cardoso, W.S.; Gushikem, Y.; *J. Electroanal. Chem.* **2005**, 574, 291.
- [3] Rozniecka, E.; Shul, G.; Sirieix-Plenet, J.; Gaillon, L.; Opallo, M.; *Electrochem. Commun.* **2005**, 7, 299.
- [4] Sheng, Q.; Yu, H.; Zheng, J.; *J. Solid State Electrochem.* **2008**, 12, 1077.
- [5] Tsionsky, M.; Gun, G.; Giezer, V.; Lev, O.; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1747.
- [6] Gong, K.; Zhang, M.; Yan, Y.; Su, L.; Mao, L.; Xiong, S.; Chen, Y.; *Anal. Chem.* **2004**, 76, 500.

DETECTING HYDROGEN PEROXIDE RELEASE FROM MACROPHAGES USING MICROPATTERNED ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

Jun Yan,¹ Valber A. Pedrosa,^{2,3} Aleksandr L. Simonian² and Alexander Revzin¹

¹ Department of Biomedical Engineering, University of California, Davis, USA

² Departments of Materials Engineering, Auburn University, Auburn, AL 36849, USA

³Institute of Bioscience, Department of Chemistry and Biochemistry, UNESP, Botucatu, SP - Brazil.

vpedrosa@ibb.unesp.br

RESUMO: Seamless integration of biological components with electrochemical sensors is critical in the development of microdevices for cell analysis. The present paper describes the integration of immune cells (macrophages) with miniature Au electrodes in order to detect cell-secreted hydrogen peroxide (H_2O_2). Photopatterning of poly(ethylene glycol) (PEG) hydrogels was used to immobilize horseradish peroxidase (HRP) molecules onto electrodes and to define regions for cell attachment in the vicinity of sensing electrodes. Electrodes micropatterned in such a manner, were enclosed inside PDMS fluid conduits and incubated with macrophages. The cells attached reproducibly onto the exposed glass regions in the vicinity of the electrodes and nowhere else on the non-fouling PEG hydrogel surface. A microfluidic device was converted into an electrochemical cell by placing flow through Ag/AgCl reference and Pt wire counter electrodes at the outlet and inlet respectively. This microdevice with integrated H_2O_2 -sensing electrodes had sensitivity of $28 \mu A/cm^2 mM$ with a limit of detection of $2 \mu M$. Importantly, this microdevice allowed controllable seeding of macrophages next to electrodes, activation of these cells in situ and monitoring of H_2O_2 release in real time.

Palavras-chave: Biosensor, Macrophages, biopolymer

INTRODUÇÃO

Inflammatory processes play an important role in a number of pathologies including diabetes [1], cancer [2], and tissue fibrosis [3]. The inflammatory signals are necessary under normal circumstances for combating pathogens associated with injuries or infections, but may have pathophysiological consequences if unregulated. Macrophages are one type of immune cell that is responsible for producing inflammatory markers, cytokines and reactive oxygen species (ROS). ROS is a collective term that refers to chemical species formed by incomplete reduction of oxygen, including superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical ($\cdot OH$). ROS compounds such as superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) are unstable on their own and, upon degradation, form a more stable H_2O_2 compound. Therefore, H_2O_2 released by the immune cells is an important indicator of ROS production and an important analyte for biosensing.

In this work, we have developed a biomaterial micropatterning strategy that would enable the reproducible placement of macrophages in the proximity of H_2O_2 biosensors and would ensure that the sensing electrodes were not fouled. To achieve this, we utilized PEG hydrogel photolithography - an approach employed by us previously to define cell-surface interactions. In addition to preventing cell attachment, PEG hydrogels provide an excellent matrix for entrapment of enzymes and also prevent electrode fouling. Recently, we demonstrated the use of PEG hydrogel micropatterning for fabricating enzyme-based electrodes for detection of glucose and lactate. In the present study, the enzyme-electrode fabrication process was modified to include sites for cell attachment next to enzyme electrodes (Figure 1). A micropatterned cell culture/biosensor surface was incorporated into a two-channel microfluidic device with flow-through reference (Ag/AgCl) and counter (Pt) electrodes. More importantly, the electrochemical detection system, H_2O_2 biosensors, and the cell culture system were integrated into one system with the use of microfluidic devices to carry out a series of tasks, such as cells seeding, washing, introduction of stimulant, and H_2O_2 dynamic electrochemical monitor. In addition, this All-in-One system dramatically decreases the testing volume as well as the needed reagents for experiments. In the future, we envision placing biosensors for multiple analytes next to cells for multi-parametric analysis of cell function. In addition, electrode-containing micropatterned surfaces may be integrated into micropatterned co-cultures to monitor signaling between two different cell populations.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

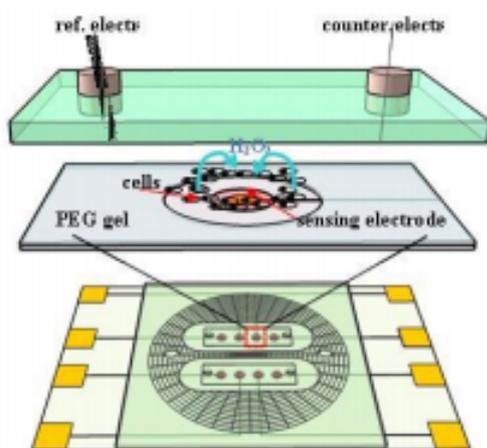
Fabrication of gold electrode arrays. The layout of electrode array was designed in AutoCAD, converted into plastic transparencies by CAD Art Services (Portland, OR) and then transferred onto quartz/chrome plates using standard microfabrication approaches. The fabrication of gold electrodes has been described in our previous reports. Briefly, standard (75 mm x 25 mm) glass slides were sputter-coated with 15 nm Cr adhesion layer and 100 nm Au layer by Lance Goddard Associates (Santa Clara, CA). Positive photoresist was micropatterned on top of Au/Cr and used as a protective layer during wet etching of the metal. As shown in Figure 1A, resulting Au micropatterns consisted of

eight electrodes connected by leads to contact pads for individual addressability [4]. Each Au electrode was 300 μm in diameter with 16 μm wide leads and 2 mm \times 2 mm square contact pad. After wet etching, the photoresist layer was retained on top of the Au pattern and was used as a protective layer during silanization procedure described below. We found that exposed Au regions became irreversibly insulated after silanization.

Integration of enzyme-containing hydrogel microstructures with Au electrodes.

The glass substrates with photoresist-covered Au electrodes were modified with acrylated silane according to the protocol described by us previously. This step was necessary to ensure anchoring of hydrogel structures onto glass substrates. After the silane modification step, substrates were sonicated in acetone for 2 min to remove the photoresist and then placed in an oven for 3 h at 100 $^{\circ}\text{C}$ to cross-link the silane layer.

When preparing enzyme electrodes, HRP was dissolved in PBS buffer (pH 6.0) to reach the concentration of 10 mg/mL. In addition, glutaraldehyde was added to the enzyme solution at 2% v/v to improve enzyme retention. In parallel, the prepolymer solution was prepared by adding 2% (v/v) photoinitiator (2-hydroxy-2-methyl-propiophenone) to 1 mL of PEG-diacrylate (DA) (MW 575). The HRP-PEG hydrogel prepolymer solutions were prepared by adding 5 μL , 10 μL , 20 μL , and 40 μL of the enzyme solution mixed with glutaraldehyde into 50 μL of PEG-DA. Therefore, four different volumetric ratios of HRP:PEG were prepared: 1:10, 1:5, 2:5 and 4:5. The mixture was stirred for 4 h at 4 $^{\circ}\text{C}$ to better distribute enzyme molecules in the prepolymer. The procedure for patterning hydrogel microstructures on electrodes is described schematically in Figure 1. PEG-based prepolymer solution was spin-coated at 800 rpm for 4 sec onto glass slides containing Au electrode patterns. A photomask was registered with an electrode pattern and then exposed to UV light at 65 mW/cm² for 10 sec using Omnicare 1000 light source (EXFO, Mississauga, Ontario, Canada) to convert liquid prepolymer into cross-linked hydrogel. The surfaces were developed in DI water for 3 min to remove unpolymerized PEG precursor solution. Enzyme carrying hydrogel microstructures were made larger than Au electrodes - 600 μm and 300 μm diameter for hydrogel and Au features respectively. This was done to ensure that hydrogel elements attached to the silanized glass regions of the substrate.

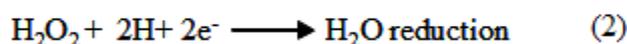
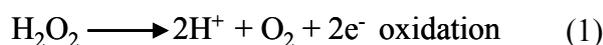


Sites for cell attachment were created by micropatterning a second hydrogel layer in registration with hydrogel/Au electrodes. This second gel layer did not carry HRP molecules and was used to define 300 μm wide annular cell adhesive regions on the glass surface. The micropatterned glass surfaces were incubated with collagen (I) or fibronectin (both proteins were at 0.2 mg/ml) for 30 min to promote attachment of macrophages to glass (see Figure 3). To visualize immobilization of protein molecules in the regions designated for cell attachment, micropatterned surfaces were incubated with avidin-Alexa546 conjugate and imaged using fluorescence microscopy.

Figure 1. (A) Schematic of the microdevice. Upper drawing shows a magnified view of one cell culture/electrode unit, whereas the lower drawing shows a two channel PDMS microfluidic device with 4 electrodes per channel. Each channel constituted an electrochemical cell with Ag/AgCl flow through reference electrode and Pt wire counter electrodes placed at the outlet and inlet respectively. (B) An actual device consisting of electrode array fabricated on a 3 x 1 in. glass integrated with PDMS-based fluidic channels.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

After fabricating enzyme-based hydrogel/Au electrodes and outfitting these electrodes with microfluidic channels, we characterized the response of these microdevices to known concentrations of H₂O₂. It should be noted that H₂O₂ can be reduced or oxidized at negatively or positively poised electrodes as shown by reactions 1 and 2 below:



Prior to carrying out cell detection experiments, we wanted to optimize performance of the biosensor. Specifically, sensor responses as a function of HRP loading into the hydrogel and as a function of working potential were

characterized. PEG prepolymer formulations with varying amounts of HRP were prepared to create 1:10, 1:5, 2:5 and 4:5 volumetric ratio of HRP:PEG solution. Hydrogel-coated Au electrodes were prepared from these different prepolymer formulations, were poised at -0.2 V vs. Ag/AgCl reference and were challenged with 200 μM H_2O_2 . To enable comparison between different experiments, responses of electrodes were normalized by the signal from a hydrogel electrode containing 1:10 HRP:PEG formulation. The sensitivity of the hydrogel-coated electrodes was dependent on the amount of enzyme. Hydrogels created with higher HRP to PEG ratios provided stronger response to 200 μM H_2O_2 with hydrogel/Au electrodes based on 4:5 HRP:PEG ratio providing the highest reductive current. Based on these results, biosensors used in all subsequent experiments in this paper were prepared using 4:5 v/v ratio of HRP to PEG.

We also investigated the optimal potential for performing H_2O_2 detection. In these experiments, hydrogel/Au electrodes with and without HRP were poised at potentials ranging from -0.3 to 0.3V vs. Ag/AgCl and were challenged with 200 μM of H_2O_2 . The results reveals several insights into signal vs. applied potential relationship: 1) hydrogel modified electrodes exhibited higher current density at reductive (negative) voltages, 2) HRP-containing hydrogel/Au electrodes were ~ 60 times more sensitive to H_2O_2 compared to gel-coated electrodes without enzyme at working potential -0.2 V and 3) the presence of HRP in the hydrogel did not contribute to improved sensitivity at oxidative (positive) potentials. Based on the results presented in Figure 4B, we chose to employ HRP-modified hydrogel/Au electrodes at -0.2 V vs. Ag/AgCl reference. In addition to providing high reductive currents in our biosensor set-up, the value of -0.2V vs. Ag/AgCl electrode was chosen to avoid interference due to the reduction of oxygen that may occur at more negative potentials.

A common concern for electrochemical biosensors operating under physiological conditions is that the real signal may be masked by interference from nonspecific compounds undergoing electrochemical reactions at the sensing electrode. To test the sensor selectivity, our biosensor was challenged with the analyte of interest (H_2O_2) as well as with 5 most common interfering species that are generally used to test the H_2O_2 biosensor selectivity prior cell experiments (cite): AA, UA, DOPAC, SO_3^{2-} and O_2 . Interfering substances had minimal effects compared with sensor response to 100 μM H_2O_2 . UA did not result in a detectable signal at -0.2 V working potential whereas 200 μM of SO_3^{2-} , AA and DOPAC produced signals that were 4%, 1.8% and 1.3% of the signal due to 100 μM of H_2O_2 . Overall interference from these compounds was found to be minimal. Sensor response to physiological O_2 (200 μM) represented 12% of the response to 100 μM of H_2O_2 . Therefore, while there is some interference from oxygen, it is not significant. Coupled to the fact that cells secreted high levels of H_2O_2 upon activation, O_2 interference with operation of our biosensor was minimal. These results indicate the suitability of the proposed biosensor to practical applications. shows a representative experiment where macrophages in one fluidic channel were exposed to PMA whereas cells in the other channel were not stimulated. There was a detectable drop in signal in the channel infused with PMA – suggesting that activated macrophages were releasing H_2O_2 molecules that were in turn reduced at the HRP-containing electrode.

The current was observed to decrease by 2.7 nA after 60 min of activation and then recover over the course of next 60 min. This observation is consistent with the concept of oxidative burst where production of ROS is high initially but then attenuates over time. The H_2O_2 secretion from ~ 1000 macrophages under PMA stimulation was around 107 ± 12 μM (n=3). Importantly, as highlighted by control experiments presented in Figure 6, no signal was observed from 1) macrophages cultured next to hydrogel/Au electrodes without PMA and 2) cell-free devices that were infused with PMA dissolved in culture media.

CONCLUSÕES

PEG hydrogel micropatterning was employed to both fabricate HRP-containing electrochemical biosensors and to define living cell/biosensor interface. A microfluidic chamber served the purpose of a three-electrode electrochemical cell with HRP/hydrogel/Au electrodes serving as working electrodes. A microdevice with integrated H_2O_2 -sensing electrodes had sensitivity of 28 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ mM and lower limit of detection of 2 μM . Importantly, this microdevice allowed us to monitor H_2O_2 release from activated macrophages in real time.

AGRADECIMENTOS: The financial support for this study was provided by an NSF EFRI grant (0937997) and an NIH grant (CA126716) awarded to AR.

REFERÊNCIAS

- [1] SIMMONS R., *Free Rad Bio Med* 40: 917-921, 2006.
- [2] HALLIWELL B., *Biochem J* 401, 1-8, 2007.
- [3] PICARDI A., D'AVOLA D., GENTILUCCI U. V., *Diabetes Metab. Res. Rev.* 22: 274-281, 2006.
- [4] YAN J., PEDROSA V., SIMONIAN A., REVZIN A., *ACS Appl. Mater. Inter.* 2: 748-751, 2010.

POLYPYRROLE/PHYTASE AMPEROMETRIC BIOSENSORS FOR THE DETERMINATION OF PHYTIC ACID IN STANDARD SOLUTIONS

Valquíria da Cruz Rodrigues¹, Marli Leite de Moraes², André Brisolari¹, Juliana Coatrini Soares¹, Marystela Ferreira², Débora Gonçalves¹

¹Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369,13560-970, São Carlos, SP, Brazil; ²Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, CP 3031, 18043-970, Sorocaba, SP, Brazil. gdebora@ifsc.usp.br

ABSTRACT: Amperometric biosensors based on the physical immobilization of phytase (PhyA) into polypyrrole (PPy) films were prepared in aqueous medium. The PPy/PhyA films were characterized by cyclic voltammetry, and surface and structural characterization techniques, MEV and FTIR. Both voltammetric and amperometric transduction methods were used in order to detect phytic acid in acetate buffer at pH 5.5 at room temperature. The biosensors exhibited comparable sensitivity (a detection limit of 0.15 mmol L⁻¹) and a linear range of detection of phytic acid from 0.5 to 2.0 mmol L⁻¹, which are adequate values for typical analyses of phytic acids in most seeds, grains, and vegetables.

Keywords: Biosensors; phytase; polypyrrole; phytic acid detection.

INTRODUCTION

Phytase (*myo*-inositol hexaphosphate phosphohydrolase) (PhyA) catalyzes the hydrolysis of phytic acid (*myo*-inositol hexaphosphate or phytate) into phosphorous, which is an essential nutrient for animals [1]. Phytic acid is the main storage form of phosphorous in grain seeds, pollen, vegetables, and oilseeds, but it is also considered an antinutrient due to its chelation ability, binding dietary minerals such as magnesium, zinc, and calcium [2]. Monogastric animals, such as pig and poultry, and also humans, are not able to digest phytic acid because they lack sufficient amounts of the digestive enzyme. In this case, the unabsorbed phosphorus passes into the feces, and can be degraded by aquatic microorganisms, being one of the causes of eutrophication of water bodies downstream the rural areas. In order to alleviate adverse effects of high levels of phytic acid, the use of biosensors based upon immobilized PhyA in polymeric matrix has been an alternative of high interest and low cost for the detection of phytic acid.

In previous work, we have already shown the viability of using biosensors based on immobilization of PhyA onto LbL films [1], but the use of a polymeric matrix is an alternative for simpler and cheaper biosensors, in particular when they are miniaturized, thus requiring minimum sample amounts. The PPy/PhyA films were characterized by electrochemical measurements, scanning electron microscopy (SEM), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Phytase (PhyA) from *Aspergillus ficuum* (EC 3.1.3.8) (1.1 units g⁻¹, IP = 4,5) (Sigma-Aldrich) and phytic acid (*myo*-inositol hexaphosphate) (Synth) were used as received. Pyrrole (Sigma-Aldrich) was freshly distilled before use. PhyA and phytic acid solutions were prepared by using 0.1 mol L⁻¹ acetate buffer at pH 5.5.

The electropolymerization of pyrrole was performed by cyclic voltammetry using a potentiostat/galvanostat PAR Versastat II with a three-electrode cell: a saturated calomel electrode (SCE) as the reference electrode, a Pt disk as the working electrode, and a Pt plate as the counter electrode. The electrochemical deposition of polypyrrole (PPy) films was carried out by cyclic voltammetry from 0.0 to 0.8 V vs SCE at 50 mV s⁻¹ in an aqueous solution containing 0.07 mol L⁻¹ pyrrole and 0.1 mol L⁻¹ NaCl up to reach 10 complete cycles. For the PPy films obtained up to reach 10 cycles, we obtained a thickness of about 0.8 μm. Small numbers of cycles yielded thinner films, but not necessary homogeneous, and not totally covered surfaces. Much thicker films, on the other hand, would hinder ionic movements into the film and offer higher diffusion resistance of the analyte related to the polymeric matrix.

The freshly prepared PPy films were washed with water and a monomer-free electrolyte solution. After that, they were dipped into a PhyA solution at 0.2 mg mL⁻¹ at 40 °C, where were kept for 2 h; this procedure allowed us to physically immobilize PhyA into the PPy film. Previously, we verified that the immobilization of PhyA by the layer-by-layer technique occurred efficiently at about 40 °C [1]. This temperature has no direct effect on the enzymatic activity, since the optimum temperature of PhyA activity lies between 37 °C and 60 °C (at pH 5.5).

Chronoamperometry was used for the detection of phytic acid at a fixed potential of 0.0 V vs SCE. The current was monitored as a function of the time after successively adding aliquots of 50 μL of 0.1 mol L⁻¹ phytic acid at 10 mL acetate buffer at pH 5.5.

The morphology of the PPy and PPy/PhyA films on Au coatings was studied by scanning electron microscopy (SEM) (Digital Scanning Microscope, DSM 960, Zeiss West Germany). The infrared spectra of these films on Pt

substrates were obtained using a Thermo Nicolet – Nexus 470/FT-IR spectrophotometer from 400 cm^{-1} to 2000 cm^{-1} after 64 scans.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the electrochemical response of a PPy/PhyA film in 0.1 mol L^{-1} sodium acetate buffer at pH 5.5 containing different phytic acid concentrations. Between -0.2 V and -0.6 V vs. SCE, it is clearly evident that the current density increases with the phytic acid concentration (see the inset of Figure 1). A linear decay of the current density was observed from 0.5 mmol L^{-1} to 2.0 mmol L^{-1} of phytic acid; after that, a saturation regime is evident. These results indicate that the PPy/PhyA film can be used to detection of phytic acid up to reach a phytic acid concentration of 2.0 mmol L^{-1} .

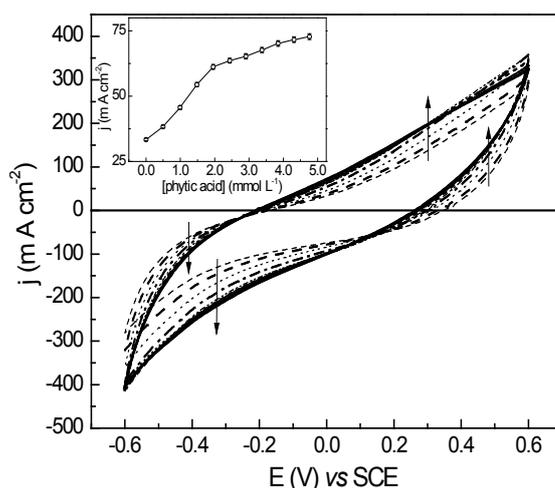


Figure 1: Amperometric response obtained at 0.0 V in an acetate buffer solution at pH 5.5 with PPy/PhyA film deposited onto Pt electrode. Each current variation corresponds to an increase of 50 μL phytic acid 0.1 mol L^{-1} in 10 mL of acetate buffer solution. Inset: Current variation as a function of phytic acid concentration.

The electrochemical responses of the PPy/PhyA biosensors are based on the monitoring of inorganic phosphorous, which is produced by the enzymatic reaction. Without the presence of the immobilized enzyme, no significant changes in the voltammetric responses are verified for the PPy film after adding phytic acid ranged from 0.0 to 4.0 mmol L^{-1} (about 9.5 % for the current densities obtained a fixed potential). For the PPy/PhyA film, the differences in current densities are higher than 54% as a strong evidence of the catalytic effect of the enzyme immobilized into the PPy matrix. After successive injections of phytic acid into the buffer solution, the PPy/PhyA film responded rapidly, and both anodic and cathodic currents varied. The substrate specificity of PhyA was also verified by using phenyl phosphate disodium salt, buffer, inositol, and dipalmitol phosphatidyl choline (DPPC); however, no significant changes in the current densities are obtained by using these solutions, which corroborates the conclusion that the PPy/PhyA film is only capable of detecting phytic acid and, consequently, free phosphorous ions.

Figure 2 shows the chronoamperometric curves for the PPy/PhyA film at a fixed potential of 0.0 V vs. SCE in 0.1 mol L^{-1} acetate buffer at pH 5.5. After adding successive aliquots of 0.1 mol L^{-1} phytic acid (50 μL each) in 10 mL of acetate buffer, the current density increased with the concentration of phytic acid up the fourth addition at 2.0 mmol L^{-1} . After that, the current density decays abruptly as it can be expected due to a saturation effect of the active sites of PhyA due to the presence of phytic acid.

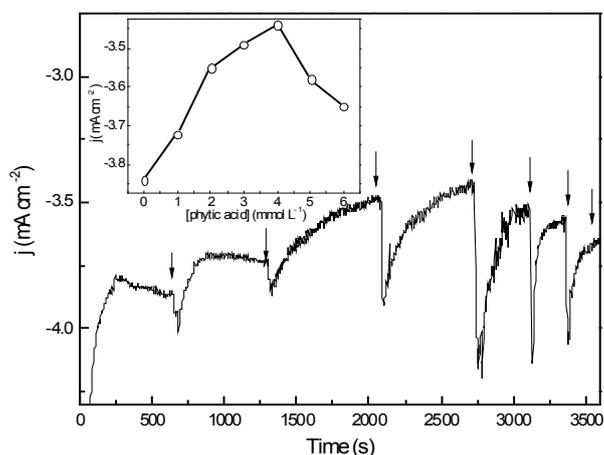


Figure 2: Amperometric response obtained at 0.0 V in an acetate buffer solution at pH 5.5 for a PPy/PhyA film deposited onto a Pt electrode. Each current variation corresponds to an increase of 50 μL phytic acid 0.1 mol L^{-1} in 10 mL of acetate buffer solution. Inset: Current variation as a function of phytic acid concentration.

We verified that both methods (voltammetric and amperometric detections) show good performances in detecting phytic acid by using the PPy/PhyA films. The detection limit obtained for these films was 0.15 mmol L^{-1} (three times the noise), with a linear range between 0.5 and 2.0 mmol L^{-1} of phytic acid at a low operating potential. The Pt electrode used for the electrodeposition of the PPy/PhyA films is reusable and requires only the presence of PhyA and pyrrole in the electrolyte solution, decreasing costs and fabrication steps.

The PPy and PPy/PhyA films were also studied by scanning electron microscopy (SEM). The PPy matrix showed a typical morphology, with a spheroid structure and dispersed spheres with sizes of *ca* $0.4\text{ }\mu\text{m}$. For the PPy/PhyA film, the nodular structure from the polymeric matrix was maintained, but a narrower distribution of smaller sphere sizes of *ca* $0.15\text{ }\mu\text{m}$ was also evident. Besides, the spheres are distributed more uniformly over the surface of the PPy/PhyA film as an indicative of the presence of immobilized PhyA on smooth PPy/PhyA films.

The immobilization of PhyA into the PPy matrix was confirmed by the presence of sharp peaks shifted in the IR spectra of the PPy/PhyA film. The peak at 1700 cm^{-1} , attributed to the presence of carbonyl groups in the PPy structure, was seen for the PPy/PhyA film with a low intensity, indicating a slightly overoxidized PPy structure. The changes in the spectra of the PPy and PPy/PhyA films evidenced the occurrence of electrostatic interactions between negatively charged PhyA (IP 4.5) and a positively charged PPy matrix.

CONCLUSIONS

PPy/PhyA biosensors were successfully fabricated by the electrochemical synthesis of a PPy matrix with physically immobilized PhyA. We obtained for the PPy/PhyA film a detection limit of 0.15 mmol L^{-1} and a linear range of concentrations between 0.5 and 2.0 mmol L^{-1} of phytic acid. These results indicated that the PPy/PhyA biosensors are an alternative for the detection of phytic acid in real samples with relatively low costs and at low operating potentials.

ACKNOWLEDGEMENTS: FAPESP, CAPES e CNPq.

REFERENCES

- [1] Moraes M. L., Oliveira Jr. O. N., Rodrigues Filho U. P., and Ferreira M., "Phytase immobilization on modified electrodes for amperometric biosensing". *Sensors and Actuators B* 131, 210-215 (2008).
- [2] Nagashima T., Tangué T. and Anazaw H., "Dephosphorylation of Phytate by Using the *Aspergillus Niger* Phytase with a High Affinity for Phytate". *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4682-4684 (1999)

NANOTUBOS DE CARBONO MODIFICADO COM FILME DE RuOHCF PARA A DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Roselyn C. Peña¹ e Mauro Bertotti¹

¹ Instituto de Química - Universidade de São Paulo – SP - Brasil. roselyn@usp.br

RESUMO: O presente trabalho relata um novo tipo de nanocompósito de hexacianoferrato de óxido de rutênio (RuOHCF) preparado com nanotubos de carbono (CNTs), imobilizados em eletrodos de carbono vítreo (CV) empregando-se diferentes proporções de CNTs e RuOHCF. Estes nanocompósitos foram fabricados pela funcionalização dos nanotubos de carbono com filmes de RuOHCF e os eletrodos modificados foram caracterizados por voltametria cíclica e amperometria. Com o sensor fabricado foi possível evidenciar processo de eletrocatalise da redução de peróxido de hidrogênio em baixo potencial (0,0 V). Empregando-se a estrutura otimizada obteve-se curva analítica em uma faixa de concentração de peróxido de hidrogênio de 10 a 1736 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 2,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 0,9993$) ($S/N = 3$).

Palavras-chave: Peróxido de hidrogênio, CNTs, eletrodo modificado.

INTRODUÇÃO

Os nanotubos de carbono (CNTs) são materiais promissores e foram reconhecidos como blocos de construção atraentes para a realização de inúmeras aplicações nanotecnológicas [1]. Os CNTs possuem alta condutância, resistência à tração, estabilidade química e tamanho reduzido, características que os tornam candidatos potenciais para o desenvolvimento de sensores e biossensores. Os CNTs podem ser divididos em duas categorias: (i) nanotubos de parede única ou simples (SWNT, do inglês single-wall nanotubes), que são constituídos por apenas uma camada cilíndrica de grafite, e (ii) nanotubos de paredes múltiplas (MWNT, do inglês multi-walls nanotubes), que são constituídos de vários cilindros concêntricos de grafite, espaçados de 0,34-0,36 nm um do outro [2]. As propriedades eletrônicas desses materiais têm sido exploradas para promover reações de transferência de elétrons para uma ampla gama de espécies de relevância biológica, incluindo DNA, proteínas, peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico. A imobilização de moléculas e biomoléculas com CNTs tem sido perseguida há vários anos com o intuito de melhorar a eficiência dos sensores fabricados.

A eletrodeposição de filmes tem se tornado uma ferramenta poderosa no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Filmes de hexacianoferratos (HCFs) são compostos que possuem excelente propriedade de transferência de elétrons. Observou-se, entretanto, que estes filmes eram pouco duráveis e investigações envolvendo a incorporação de íons Ru(III) nos filmes de hexacianoferratos demonstraram a minimização do processo de solubilização, pois a formação de uma ligação Ru-O-Fe contribui para a imobilização de um material mais insolúvel na superfície eletródica, com consequente aumento de estabilidade química e eletroquímica sem perdas das características electrocatalíticas [3,4]. A associação entre o filme de RuOHCF e os CNTs pode representar uma nova plataforma de detecção para a determinação de peróxido de hidrogênio. Portanto, o objetivo do presente trabalho será estudar as propriedades eletroquímicas de eletrodo de carbono vítreo modificado com CNTs e filme de RuOHCF no que diz respeito à redução electrocatalítica do peróxido de hidrogênio.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados empregando-se um bipotenciostato da Autolab PGSTAT 30 (Eco Chemie) com um software para aquisição dos dados disponibilizado pelo fabricante (GPES versão 4,8), e uma célula eletroquímica com 3 eletrodos: eletrodo de platina como auxiliar, eletrodo Ag/AgCl(KCl sat) como referência e carbono vítreo (CV) como eletrodo de trabalho. As soluções foram preparadas por dissolução dos reagentes em água desionizada processada com um sistema de purificação (Nanopure Infinity, Barnstead). As soluções de H_2O_2 e HCl foram preparadas pela diluição dos reagentes concentrados. Nanotubos de carbono (CNTs) foram obtidos da NanoLab, USA, com 95% de pureza, 30 ± 10 nm de diâmetro e 1-5 μm de comprimento. Os MWCNTs funcionalizados foram dispersados em dimetilformamida e logo imobilizados na superfície do eletrodo de CV. Trabalhou-se com três eletrodos modificados preparados de maneiras diferentes: 1) o filme de RuOHCF foi eletrodepositado na superfície do eletrodo de CV (CV/RuOHCF), 2) o eletrodo de CV foi modificado com 0,05 μg de CNTs para logo em seguida depositar-se o filme de RuOHCF (CV/CNTs(A)/RuOHCF) e 3) o eletrodo de CV foi modificado com 0,10 μg de CNTs para logo em seguida depositar-se o filme de RuOHCF (CV/CNTs(B)/RuOHCF).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O filme de RuOHCF foi eletrodepositado sobre os CNTs por voltametria cíclica a partir de uma solução recém preparada de KCl 0,5 mol L⁻¹, HCl 0,05 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 1 mmol L⁻¹ e RuCl₃ 1 mmol L⁻¹, executando-se 120 ciclos de varredura (-0,5 a 1,3 V a 100 mV s⁻¹) (Figura 1A). Pode-se observar na Figura 1A que houve um aumento progressivo no sinal de corrente durante o experimento, como consequência da imobilização do material eletroativo na superfície do eletrodo.

Os pares redox do filme devem-se aos processos de transferência de elétrons entre as espécies Ru(II)/Ru(III)/Ru(IV) e Fe(II)/Fe(III). A densidade de corrente observada neste experimento é maior do que a reportada na literatura quando se trabalha na ausência de CNTs [5], devido à maior área superficial obtida pela funcionalização da superfície com os CNTs. Pode-se observar na Figura 1B um aumento linear da corrente de pico com o aumento da velocidade de varredura no eletrodo RuOHCF/CNTs(B)/CV, comportamento típico de processos eletródicos que ocorrem com material imobilizado na superfície do eletrodo.

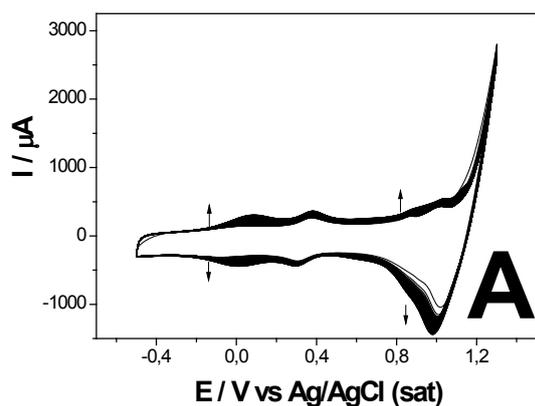


Figura 1. Voltamogramas cíclicos registrados durante a modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo com CNTs em solução contendo: KCl 0,5 mol L⁻¹, HCl 0,05 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 1 mmol L⁻¹ e RuCl₃ 1 mmol L⁻¹, v: 100 mV s⁻¹ (A). Relação linear entre a velocidade de varredura em função da corrente medida em 0,0 V, utilizando-se o eletrodo RuOHCF/CNTs(B)/CV (B).

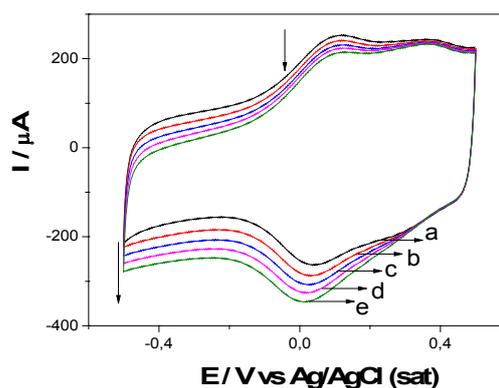


Figura 2. Voltamogramas cíclicos registrados utilizando o eletrodo modificado RuOHCF/CNTs(B)/CV na ausência (a) e presença de peróxido de hidrogênio (b-e) (concentração final 0,9 (b), 1,6 (c), 2,3 (d) e 2,8 (e) mmol L⁻¹). Eletrólito suporte KCl 0,5 mol L⁻¹, HCl 0,05 mol L⁻¹, v: 100 mV s⁻¹

A Figura 2 mostra os voltamogramas cíclicos realizados com o eletrodo CV/CNTs(B)/RuOHCF na ausência e presença de peróxido de hidrogênio. Na ausência de peróxido de hidrogênio é observado o comportamento eletroquímico reversível do filme de RuOHCF depositado no nanocompósito (Fig. 2 a). Após a adição de peróxido de hidrogênio nota-se o aumento da corrente catódica em potenciais próximos a 0,0 V devido à redução electrocatalítica do peróxido de hidrogênio na presença dos centros de Ru(II)/Ru(III). Também é possível observar que o pico de oxidação diminui por causa do consumo químico da espécie reduzida de rutênio pelo peróxido de hidrogênio (Fig. 2 b-e). Estes resultados sugerem que o eletrodo de CV/CNTs(B)/RuOHCF possui uma eficiente atividade electrocatalítica para a redução de peróxido de hidrogênio, a qual permite a detecção do analito em potenciais menos suscetíveis a interferências.

Na Figura 3 mostram-se curvas analíticas para os diferentes eletrodos modificados em um intervalo de concentração de peróxido de hidrogênio de 0,1 a 1,75 mmol L⁻¹ em solução de eletrólito suporte (KCl 0,5 mol L⁻¹ e HCl 0,05 mol L⁻¹) em experimentos realizados a 0,0 V. Pode-se observar que o eletrodo CV/CNTs(B)/RuOHCF apresentou a maior sensibilidade, justificada pela presença de maior quantidade de CNTs. Este eletrodo modificado foi também o que apresentou menores limites de detecção e quantificação (Tabela 1). Curva analítica foi obtida em faixa de concentração mais larga com o eletrodo CV/CNTs(B)/RuOHCF (10 a 1736 µmol L⁻¹).

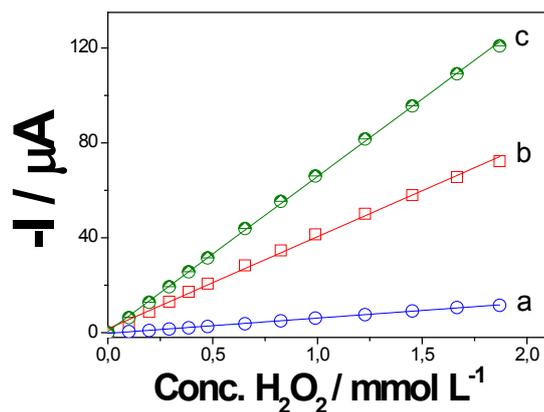


Figura 3. Curvas analíticas para peróxido de hidrogênio obtidas a partir dos dados amperométricos utilizando diferentes eletrodos modificados, $E=0V$. CV/RuOHCF (a), CV/CNTs(A)/RuOHCF (b) e CV/CNTs(B)/RuOHCF (c).

Tabela 1. Limites de detecção e quantificação para a determinação de peróxido de hidrogênio com os diferentes eletrodos modificados.

Eletrodo	L.D $\mu\text{mol L}^{-1}$	L.Q $\mu\text{mol L}^{-1}$
CV/RuOHCF	28,5	95,1
CV/CNTs(A)/RuOHCF	4,2	14,3
CV/CNTs(B)/RuOHCF	2,1	7,1

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que filmes de RuOHCF imobilizados em eletrodos de CV juntamente com CNTs constituem-se em plataformas mais eficientes para o processo de redução catódica do peróxido de hidrogênio, especialmente pelo aumento da área superficial com consequente melhoria na eficiência da etapa de transferência de elétrons. Com o filme de RuOHCF depositado na superfície do CNTs (CV/CNTs(B)/RuOHCF) são obtidas respostas lineares para peróxido de hidrogênio em potencial imune a várias interferências (0,0 V) em larga faixa de concentração e com baixo limite de detecção.

AGRADECIMENTOS: CAPES, FAPESP, CNPq e ao professor Christopher Brett, da Universidade de Coimbra, pelo fornecimento dos CNTs.

REFERÊNCIAS

- [1] HARRIS P., “Carbon Nanotubes and Related Structures: New Materials for the Twenty-First Century”, Cambridge: Cambridge University Press), pp. 3-4, 2001.
- [2] REICH S., THOMSEN C. and MAULTZSCH J., “Carbon Nanotubes: Basic Concepts and Physical Properties” : Weinheim: Wiley-VCH, pp. 4-5, 2004.
- [3] PAIXÃO T. R. L. C. AND BERTOTTI M., “Electrocatalytic oxidation of deoxyguanosine on a glassy carbon electrode modified with a ruthenium oxide hexacyanoferrate film”, *Electrochim. Acta.* 52 (5): 2181-2188, 2007.
- [4] PAIXÃO T. R. L. C. AND BERTOTTI M., “FIA determination of ascorbic acid at low potential using a ruthenium oxide hexacyanoferrate modified carbon electrode”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (3): 528-533, 2008.
- [5] ROSELYN C. PEÑA, JUAN C.M. GAMBOA, PAIXÃO T. R. L. C. AND BERTOTTI M., “Flow injection amperometric determination of hydrogen peroxide in household commercial products with a ruthenium oxide hexacyanoferrate modified electrode”, *Microchim Acta* 3 (166): 277-281, 2009.

PREPARAÇÃO E APLICAÇÃO DA P-BENZOQUINONA IMOBILIZADA EM UM ELETRODO MODIFICADO CA/TiO₂/Sb₂O₅ PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Andrea Anilda Hoffmann da Rocha¹, Silvio Luis Pereira Dias¹, Jacqueline Arguello¹ e Elisângela Pires Bueno¹ e Lauro Tatsuo Kubota²

¹Instituto de Química - UFRGS, Porto Alegre - RS - Brasil;

²Instituto de Química - UNICAMP, Campinas - RS - Brasil. deiaahoffmann@gmail.com

RESUMO: Neste trabalho, foram investigadas as propriedades eletroquímicas da p-benzoquinona immobilizada em um novo material compósito a base de acetato de celulose e os óxidos de titânio e antimônio. O material com a p-benzoquinona immobilizada foi incorporado a um eletrodo de pasta de carbono e a propriedade redox da espécie eletroativa foi estudada por voltametria cíclica. Através do estudo da estabilidade observou-se que após 100 ciclos consecutivos não ocorreu lixiviação da espécie eletroativa indicando que a mesma está fortemente aderida na superfície da matriz. O material resultante CA/TiO₂/Sb₂O₅BQ foi aplicado na eletro-oxidação de ácido ascórbico e mostrou-se eficiente na sua determinação em drogas comerciais. A influência de interferentes como ácido úrico, dopamina, glicose e NADH na análise de ácido ascórbico foi estudada por voltametria de pulso diferencial.

Palavras-chave: acetato de celulose, p-benzoquinona, ácido ascórbico.

INTRODUÇÃO

O acetato de celulose (CA) é um biopolímero termoplástico que pode ser facilmente moldado em diferentes formas como membranas, fibras ou pérolas. O acetato de celulose é usado na preparação de materiais híbridos, pois apresenta vantagens como baixo custo, alta disponibilidade e facilidade de manuseio [1]. A incorporação de partículas de óxidos metálicos na matriz de acetato de celulose pode produzir materiais poliméricos híbridos com ligações entrelaçadas com alta resistência química e mecânica e, também com um alto grau de dispersão das partículas do óxido [2]. Além disso, permitem a incorporação de espécies eletroativas, possibilitando o desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados.

Neste trabalho, p-benzoquinona (BQ) foi immobilizada sobre uma matriz de celulose contendo os óxidos de titânio (TiO₂) e pentóxido de antimônio (Sb₂O₅) e utilizado na preparação de eletrodos de pasta de carbono para determinação de ácido ascórbico. Os óxidos foram incorporados com o intuito de intensificar na matriz de acetato de celulose as propriedades de troca iônica e as propriedades condutoras melhorando as características do material final.

Ácido ascórbico (H₂AA) ou Vitamina C está presente em muitos sistemas biológicos, em suplementos dietéticos, e também em alimentos como antioxidante para estabilizar a cor e o aroma estendendo a validade do produto. Sendo assim, o desenvolvimento de métodos simples e rápidos para a quantificação de ácido ascórbico é importante. A eletro-oxidação direta de ácido ascórbico em eletrodos de metal ou carbono requer um sobrepotencial elevado [3]. Além disso, frequentemente são observados interferentes de outras espécies com potenciais muito próximos como é o caso do ácido úrico (AU) e da dopamina (DA), que também estão presentes em fluidos biológicos. O efeito destes e outros interferentes também são avaliados neste estudo [4].

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O material CA/TiO₂ foi preparado pelo método de inversão de fase descrito na literatura [3]. Aproximadamente 5 g de CA/TiO₂ contendo 10,1 % m/m de TiO₂ foi imerso em 25 ml de solução ácida (HCl 3,0 mol L⁻¹) contendo 2,5 mL SbCl₅ (99 % Aldrich) e a mistura foi agitada por 2 horas à temperatura ambiente. O sólido designado CA/TiO₂/Sb₂O₅ foi filtrado e lavado primeiramente com solução de HCl 1,0 mol L⁻¹ e posteriormente com água deionizada. A adsorção de p-benzoquinona foi promovida deixando 0,5 g de CATiSb em 10 mL de uma solução 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de p-benzoquinona sob agitação durante 30 minutos. O solvente foi evaporado a temperatura ambiente por três dias e o sólido final obteve uma coloração amarelada clara e fibrosa.

Eletrodos de pasta de carbono modificados com CA/TiO₂/Sb₂O₅ e CA/TiO₂/Sb₂O₅BQ foram preparados pela mistura de grafite em pó (Fluka, grau 99,9%) na proporção 1:1 (m/m) utilizando uma gota de óleo mineral (Nujol).

Os estudos eletroquímicos foram realizados em um potenciostato-galvanostato da Iviumstat interfaciado a um microcomputador para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados. Foi utilizado um sistema de três eletrodos: um fio de platina como contraeletrodo, um eletrodo de calomelano saturado (ECS) como eletrodo de referência e os eletrodos modificados como eletrodos de trabalho. Os experimentos foram realizados em solução tampão Britton-Robinson (B-R) previamente desaeurada com argônio. A resposta do eletrodo modificado com CA/TiO₂/Sb₂O₅BQ para ácido ascórbico foi avaliada utilizando-se as técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso

diferencial e cronoamperometria. Uma curva de calibração foi construída através de adições crescentes de uma solução padrão de ácido ascórbico. A curva de calibração obtida foi utilizada para a determinação de ácido ascórbico em pastilhas de Vitamina C. As soluções foram preparadas na mesma hora do experimento, acondicionadas em um frasco escuro e tampadas para evitar o contato com a luz e o ar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O voltamograma cíclico do eletrodo de pasta de carbono modificado com $CA/TiO_2/Sb_2O_5$ não apresentou onda voltamétrica relevante como mostrado na Figura 1, curva A, enquanto que foram observadas claramente ondas voltamétricas, curva B, para o eletrodo modificado com $CA/TiO_2/Sb_2O_5BQ$.

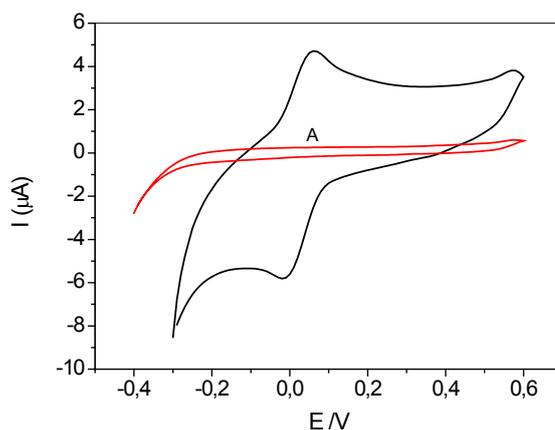


Figura 1: Voltamogramas cíclicos do eletrodo $CA/TiO_2/Sb_2O_5$ (A) e do eletrodo modificado $CA/TiO_2/Sb_2O_5BQ$ (B). Tampão Britton-Robinson e velocidade de varredura 20 mV s^{-1} .

O potencial médio ($E_m = E_{pa} + E_{pc}/2$) em que E_{pa} é o potencial de pico anódico e E_{pc} o potencial de pico catódico, foi $21,5 \text{ mV}$. A estabilidade do eletrodo de trabalho foi testada medindo-se os valores das correntes anódica e catódica em função do número de ciclos. Os resultados mostraram que não ocorre variação significativa após 100 ciclos redox. As intensidades de corrente de pico permaneceram praticamente constantes.

Isso indica que a p-benzoquinona está fortemente adsorvida a superfície do eletrodo não ocorrendo lixiviação ou decomposição durante o experimento. A estabilidade observada para o eletrodo modificado $CA/TiO_2/Sb_2O_5BQ$ indica que pode ser utilizado como sensor eletroquímico.

O estudo da influência do pH na oxidação do H_2AA revelou que as intensidades das correntes de oxidação não sofreram alterações consideráveis do pH na faixa de 2 a 7.

Para estudar as propriedades electrocatalíticas do eletrodo $CA/TiO_2/Sb_2O_5BQ$ foi empregado o ácido ascórbico (AA). Pode-se observar na Figura 2 que a oxidação do ácido ascórbico ocorre em torno de 51 mV .

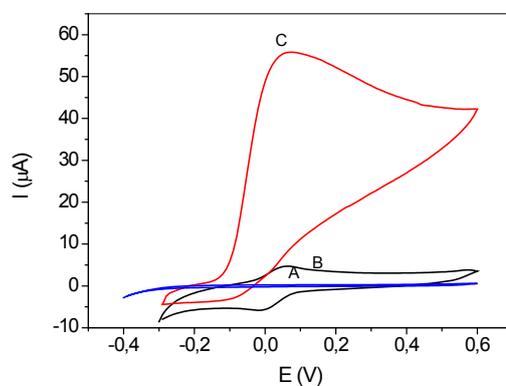


Figura 2: Voltamogramas cíclicos em tampão B-R pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} . (A) $CA/TiO_2/Sb_2O_5$ na ausência de H_2AA , (B) $CA/TiO_2/Sb_2O_5BQ$ na ausência de H_2AA e (C) $CA/TiO_2/Sb_2O_5BQ$ na presença de $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2AA .

Uma curva de calibração de corrente *versus* [H₂AA] foi construída a partir de dados obtidos através de cronoamperometria. O potencial escolhido para realizar a eletro-oxidação em tampão B-R pH 7,0 foi 300 mV. A Figura 3(A) mostra a resposta obtida através de sucessivas adições de ácido ascórbico. Uma relação linear na faixa de concentrações compreendida entre $1,5 \times 10^{-5}$ e $2,90 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foi constatada (B).

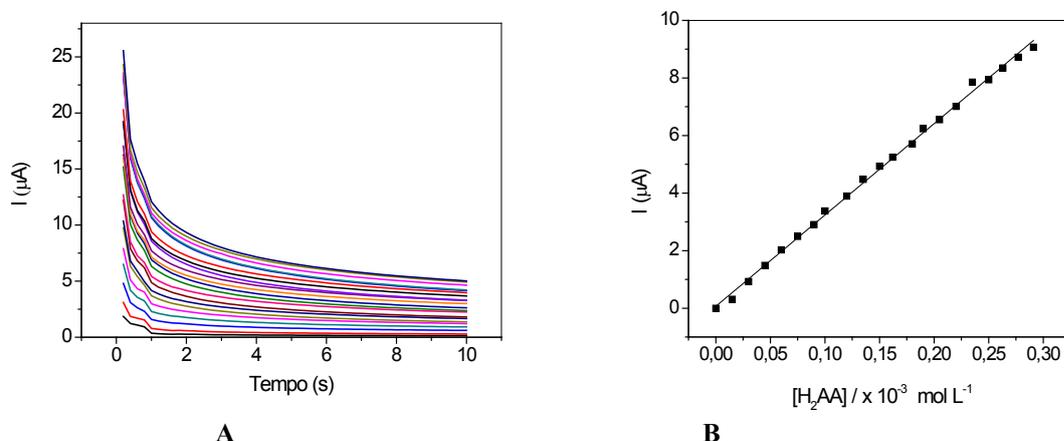


Figura 3: Estudo cronoamperométrico para o eletrodo CA/TiO₂/Sb₂O₅BQ em tampão Britton-Robinson pH 7,0 (A). Gráfico da corrente versus [H₂AA] (B). $E_{\text{pa}} = 300 \text{ mV VS ECS}$.

Foi observado que quatro possíveis interferentes do ácido ascórbico em ambientes biológicos puderam ser identificados separadamente nas correspondentes faixas de concentração estudadas: ácido úrico (0,112 - 0,155 $\mu\text{mol L}^{-1}$), dopamina (0,0474 - 0,187 $\mu\text{mol L}^{-1}$), glicose (0,001 - 0,010 $\mu\text{mol L}^{-1}$), NADH (0,0240 - 0,140 $\mu\text{mol L}^{-1}$), claramente não modificaram a intensidade de pico anódico do H₂AA 0,500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R pH 7,0.

CONCLUSÕES

As propriedades electrocatalíticas do eletrodo modificado CA/TiO₂/Sb₂O₅BQ para oxidar ácido ascórbico são bastante satisfatórias e o sistema apresenta uma boa sensibilidade e seletividade para o ácido ascórbico.

AGRADECIMENTOS: CAPES e CNPq pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

- [1] GUSHIKEM Y., TOLEDO E.A.; “*Preparation of oxide-coated cellulose fibres Polymer*”, Polymers Interfaces and Emulsions, K. Esumi, Marcel Dekker Inc, New York, 1999.
- [2] RODRIGUES U. P. F., GUSHIKEM Y., GONÇALVES M. D., CACHICHI R. C., CASTRO S. C. Chem Mater. 8, 1996, 1375.
- [3] HOFFMANN A. A., “*Imobilização de Corantes no Material Híbrido Acetato de Celulose – Óxido de Titânio: Algumas Aplicações Eletroanalíticas*”, Dissertação de Mestrado. UFRGS. Porto Alegre, 2006.
- [4] ZARE H. R., NASIRIZADEH N., MAZLOUM ARDAKANI M., *J. Electroanal. Chem.* 577, 2005, 25-33.

SENSOR BIOMIMÉTICO DESCARTÁVEL PARA DETERMINAÇÃO SELETIVA DE HIDROQUINONA

Thayz Cristina Boni (PG) e Maria Del Pilar T. Sotomayor (PQ)

Instituto de Química - UNESP, Araraquara - SP – Brasil. tcboni@yahoo.com.br

RESUMO: Este trabalho mostra a construção de um sensor biomimético sensível à detecção de hidroquinona visando aplicação em cosméticos e em amostras de interesse ambiental. Para tal, o complexo cloreto de tris(bipiridina)cobre (II), $[Cu(bipy)_3]Cl_2$, catalisador biomimético da enzima tirosinase (Tyr), foi imobilizado na superfície de um eletrodo microimpresso comercial de grafite, na forma de um filme de Nafion®. As condições otimizadas para a resposta do sensor foram obtidas em tampão Pipes $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,50) contendo $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 e aplicando um potencial de -300 mV vs $Ag|AgCl, KCl_{sat}$. Nessas condições de análise, o sensor mostrou resposta linear entre $6,0 \times 10^{-5}$ e $5,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, e limites de detecção e quantificação de $5,4 \times 10^{-6}$ e $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave: Hidroquinona, eletrodo impresso, cloreto de tris(bipiridina)cobre II, sensores biomiméticos.

INTRODUÇÃO

Sensores biomiméticos são dispositivos nos quais um eletrodo é modificado com uma substância redox (catalisador biomimético) que possui estrutura análoga à do sítio ativo de metalo-enzimas executando os mesmos processos catalíticos, porém não necessariamente seguindo o mesmo caminho. Desta forma, complexos de metais de transição podem ser estudados com a finalidade de avaliar seu potencial na mimetização de diversas enzimas, cuja estrutura do sítio ativo, química da catálise enzimática e mecanismo de reação sejam bem conhecidos [1], podendo ser usados compostos organometálicos de estrutura simples, estáveis e de menor custo que os modelos biológicos.

Por outro lado, o desenvolvimento de eletrodos impressos “screen-printed electrode” (SPE) abriu a possibilidade de desenvolver dispositivos de baixo custo, permitindo obter plataformas sensores descartáveis.

Assim, aliando a estratégia de construção de sensores biomiméticos com a possibilidade de modificação de eletrodos impressos, se abre a possibilidade de desenvolvimento de dispositivos de análise, que além de possuírem alta seletividade e apresentar a robustez desejada para aplicação real em matrizes de amostras onde materiais biológicos tenderiam a desnaturar, pode-se obter uma estratégia experimental para a produção em massa de diversos tipos de sensores.

Pensando nisto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um sensor biomimético à base de um eletrodo impresso de grafite modificado com complexo biomimético à enzima tirosinase, cloreto de tris-2,2'-bipiridil cobre II, para a determinação sensível e seletiva de hidroquinona em cosméticos e efluentes.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente, o SPE de grafite (FS-1, Florence sensors®) foi modificado pela aplicação de filme de Nafion® dopado com solução do complexo cloreto de tris-2,2'-bipiridil cobre II $\{[Cu(Dipy)_3]Cl_2 \cdot 6H_2O\}$. Para a preparação das membranas sensoras, a solução do complexo em dimetilformamida (DMF) foi misturada com a solução alcoólica a 5% de Nafion®, colocada na superfície do SPE e deixada secar à temperatura ambiente, para permitir a formação da membrana na superfície do eletrodo.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em potenciostato da marca Palm Sense□, da Palm Instruments BV (Holanda) em cela eletroquímica de três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho o SPE modificado, e os eletrodos de referência e auxiliar o de $Ag|AgCl, KCl_{sat}$ (Analion®) e uma espiral de platina, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, experimentos com o eletrodo sem o complexo na membrana de Nafion® foram realizados para comparar o comportamento do sensor contendo o complexo biomimético. Os perfis voltamétricos indicaram que quando usado o complexo $[Cu(dipy)_3]Cl_2 \cdot 6H_2O$ (Figura 1), grandes sinais de corrente de redução são visivelmente obtidas, mostrando a importância da presença deste composto na catálise da hidroquinona (HQ). Os resultados mostram que o perfil de resposta do sensor para HQ é visivelmente catalítica, tal como esperado, uma vez que já é conhecida a mimetização da enzima tirosinase por este complexo cúprico [2] além de demonstrar a dependência do uso do complexo de cobre na membrana sensora. Adicionalmente, para reforçar a tese que o processo é catalítico, foi realizado um estudo de variação da corrente de pico catódica em função da velocidade de varredura, e pelo gráfico mostrado na Figura 1b, pode-se observar que a resposta do sensor é governada por um processo difusional, tal como esperado.

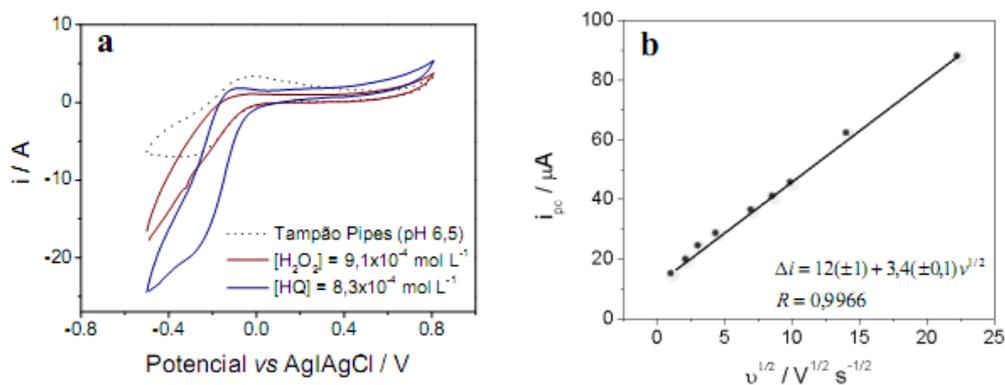


Figura 1. a) Voltametria cíclica usando SPE modificado com $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Medidas realizadas a velocidade de varredura 20 mV s^{-1} . **b)** Variação da corrente de pico catódica (i_{pc}) vs $v^{1/2}$ no sensor impresso modificado com o complexo $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Estudos foram realizados para otimizar a resposta do sensor e os melhores resultados foram obtidos em solução tampão Pipes $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a $\text{pH} = 6,50$, contendo peróxido de hidrogênio e aplicando potencial de -300 mV vs $\text{Ag}|\text{AgCl}, \text{KCl}_{\text{sat}}$. A Figura 2, mostra o perfil de resposta do sensor e a respectiva curva analítica.

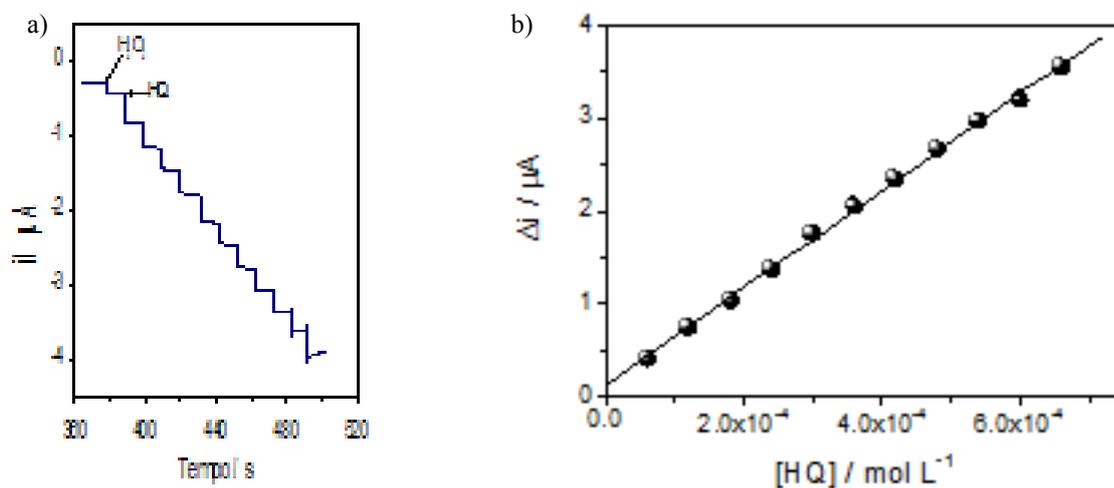


Figura 2. a) Amperograma do SPE modificado com complexo $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; **b)** Curva analítica obtida.

Os dados mostrados na curva analítica da Figura 2a foram ajustados pela equação da reta a seguir (eq. 1) com um coeficiente de correlação linear (R) de $0,99932$ ($n = 11$) em uma faixa de resposta entre $6,0 \times 10^{-5}$ e $5,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

$$\Delta i / \mu\text{A} = 0,3 (\pm 0,0) + 5224 (\pm 6) [\text{HQ}] / \text{mol L}^{-1} \quad (\text{eq. 1})$$

A repetibilidade nas medidas e a reprodutibilidade na construção dos sensores, foram avaliadas através do valor do desvio padrão relativo (RSD), obtendo-se valores de $3,0\%$ ($n = 7$) e $2,3\%$ ($n = 3$) com base nos valores obtidos das sensibilidades de diversas curvas analíticas. A alta reprodutibilidade na construção dos sensores garantem seu uso como dispositivos descartáveis, sem perdas consideráveis da qualidade dos resultados a serem obtidos. Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as normas previstas pela ANVISA [3], obtendo-se os valores de $5,4 \times 10^{-6}$ e $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. O tempo estimado de vida do sensor foi de três dias, onde ainda mantém 95% da sensibilidade inicialmente observada, e após uma semana de uso contínuo, a resposta mantida corresponde ao 20% do valor inicial, o que não prejudica o uso deste sensor, pois o mesmo está sendo avaliado como dispositivo descartável.

Após avaliadas as características analíticas do sensor proposto, a seguir foram avaliadas as características biomiméticas. Na Figura 3a, mostra-se o perfil hiperbólico do sensor para HQ, o qual tal como esperado, foi análogo aos biossensores enzimáticos convencionais. A constante aparente de Michaelis-Menten, foi calculada a partir do gráfico do duplo recíproco, sendo obtido um valor de $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, que indica uma forte afinidade deste complexo

pelo analito estudado. A seguir, foi avaliada a seletividade do sensor para diversos compostos fenólicos, catecólicos e quinônicos e os resultados obtidos são mostrados na Figura 3b, na qual pode ser observada uma alta seletividade para HQ.

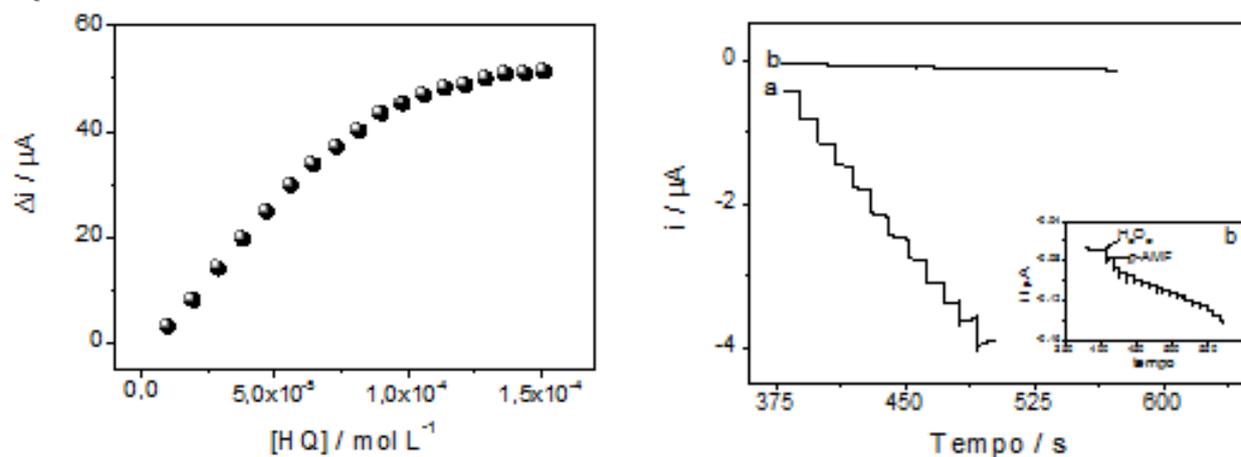


Figura 3. A) Perfil hiperbólico do sensor. B) Perfil da seletividade do sensor: a) resposta para HQ e b) resposta para *p*-aminofenol (*p*-AMF). Na figura inserida mostra-se amplificada a resposta para *p*-AMF. Medidas realizadas em potencial de -300 mV em solução tampão pipes contendo 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 e sucessivas adições de 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de analito.

CONCLUSÃO

Os resultados até aqui obtidos viabilizam os eletrodos impressos de grafite modificados com solução de Nafion® e complexo de $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ como ferramentas a serem aplicadas em análises sensíveis e seletivas para detecção de HQ. Atualmente, está sendo realizada a aplicação do sensor em águas de efluentes e cosméticos.

REFERÊNCIAS

- [1] Sotomayor, M.D.P.T.; Kubota, L. T.; Quim. Nova 2002, 25, 123.
- [2] Sotomayor, M.D.P.T.; Tanaka, A.A.; Kubota, L.T.; Electrochimica Acta 2003, 48, 855.
- [3] www.anvisa.gov.br, Diário da República nº 271 Série I Parte B de 22/11/1997, Portaria nº 1192/97 de 22-11-1997: ANEXO - Métodos de análise necessários ao controle da composição dos produtos cosméticos e de higiene corporal – Ensaio; CAPÍTULO XXXV, acesso em 07/04/2010.

ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF DOPAMINE BASED ON SELF-ASSEMBLED PEPTIDE NANOSTRUCTURE

Iorquirene de Oliveira Matos,^{a,b} Wendel Andrade Alves^{a,b}

^aCentro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, 09210-170, Santo André, SP, Brazil. ^bInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, 13083-970, P.O. Box 6154, Campinas, SP, Brazil. wendel.alves@ufabc.edu.br

Abstract: In this work, we described the formation of *L*-diphenylalanine nanotubes (PNTs) with cyclic-tetrameric copper(II) species containing the ligand (4-imidazolyl)ethylene-2-amino-1-ethylpyridine $[\text{Cu}_4(\text{apyhist})_4]^{4+}$ in the Nafion[®] membrane on a glassy carbon electrode surface. The electrochemical properties of the PNT- $[\text{Cu}_4(\text{apyhist})_4]^{4+}$ /Nafion[®] film on a GC electrode were characterized using cyclic voltammetry (CV) and square-wave voltammetry (SWV) and showed high electrocatalytic activity towards the oxidation of dopamine (DA). Under the optimum conditions, the peak DA current was linear over DA concentrations from 5×10^{-6} to 50×10^{-6} mol L⁻¹. The detection limit was 0.87×10^{-6} mol L⁻¹ (S/N=3), and ascorbic acid did not interfere with the DA detection.

Keywords: *L*-diphenylalanine nanostructures, copper(II) complexes, biomimetic sensors, dopamine.

INTRODUCTION

The self-assembly of organic nanostructures and hybrid materials relies on noncovalent and reversible interactions, such as hydrogen bonding, metal coordination, hydrophobic effects, van der Waals forces, π - π interactions and electrostatic interactions. When combined, these forces form organized, complex entities based on the association of the self-assembling components. The specificity of and the selectivity provided by both natural and artificial biomolecules makes them well-suited for this task and offers a way to design complex nanoscale assemblies.

Recently, a novel biosensor for hydrogen peroxide was developed by combining the known properties of microperoxidase-11 (MP11) as an oxidation catalyst and the interesting properties of *L*-diphenylalanine peptide nanotubes (PNTs) as a supporting matrix to create an effective bioelectrochemical interface. In this case, the synthesized MP11/PNTs were immobilized onto the ITO electrode surface via layer-by-layer deposition using poly(allylamine hydrochloride) in positively charged polyelectrolyte layers. The PNTs provided a favorable microenvironment for MP11 to perform direct electron transfer to the electrode surface [1].

In more recent work, we reported an effective approach to the construction of a biomimetic sensor of multicopper oxidases by immobilizing a cyclic-tetrameric copper(II) species containing the ligand (4-imidazolyl)ethylene-2-amino-1-ethylpyridine (apyhist) in the Nafion[®] membrane on a glassy carbon electrode surface. This modified electrode showed excellent electrocatalytic activity toward the reduction of oxygen. We also provided evidence that the cyclic tetranuclear imidazolate-bridged complex $[\text{Cu}_4(\text{apyhist})_4]^{4+}$ acts as a catalyst for the intramolecular, four-electron reduction of O₂ and on the kinetics of this mediated reaction [2].

In this work, we describe the characteristics of the hybrid film of PNTs modified with a tetranuclear copper(II) complex $[\text{Cu}_4(\text{apyhist})_4]^{4+}$ in a Nafion[®] membrane on a glassy carbon electrode surface for determination of dopamine (DA) with square wave voltammetry. The electrochemical behavior of the modified electrode has been analyzed, and the role of the copper(II) complex as an electron mediator has been discussed.

EXPERIMENTAL

The copper(II) complex $[\text{Cu}_4(\text{apyhist})_4]^{4+}$ was prepared following the methodology described in the literature. The *L*-diphenylalanine nanotubes (PNTs) were prepared by dissolving the lyophilized form of the peptide *L*-Phe $\times\times\times$ *L*-Phe compound in HFP at a concentration of 100 mg mL⁻¹ and diluting to 5 mg mL⁻¹ in ultra-pure water. The diluted mixture was centrifuged for 15 min in a MPW centrifuge at 1200 x rpm. The supernatant was removed and the precipitate was placed in a solution of $[\text{Cu}_4(\text{apyhist})_4]^{4+}$ (8 mg) previously dissolved in 1 mL of ultra-pure water followed by the addition of a 5% Nafion[®] solution (200 μ L). This solution was ultrasonicated for at least 15 min at room temperature to obtain a homogeneous blue solution.

A glassy carbon electrode (0.071 cm²) was carefully polished with 0.5- μ m and 0.03- μ m alumina and was ultrasonicated in ethanol and twice-distilled water. The modified GC electrode was prepared by adding a drop (4.5 μ L) of the mixture solution described previously directly to the top of the electrode. The solvent was allowed to evaporate at room temperature. Square-wave voltammetry (SWV) measurements for DA oxidation were performed in an unstirred, non-deaerated 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 7.0) by applying a potential between -1.0 and +1.0 V vs. SCE at a frequency of 10 Hz and a pulse amplitude of 50 mV. A 10 mL aliquot of the supporting electrolyte was transferred into the cell, and 5 and/or 50 μ L of the DA solution (0.01 mol L⁻¹) was added using a micropipette.

RESULTS AND DISCUSSION

SEM Characterization of PNT-[Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺ hybrid material and a PNT-[Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺/Nafion[®]/GC electrode

Fig. 1 shows the SEM images of the PNT-[Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺ hybrid material and PNT-[Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺/Nafion[®] film on a GC electrode. In both cases, the obtained nanotubes were long and interacted with each other to generate fibrils that were 350-500 nm thick, as shown in Fig. 1A. The membrane of the Nafion[®] was uniformly distributed onto the glassy carbon electrode surface (Fig. 1B). The ease of dispersion of the PNTs and copper(II) complex in the polymer matrix may be attributed to the hydrophobic interaction between PNTs and the Nafion[®] polymer as well as the electrostatic interaction between the sulfonate groups from Nafion[®] and [Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺.

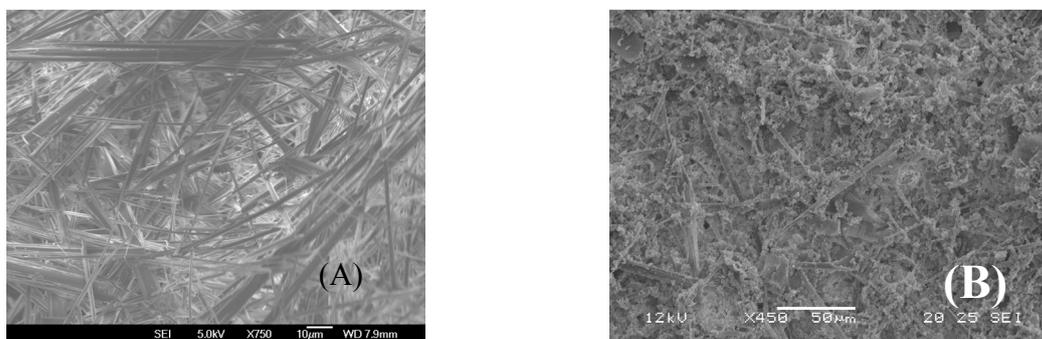


Fig. 1. (A) SEM images of PNT-[Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺ hybrid material and (B) Nafion[®]/PNT-[Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺ hybrid film on a GC electrode.

Electrochemical behavior of DA

The electrochemical behavior of DA in pH 7.0 phosphate buffer solution was examined using cyclic voltammetry. On the bare GCE, two quasi-reversible redox peaks were observed for 1.0×10^{-3} mol L⁻¹ DA, as shown in Fig. 2. The [Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺/Nafion[®]/GCE enhanced the redox peak currents of DA compared to the bare GCE. This enhancement is undoubtedly attributed to the [Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺/Nafion[®] film, which improves the absorption efficiency and electrochemical reactivity of DA.

For the PNT-[Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺/Nafion[®] modified electrode (see Fig. 2), two well-defined and quasi-reversible redox peaks corresponding to the electrochemical reaction of DA were obtained with $E_{pa} = 277$ mV and $E_{pc} = 44$ mV (vs. SCE). The oxidation overpotential of DA decreased by 75 mV compared to the bare GCE. The enhancement in peak currents and the lowering of overpotentials are clear evidences of the catalytic effects of PNTs toward the DA redox reaction. As can be seen, the electrochemical reactivity of DA is remarkably improved on the PNT-[Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺/Nafion[®] composite film, which may be due to its high adsorptivity and good biocompatibility. Peptide nanostructures effectively modify the surface chemistry of graphene sheets, which provides an efficient interface and microenvironment for the electrochemical reaction of DA and allows this system to be a promising method for DA detection. A similar behavior has been observed with cobalt phthalocyanine (CoPc) modified carbon nanotubes using phosphate buffer. It was found that the redox peak currents for the treated MWCNT-CoPc-modified GCE were much higher than those for the untreated MWNT-modified GCE.

Fig. 2 shows the square wave voltammograms for the PNT-[Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺/Nafion[®], [Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺/Nafion[®], and PNT/Nafion[®] electrodes in the presence of 0.30 mmol L⁻¹ DA solution in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.0). For the [Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺/Nafion[®] electrode, the electrooxidation of DA occurred at 226 mV, and the peak obtained was rather broad, suggesting slow electron transfer kinetics. However, a well-defined oxidation peak was obtained in the presence of PNTs on the modified electrode surface. For PNT/Nafion[®] and PNT-[Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺/Nafion[®] composite films, the oxidation peak potential shifted to 203 and 260 mV, respectively, with an increase in the response to DA compared to the [Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺/Nafion[®] electrode. This may be the result of the larger surface area of the PNT nanostructures on the electrode surface, which may enhance the catalytic activities of the electrode and adsorb DA more easily than electrodes with less surface area. It appears that DA is capable of interacting with the tubule-free amide sites via hydrogen bonds that promote more efficient absorption and electron transfer reactions on the structure electrode-solution interface. Moreover, the immobilization of the copper(II) complex [Cu₄(apyhist)₄]⁴⁺ in the PNT/Nafion[®] membrane appears to act as a promoter by lowering the potential of DA oxidation with a negative shift in its anodic peak with an increase in peak current. The presence of the copper(II) complex significantly improves the current response of the sensor by inducing electron transfer in the chemical reaction. This is a result of the formation of a hybrid system between the copper(II) complex and the PNT/Nafion[®] structure.

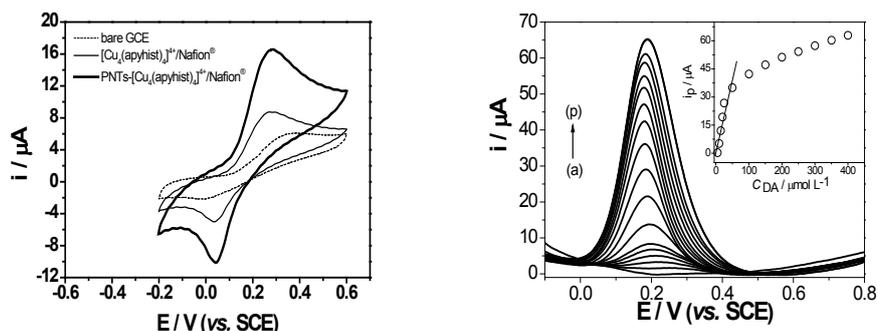


Fig. 2. (A) Cyclic voltammograms on bare GCE, $[\text{Cu}_4(\text{apyhist})_4]^{4+}/\text{Nafion}^\circledast$ and PNT- $[\text{Cu}_4(\text{apyhist})_4]^{4+}/\text{Nafion}^\circledast$ modified carbon electrodes in 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer solution (pH 7.0) in the presence of $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ DA solution (50 mVs^{-1}); (B) Square-wave voltammograms for DA in PBS (pH 7.0) for the PNT- $[\text{Cu}_4(\text{apyhist})_4]^{4+}/\text{Nafion}^\circledast$ carbon electrode. Each addition of DA was $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ from (a) to (e) and $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ from (f) to (p). Insert: figure corresponding to a calibration curve based on the voltammograms. Potential pulse amplitude = 50 mV , frequency = 80 Hz and $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.

The square wave voltammograms of various concentrations of DA for the PNT- $[\text{Cu}_4(\text{apyhist})_4]^{4+}/\text{Nafion}^\circledast$ modified carbon electrode are shown in Fig. 2. Under the optimized conditions, the peak current increased with increasing DA concentrations. The peak current vs. concentration plot exhibited linearity over a wide range from $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ to $50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (Fig. 5B), and the linear dependence obeyed the following equation: $i_p = 0.7753c_{\text{DA}} + 0.2964$ ($R^2 = 0.8616$). The sensitivity of the PNT- $[\text{Cu}_4(\text{apyhist})_4]^{4+}/\text{Nafion}^\circledast$ hybrid film was four times greater than that of the $[\text{Cu}_4(\text{apyhist})_4]^{4+}/\text{Nafion}^\circledast$ electrode. The detection limit ($3\sigma/\text{slope}$) of DA was estimated to be $0.87 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, which is relatively low as compared to other DA sensors reported in the literature based on different electrode architectures containing carbon nanotubes or organic self-assembled monolayers.

CONCLUSIONS

This work demonstrates that PNTs are easily and homogeneously dispersed into a Nafion[®] membrane solution. A uniform and stable PNT/Nafion[®] composite film was achieved as a result of electrostatic interactions between the sulfonate groups of Nafion[®] and the copper(II) complex, thus developing a novel chemically modified electrode. A Nafion[®] membrane was used to block interferences, such as ascorbate, which exhibits an oxidation potential close to that of DA. The PNT- $[\text{Cu}_4(\text{apyhist})_4]^{4+}/\text{Nafion}^\circledast/\text{GC}$ electrode has provided good electrocatalytic properties and a satisfactory detection limit for DA. The modification of PNTs with metallic complexes not only enhanced the peak current but decreased the overpotential toward the anodic oxidation of DA. Therefore, this work illustrates a simple and novel approach for the development of a voltammetric sensor based on peptide-nanostructured modified electrodes.

ACKNOWLEDGEMENTS: Financial support was proved by the Brazilian agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Grant No. 08/53576-9), and CNPq (Grant 474871/2010) is also gratefully acknowledged. This work was also supported by INCT in Bioanalytics (FAPESP, Grant No. 08/57805-2 and CNPq, Grant No. 573672/2008-3). We are thankful to LME-LNLS (Project SEM-LV 11369 and SEM-FEG 11235).

REFERENCES

- [1] Cipriano, T.C.; Takahashi, P.M.; de Lima, D.; Oliveira Jr, V.X.; Souza, J.A.; Martinho, H; Alves, W.A., *J Mater Sci*, 2010, 45, 5101–5108.
- [2] Matos, I. O.; Ferreira, T. L.; Paixão, T. R. L. C.; Lima, A. S.; Bertotti, M.; Alves, W. A., *Electrochim. Acta* 2010, 55 (18), 5223-5229.

DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA POR ONDA QUADRADA (SWV) DE PROPRANOLOL UTILIZANDO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM PAH/MWCNTs

Geiser Gabriel de Oliveira, Elen Romão Sartori, Orlando Fatibello-Filho

Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Departamento de Química, Caixa Postal 676, CEP 13.560–970 São Carlos, SP, Brasil. geisergabriel@gmail.com

RESUMO: Neste trabalho é apresentado o desenvolvimento de um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) em filme de hidrocloreto de polialilamina (PAH) para a determinação de propranolol (PROP) em formulações farmacêuticas. A área do eletrodo modificado com os nanotubos de carbono aumentou consideravelmente em relação ao eletrodo modificado com PAH. Usando a voltametria de onda quadrada, com o tempo de pré-concentração de 180 s, a curva analítica para o PROP foi linear no intervalo de concentração de $2,50 \times 10^{-7}$ a $5,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $9,6 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

Palavras-chave: Propranolol, nanotubos de carbono, hidrocloreto de polialilamina.

INTRODUÇÃO

A utilização de nanotubos de carbono (CNTs) no desenvolvimento de sensores tem se mostrado uma alternativa promissora. Eles promovem uma melhora na resposta analítica em termos de redução significativa do potencial de trabalho, um aumento da magnitude da resposta voltamétrica, além de facilitar a transferência de elétrons entre o eletrodo e o analito. Uma limitação de sua utilização seria a sua insolubilidade em etanol, água e isopropanol, por exemplo. O tratamento com ácidos fortes, além de promover a eliminação de impurezas metálicas, também promove um aumento na solubilidade dos CNTs, pela sua funcionalização com grupos contendo oxigênio (eg. hidroxila e carboxílico) e defeitos em suas extremidades e paredes [1,2].

O hidrocloreto de polialilamina (PAH) é polieletrólito catiônico (pKa 8,7) que apresenta muitos grupos ionizáveis em sua cadeia, estando protonado em meio neutro e em soluções ácidas, mas parcialmente desprotonado em soluções básicas. [3].

Propranolol (PROP), é um fármaco pertencente a classe dos β -bloqueadores, comumente disponíveis na forma de comprimidos, na forma associada ou não, geralmente comercializado como medicamentos de referência, genéricos ou similares. É um fármaco popular, de uso contínuo, amplamente consumido pela população para o tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, arritmias cardíacas, angina pectoris e ansiedade. Portanto, é imprescindível o controle do seu teor no medicamento administrado, para garantir que a quantidade que está sendo ingerida pelo paciente seja a recomendada, garantindo o sucesso do tratamento [4].

No presente trabalho descreve-se a modificação de um eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) funcionalizados em filme de PAH para a determinação de propranolol em formulações farmacêuticas.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) foram funcionalizados em solução de H₂SO₄/HNO₃ (1:3 v/v) durante 12 h. Em seguida, lavou-se os MWCNTs com água deionizada até pH 6,5-7,0. Por fim, secaram-se os MWCNTs funcionalizados em uma estufa a 120 °C durante 6 h.

O eletrodo de carbono vítreo (GCE), com área geométrica 0,196 cm², foi polido sequencialmente com papel abrasivo metalográfico (n° 6) e suspensões de alumina 0,3 e 0,05 μ m para a obtenção de um acabamento espelhado. Posteriormente, lavou-se com água deionizada e sonicou-se em etanol absoluto durante 5 min. Por fim, foram lavados com água deionizada em abundância.

A solução de PAH foi preparada adicionando-se 1,0 mg deste polieletrólito a 1,0 mL de água deionizada. Uma massa de 1,0 mg de MWCNTs foi disperso na solução 1 mg/mL de PAH com o auxílio de banho de ultrassom por 15 min, afim de obter uma suspensão estável de PAH/MWCNTs. Um volume de 20 μ L dessa dispersão foi transferido para a superfície do GCE com o auxílio de uma micropipeta e então, deixado secar a temperatura ambiente por 2 h.

Os experimentos eletroquímicos foram conduzidos em uma célula convencional de três eletrodos. Como eletrodo de referência foi utilizado um eletrodo Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e uma placa de platina como contra eletrodo. Como eletrodo de trabalho foi utilizado o GCE modificado com o filme de PAH/MWCNTs. As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT12 (Eco Chemie) acoplado a um microcomputador gerenciado pelo software GPES 4.9. As imagens por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) foram obtidas empregando-se um equipamento Supra 35-VP, com energia de feixe de elétrons de 25 keV.

Uma solução padrão de PROP $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada momentos antes de seu uso e diluições apropriadas foram feitas a partir desta solução. Soluções de ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizada como eletrólito suporte.

Para a construção da curva analítica, alíquotas de uma solução padrão de PROP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionadas à célula eletroquímica contendo 15 mL de eletrólito suporte (H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos após cada adição da solução padrão de PROP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, determinou-se a área ativa dos eletrodos de trabalho utilizados, GCE/PAH e GCE/PAH/MWCNTs, empregando-se a equação de Randles-Sevcik, utilizando a técnica de voltametria cíclica (CV) em diversas velocidades de varredura e solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os valores obtidos foram de $0,176$ e $0,597 \text{ cm}^2$ para GCE/PAH e GCE/PAH/MWCNTs, respectivamente. O eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs em filme de PAH apresentou um valor de área ativa de 3,4 vezes maior quando comparado ao GCE/PAH. A Figura 1A mostra a imagem obtida por MEV-FEG para o GCE/PAH/MWCNTs. Observa-se um filme denso de nanotubos de carbono de paredes múltiplas recobrendo a superfície do carbono vítreo.

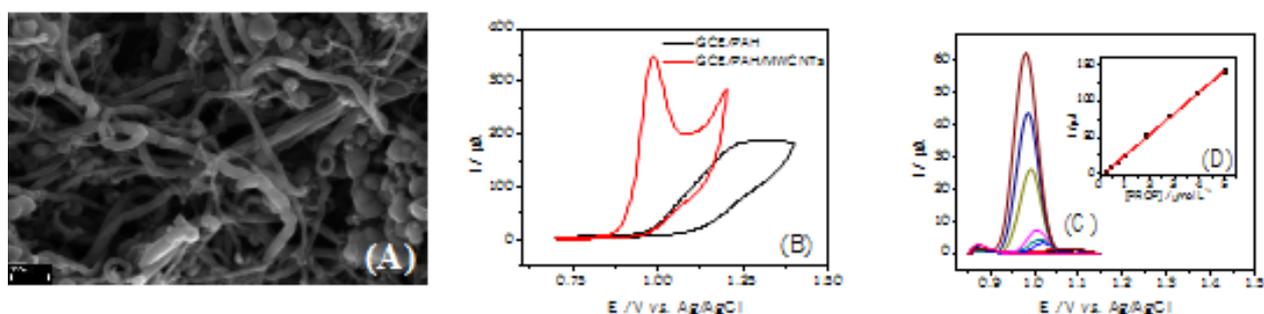


Figura 1. (A) Imagem MEV-FEG obtida para o GCE/PAH/MWCNTs; (B) Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de PROP $3,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ comparando-se os eletrodos GCE/PAH e GCE/PAH/MWCNTs; (C) Voltamogramas de onda quadrada para o PROP em diferentes concentrações com $f = 30 \text{ s}^{-1}$; $a = 40 \text{ mV}$; $\Delta E = 7 \text{ mV}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; (D) curva analítica.

A Figura 1B mostra o comportamento voltamétrico do PROP $3,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ no GCE/PAH/MWCNTs em comparação ao GCE/PAH. Observa-se um aumento na corrente de pico para o PROP usando o eletrodo de GCE/PAH/MWCNTs, demonstrando que o filme formado pela dispersão PAH/MWCNTs apresenta uma maior facilidade de transferência de elétrons e também se observa o deslocamento do potencial de $1,25 \text{ V}$ empregando o GCE/PAH para $0,97 \text{ V}$, quando se utilizou o GCE/PAH/MWCNTs, evidenciando o efeito eletrocatalítico.

Estudos preliminares foram feitos para a escolha do eletrólito suporte, testando-se soluções de ácido sulfúrico, cloreto de potássio, tampão Britton-Robinson e tampão acetato de sódio. A partir destes estudos, a solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi escolhida como eletrólito suporte no estudo da oxidação de PROP no GCE/PAH/MWCNTs, uma vez que este proporcionou melhor resposta analítica. O tempo de adsorção estudado foi de 10 a 240 s e o tempo selecionado foi de 180 s. Este estudo foi realizado em circuito aberto. Em seguida, foram realizados estudos para a otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada (SWV), investigando o efeito da frequência (f), da amplitude de pulso (a) e do incremento de varredura (ΔE_s), como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros investigados na SWV e os valores selecionados para a determinação PROP.

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Frequência/ Hz	10 – 50	30
Amplitude/ mV	5 – 60	40
Incremento de Varredura/ mV	1 – 9	7

Estabelecidas as melhores condições para a determinação do PROP, a curva analítica foi construída (Figura 1C). Os valores de corrente de pico anódico geraram uma relação linear com a concentração de PROP no intervalo de $2,5 \times 10^{-7}$ a $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, representada pela equação $(I_{pa}/\mu\text{A}) = -52,6 \times 10^{-5} + 29,4 [\text{PROP}] \text{ mol L}^{-1}$, com um coeficiente de correlação igual a 0,997 e um limite de detecção de $9,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

O procedimento desenvolvido foi empregado com sucesso na determinação de PROP em amostras comerciais.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que a modificação de um GCE com MWCNTs em filme de PAH promoveu um aumento significativo na magnitude do sinal de corrente, bem como um deslocamento do potencial de oxidação do PROP quando comparado ao GCE/PAH. Além do mais, houve aumento de aproximadamente 3,4 vezes no valor da área ativa do GCE/PAH/MWCNTs em relação ao PAH/GCE. O eletrodo assim desenvolvido pode ser aplicado na determinação de propranolol utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada, com o tempo de pré-concentração de 180 s, sendo a faixa linear de concentração de $2,5 \times 10^{-7}$ a $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $9,6 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

AGRADECIMENTOS: CNPq, CAPES e FAPESP.

REFERÊNCIAS

- [1] IJIMA, S., “Helical microtubules of graphitic carbon”. *Nature*, 354: 56-58, 1991.
- [2] De SOUZA-FILHO, A. G. & FAGAN, S. B., “Funcionalização de nanotubos de carbono”, *Quim. Nova*, 30 (7): 1695-1703, 2007.
- [3] KIM C.H., SAUPE G.B., KIM H.N., WARAкса C.C., MIWA T., FUJISHIMA A., MALLOUK A., “Layer-by-layer growth and condensation reactions of niobate and titanoniobate thin films”, *Chem. Mater.*, 11: 1526-1532, 1999.
- [4] BRUNTON L. L.; LAZO J. S. & PARKER K. L.. Goodman & Gilman – As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11ª ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2006.

COMPÓSITO FC/PAni: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO COMO SENSOR DE GÁS

Carla Polo Fonseca, Dalva A. L. Almeida, Maurico Baldan e Neidenei Ferreira

Laboratório Associado de Sensores e Materiais; Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE
Av. dos Astronautas 1758, 12245-970 - S. J. Campos, SP Brasil. carla.polo@yahoo.com.br

RESUMO: Neste trabalho apresentamos o desenvolvimento de um sensor de gás de NO_2 baseado no compósito FC/PAni. O polímero condutor foi depositado quimicamente sobre a fibra de carbono em diferentes tempos de deposição 30, 60 e 90 min. Por microscopia eletrônica de varredura observamos o completo recobrimento das fibras em todos os tempos deposição. Por espectroscopia Raman notamos o crescimento da PAni no estado altamente condutor esmeraldina. A exposição deste compósito com o gás NO_2 em diferentes concentrações mostrou uma sensibilidade da ordem de $10^{-3} \% \text{ ppm}^{-1}$.

Palavras-chave: Compósito, polianilina, espectroscopia Raman, sensor de gás.

INTRODUÇÃO

Durante este século, assistimos a um acelerado processo interativo, que envolveu novas idéias e conceitos científicos, novos materiais gerados para substituírem materiais escassos, caros ou estratégicos e novas possibilidades de uso tornadas possíveis pelos novos materiais, à medida que eles foram surgindo. Por outro lado observa-se a necessidade de busca por materiais mais eficientes, e dispositivos que solucionem se não todos, mas grande parte dos problemas relacionados ao controle da poluição ambiental. Os sensores têm desempenhado um papel de destaque nos grupos de pesquisa, sendo alternativas promissoras para controle de futuros problemas ambientais. Este empenho da sociedade científica em desenvolver e aprimora novos sensores se deve à crescente conscientização dos efeitos do aquecimento global, da bioconcentração e da bioacumulação de poluentes. Presencia-se um crescente investimento na área de desenvolvimento de monitorização ambiental devido aos graves e variados efeitos biológicos em nível dos ecossistemas e da saúde pública acarretados por poluentes presentes no meio ambiente[]

Neste contexto inserem-se este trabalho relacionado com o desenvolvimento de um novo sensor de gases constituído de um compósito Fibra de carbono/Pani depositado quimicamente, com diferentes tempos de deposição. Os eletrodos foram testados utilizando o gás NO_2 por cronoamperometria. Suas características morfológicas e estruturais foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e por espectroscopia Raman.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Síntese dos compósitos

Neste trabalho foi utilizada fibra de carbono (FC) obtida a partir da poli(acrilonitrila) (PAN). Esse tipo de fibra, conhecida como PANox, recebeu tratamento térmico de 1000 °C, em atmosfera inerte de nitrogênio. Os compósitos FC/PAni foram sintetizados por polimerização química oxidativa, na qual mergulhou-se as FCs em solução contendo 100 mL de uma solução de NaCl 3,0 mol L⁻¹ e HCl 1,0 mol L⁻¹. Após homogeneização em um banho termostatizado -10°C adicionou-se 0,1 mol L⁻¹ de anilina destilada. Utilizou-se como oxidante, uma solução aquosa 0,035 mol L⁻¹ de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ em NaCl 3.0 mol L⁻¹, HCl 1.0 mol L⁻¹, a qual foi adicionada à solução contendo o monômero por 10 minutos. As FCs permaneceram imersas na solução de deposição química em diferentes tempos, 30, 60 e 90 minutos, gerando compósitos FC/PAni com diferente massas. Após o término da reação, o material obtido foi lavado com solução ácida e seco á vácuo.

Caracterização física:

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias foram registradas utilizando um microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM 5310.

Espectroscopia de Raman

Os espectros de espalhamento Raman foram obtidos utilizando-se um equipamento Renishaw Microscopy System modelo 2000, no LAS/INPE. A energia de excitação do laser de Ar⁺ utilizada foi de 2,41 eV, que corresponde ao comprimento de onda de 514,5 nm, com profundidade de penetração da ordem de 5 µm. O feixe do laser foi focado com o auxílio do microscópio com um aumento de 500 vezes.

Caracterização eletroquímica

Os eletrodos compósitos FC/Pani foram inseridos em uma câmara hermética, presos com dois fios de platina, um em cada lado do compósito, sendo um o trabalho e o outro contra – eletrodo curto-circuitado com o eletrodo de referência. A Figura 1 apresenta o esquema simplificado da câmara utilizada na caracterização eletroquímica do compósito. Diferentes concentrações de gás NO_2 foram injetadas na câmara 50, 75, 100, 200 e 300ppm.

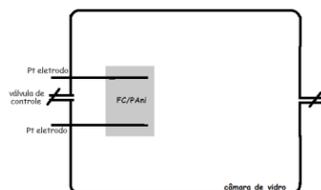


Figura 1 Esquema da câmara utilizada na caracterização dos compósitos.

Antes de cada inserção de gás, a câmara foi purgada com N_2 por 30 minutos a temperatura ambiente de 25°C . Uma tensão constante DC de 0,10 V foi aplicada entre os dois eletrodos por um tempo de 1000 segundos. Após estabilização do sistema (tempo 300s) injetou-se o gás NO_2 e gerando uma corrente DC. A variação da resistência elétrica foi analisada em função da concentração de gás injetada na câmara.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 apresenta as morfologias da Fibra de carbono, polianilina depositada quimicamente e os respectivos compósitos de 30, 60 e 90 min de deposição. A FC apresenta morfologia tubular, como ilustrada nas micrografias Figura 2(a), enquanto que, a morfologia da polianilina é constituída de placas e de aglomerados com aspecto de “esponja” (Figura 2(b)). Verificamos que em todos os tempos de deposição o polímero condutor revestiu efetivamente as fibras de carbono (Figuras 2 (c,d, e)).

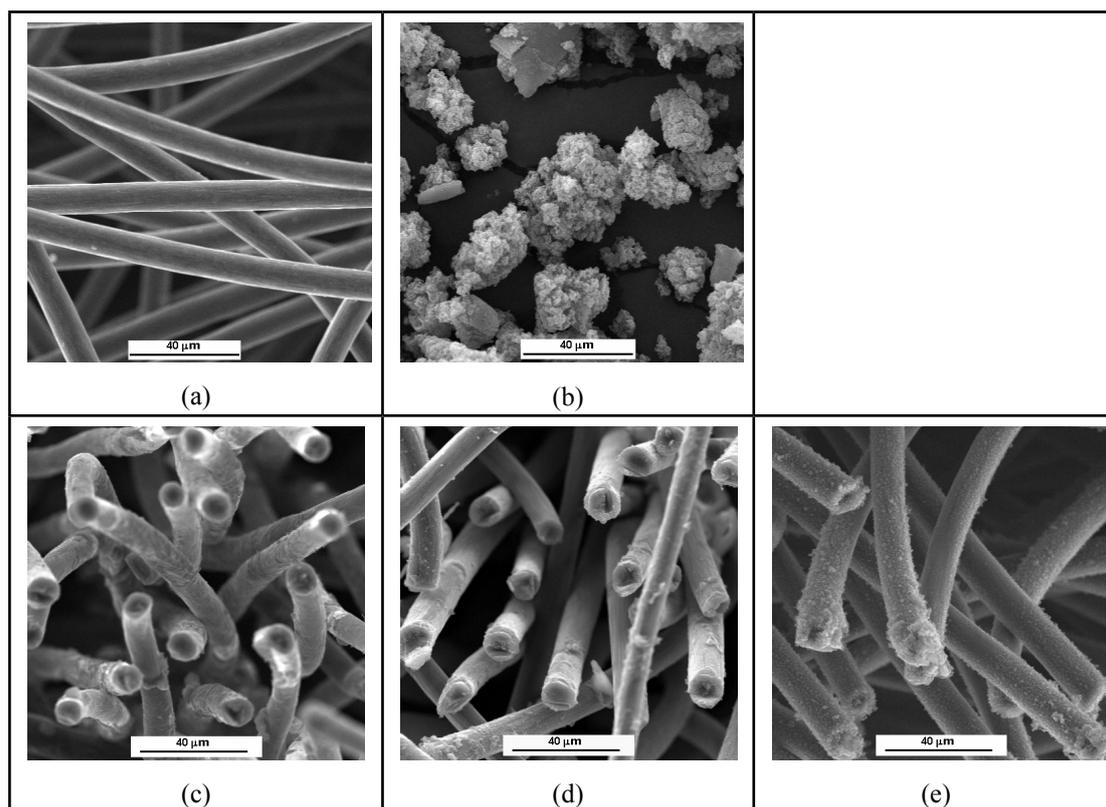


Figura 2 – Micrografias dos seguintes materiais: (a) FC, (b) PANi e (c, d, e) PANi/FC obtidos com 30, 60 e 90 min de tempo de deposição, respectivamente. Aumento de 1000x.

Os materiais FC, PANi e os compósitos de FC/PAni foram estudados por espectroscopia Raman, Figura 3. A frequência vibracional fornece informações detalhadas sobre a composição do polímero. Os espectros dos compósitos FC/PAni são tipicamente correspondentes aos da poli-emeraldina [1]. Os picos em 1584 e 1492 cm^{-1} correspondem ao estiramento $\text{C}=\text{C}$ dos anéis benzênicos quinóide e, em moléculas de PANi, respectivamente. A banda localizada em 1344 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento de cátions radicais a $\text{C}-\text{N}^+$. A diferença dos níveis de dopagem pode ser visto a partir de bandas em 1221 e 1251 cm^{-1} , que representam os estiramentos CN das unidades polarônicas. O

deslocamento da banda 1221-1251 cm^{-1} observada nos compósitos FC/PAni em 30 a 90 minutos é resultado de o processo de dopagem. A única banda observada 1251 cm^{-1} para o compósito FC/PAni - 90 min, fornece o indicio que o material está completamente dopado [2].

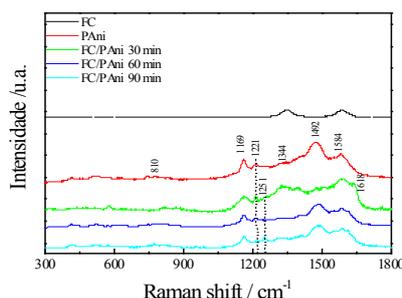
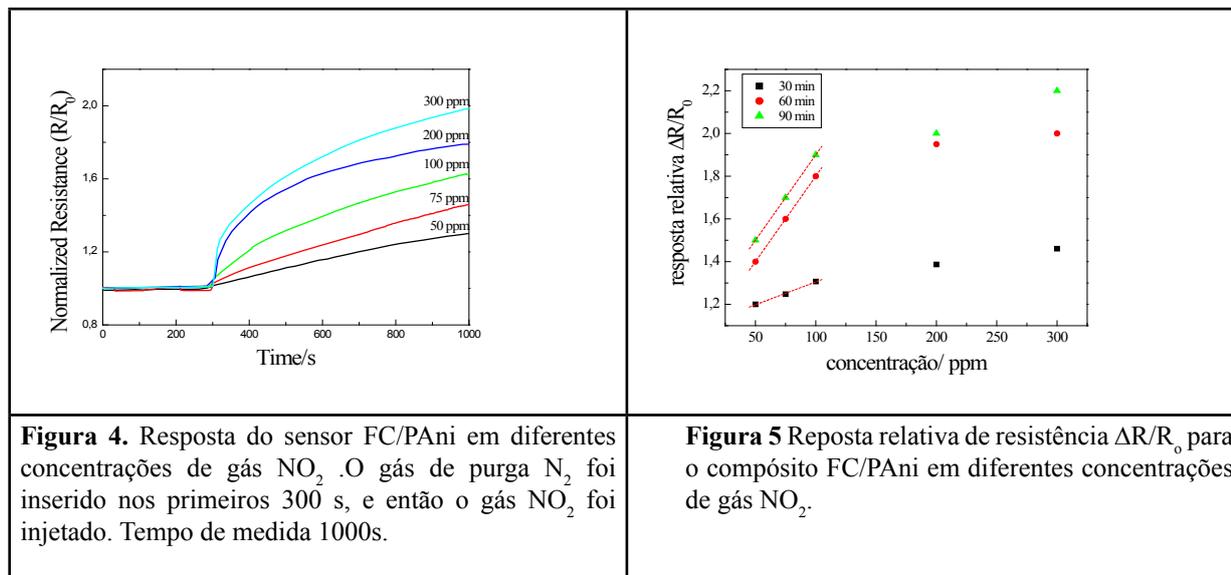


Figura 3 – Espectros Raman dos materiais FC, PAni e FC/PAni obtidos com 30, 60 e 90 min de tempo de deposição.

A resposta em tempo do compósito FC/PAni-60min com diferentes concentrações de gás NO_2 está apresentada na Figura 4. A resistência do material aumenta duas vezes em relação a resistência inicial. O gás NO_2 é um forte agente oxidante e aumenta o estado de oxidação da PAni. No caso como a PAni já está em um estado altamente conductor (esmeraldina), quando exposta ao gás NO_2 , se sobre-oxida e passa para o estado de pernigranilina aumentando a resistência do material. A sensibilidade do eletrodo foi determinada da inclinação das curvas de $\Delta R/R_0$ (Figura 5): $2,14 \times 10^{-3}$, $7,99 \times 10^{-3}$ e $7,99 \times 10^{-3} \% \text{ ppm}^{-1}$ para os eletrodos 30, 60 e 90 min de deposição, respectivamente.



CONCLUSÕES

Neste trabalho apresentamos a proposta de desenvolvimento de um sensor de gás de NO_2 baseado em um compósito FC/PAni depositada quimicamente em diferentes tempos. A resposta em resistividade foi bastante promissora e comparável aos sensores desenvolvidos pela técnica Inkjet-printed. O trabalho continua com o objetivo de adequar do estado de oxidação da PAni para tornar o processo reversível.

AGRADECIMENTOS: CNPq. 150663/2010-2

REFERÊNCIAS

- [1] Z.-ze Zhu, G.-c. Wang, M.-q. Sun, X.-wei Li, Chun-zhong Li *Electrochimica Acta no prelo* (2010)
- [2] M. Cochet, G. Louarn, S. Quillard, J.P. Buisson, S. Lefrant, *J. Raman Spectrosc.* 31 (2000) 1041

CARACTERIZAÇÃO DE ELETRÓLITO SÓLIDO PARA APLICAÇÃO EM DISPOSITIVOS ELETROCRÔMICOS

Silvio C. de Oliveira¹, Dante A. A. de Mello², Márcio R. S. Oliveira³, Lincoln C. S. de Oliveira¹

¹Departamento de Química - UFMS, Campo Grande - MS – Brasil; ²Departamento de Educação - UFMS, Campo Grande - MS - Brasil; ³Escola Politécnica - USP, São Paulo - SP - Brasil.

silvio.oliveira@ufms.br

RESUMO: As chamadas “janelas inteligentes” podem reduzir substancialmente os gastos envolvidos na refrigeração e iluminação de ambientes através de alterações em suas propriedades ópticas. Neste trabalho foi realizada a caracterização espectroeletróquímica e termoanalítica de um polímero natural de origem animal para aplicação em dispositivos eletrocrômicos de eletrodeposição reversível de cobre. As medidas fotoeletróquímicas demonstraram boa variação de transmitância nas regiões do espectro de luz visível (70%) e infravermelho próximo (20%) com reversibilidade óptica a uma pequena janela de potencial (2,1V). Obteve-se o “efeito memória” através da manutenção de um pulso de potencial de -0,20V. A espectroscopia de impedância eletróquímica permitiu determinar a condutividade do eletrólito nas diversas concentrações estudadas (chegando a $7,5 \times 10^{-3} \text{ S.cm}^{-1}$ para 80mM de CuCl_2). A termogravimetria evidenciou que o gel se decompõe somente a partir de 200°C e as micrografias, microanálises e raios-X confirmaram que o depósito de cobre formado sobre o ITO é persistente, homogêneo e organizado.

Palavras-chave: eletrocromismo, eletrodeposição reversível, eletrólito sólido, gelatina, cobre.

INTRODUÇÃO

Recentemente vêm sendo desenvolvidos dispositivos eletrocrômicos promissores baseados na deposição–dissolução reversível de metais [1]. Estes dispositivos contêm o material eletrocrômico dissolvido no eletrólito e um filme fino de metal é formado sobre um substrato transparente por passagem de corrente elétrica. Um dispositivo eletrocrômico de eletrodeposição reversível é constituído, basicamente, por um par de eletrodos com o material eletrocrômico dissolvido em um eletrólito encaixado entre eles [2].

Em 2003 um polímero derivado de uma proteína de origem animal (gelatina comercial incolor Oetker®) foi utilizado pela primeira vez [3] na confecção de gel eletrolítico para aplicação em dispositivos eletrocrômicos. Esta gelatina foi escolhida para formar o sistema gelificado pela sua capacidade de preparar soluções transparentes com alta viscosidade, baixo custo (uma vez que é um material utilizado na indústria alimentícia) e ausência de toxicidade. No trabalho citado verificou-se que o bismuto em meio gelificado não apresenta reversibilidade óptica, porém uma ampla variação de transmitância e reversibilidade óptica foi observada quando Cu^{2+} foi adicionado ao eletrólito. Em um estudo publicado recentemente [4] este sistema apresentou aumento considerável na variação de transmitância e manutenção da completa reversibilidade óptica a partir de reações de entrecruzamento com glicerol e formaldeído com a vantagem de utilizar a mesma janela de potencial.

Um estudo da condutividade iônica da gelatina foi realizado através de espectroscopia de impedância eletróquímica [5]. O aumento da condutividade aconteceu em função do aumento da temperatura e da concentração de ácido acético. A explicação destes resultados é que o movimento dos segmentos da cadeia do polímero é ampliado com o aumento da temperatura. Além disso, com o aumento da concentração de ácido tem-se um acréscimo no número de portadores móveis de carga. A microscopia eletrônica de varredura da gelatina indicou também uma morfologia superficial uniforme do eletrólito.

Outra proposta de utilização das propriedades eletrocrômicas do cobre foi relatada em eletrólitos não-aquosos para aplicação em dispositivos eletrocrômicos de eletrodeposição reversível [6]. Neste sistema verificou-se que a adição sucessiva de amônia líquida até um valor limite favorece o aumento na condutividade do eletrólito, chegando a um valor da ordem de $1,6 \cdot 10^{-2} \text{ S/cm}$.

Pensando na necessidade de desenvolvimento destas tecnologias o objetivo deste trabalho foi desenvolver um eletrólito sólido com características favoráveis para aplicação em dispositivos eletrocrômicos de eletrodeposição reversível, tais como: elevada variação de transmitância na região do espectro de luz visível e infravermelho próximo, reversibilidade fotoeletróquímica, ciclabilidade, efeito memória, estabilidade térmica e mecânica, boa condutividade iônica e morfologia uniforme do eletrodepósito formado sobre o substrato (ITO).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O eletrólito gelificado foi preparado a partir de uma proteína de origem animal: gelatina em folhas incolor sem sabor Dr. Oetker™. Como material eletrocrômico utilizou-se o cloreto de cobre(II) (Aldrich), sendo que a água deionizada utilizada no preparo das soluções foi obtida no aparelho Milli-Q Plus da Millipore com resistividade 18,2 MΩ.cm. O

dispositivo eletrocromico de eletrodeposição reversível foi montado em uma cela eletroquímica de teflon utilizando como eletrodo de trabalho um vidro constituído por um revestimento condutor de óxido de estanho dopado com índio (ITO) da Asahi Glass, com 28 mm² de área geométrica em contato com o eletrólito. Como contra-eletrodo utilizou-se uma placa de platina com área geométrica de 572 mm². O eletrodo de referência foi um fio de prata com depósito de cloreto de prata (Ag/AgCl) realizado em meio de KCl.

Os experimentos de voltametria cíclica e cronoamperometria foram realizados com o potenciostato/galvanostato AutoLab PGSTAT-12. Simultaneamente foram feitas as medidas de transmitância em comprimento de onda fixo de 525 nm com o espectrofotômetro HITACHI modelo U-3000.

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi realizada com o potenciostato/galvanostato AutoLab PGSTAT-128N equipado com um módulo FRA, num intervalo de frequência de 1 Hz a 1 GHz (total de 90 pontos) com amplitude RMS de 15 mV.

A microestrutura do depósito de cobre foi estudada através das técnicas de micrografia e microanálise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando o equipamento MEV JEOL modelo JSM 6380LV. O depósito sobre o ITO foi previamente recoberto com um filme fino de ouro pelo equipamento Sputtering Denton Vacuum modelo desk III, melhorando assim a visualização do material eletrodepositado.

As curvas TG-DTG foram obtidas num equipamento Shimadzu, modelo TA- 50H, em atmosfera de ar sintético com fluxo de 90 mL.min⁻¹, em cadinhos alumina (Al₂O₃), a razão de aquecimento de 20°C.min⁻¹ e massa de amostra em torno de 5,0 mg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1(a) apresenta os gráficos da voltametria cíclica e da respectiva variação de transmitância para o eletrólito constituído pela proteína de origem animal utilizando CuCl₂ na concentração de 80 mM (Cu80). Aplicou-se uma variação linear de potencial a partir do potencial de circuito aberto, seguindo na região de corrente catódica até o potencial do primeiro vértice (-1,1 V). Na sequência foi realizada a varredura reversa em região de corrente anódica até o potencial do segundo vértice (1,0 V), retornando em seguida ao potencial inicial.

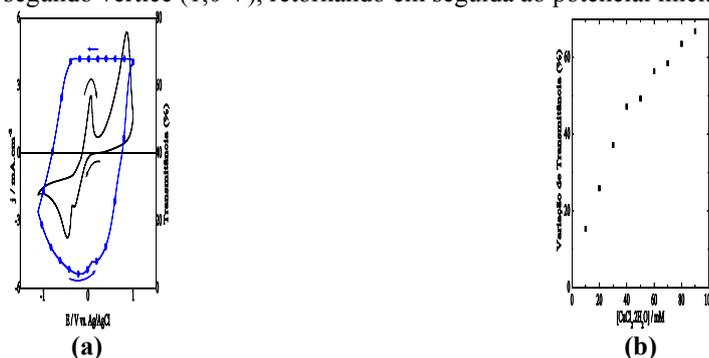


Figura 1. (a) Perfis potenciodinâmicos de j/E (\square) a 10 mV.s⁻¹ e T/E ($-\square-\square-$) com $\lambda = 525$ nm para o eletrólito Cu80; **(b)** Variação de transmitância medida com $\lambda = 525$ nm em função da concentração de CuCl₂.

A partir da figura 1(b) nota-se que a variação de transmitância aumenta em função do aumento na concentração de cobre e isto não influencia na completa reversibilidade óptica do sistema. Em concentrações maiores do que 50 mM o aumento na variação de transmitância torna-se menos acentuado, principalmente acima de 90 mM, pois a transmitância chega a um valor limite próximo de 0% (estado completamente escurecido da janela).

A condutividade iônica total de cada eletrólito foi calculada pela equação: $\sigma = l/(S.R)$. Para tanto se admitiu a espessura do eletrólito $l = 0,18$ cm, a área superficial do eletrodo de trabalho $s = 0,28$ cm² e a resistência do eletrólito R foi obtida pela primeira intersecção do semicírculo com o eixo real.

A figura 2(a) mostra o Diagrama de Nyquist obtido para o eletrólito Cu80gel através dos experimentos de EIE enquanto a figura 2(b) mostra o aumento que acontece na condutividade iônica do eletrólito com a adição de maiores concentrações do material eletrocromico (CuCl₂).

Já os resultados da microestrutura dos filmes de cobre eletrodepositados sobre o ITO são apresentados na figura 3.

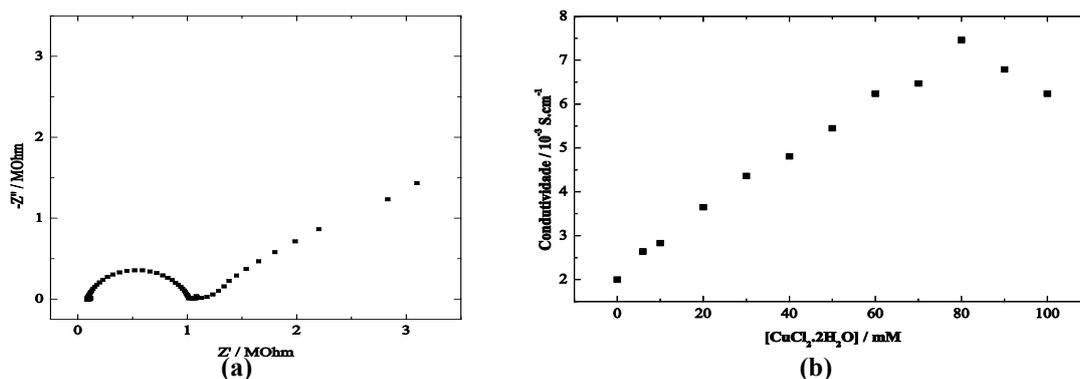


Figura 2. (a) Diagrama de Nyquist obtido para o eletrólito gelificado Cu80 no potencial $E = -0,1V$; (b) Condutividade iônica total do eletrólito em função da concentração de cobre.

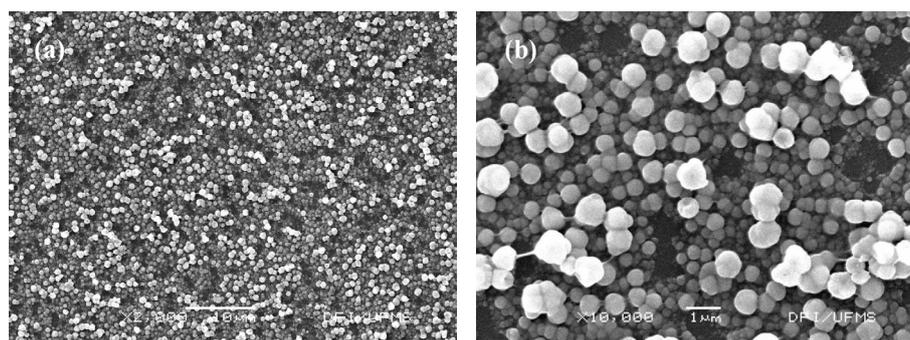


Figura 3. Micrografias dos agregados de cobre metálico formados sobre o ITO através da amostra Cu50 ($CuCl_2$, 50 mM + proteína) após aplicação do potencial de $-0,90V$ por 1000s. Ampliação: (a) 2000x e (b) 10000x.

CONCLUSÕES

Verificou-se que o eletrólito estudado é capaz de bloquear a passagem de luz nas regiões do espectro de luz visível e do infravermelho próximo quando o cobre se apresenta eletrodepositado sobre o ITO.

O eletrólito Cu80gel se destacou dentre as amostras estudadas devido à sua elevada variação de transmitância, ciclabilidade, completa reversibilidade óptica, “efeito memória” com aplicação de um pequeno pulso de potencial, boa condutividade iônica ($7,5 \times 10^{-3} S/cm$), estabilidade térmica até $200^\circ C$ e, portanto, eficiência no bloqueio da passagem de luz por constituir um eletrodepósito persistente, uniforme e homogêneo.

AGRADECIMENTOS: CAPES, CNPq, FUNDECT e PROPP/UFMS.

REFERÊNCIAS

- [1] OLIVEIRA M.R.S., MELLO D.A.A., PONZIO E.A. and DE OLIVEIRA S.C., “KI effects on the reversible electrodeposition of silver on poly(ethylene oxide) for application in electrochromic devices”, *Electrochim. Acta* (**55**): 3756–3765, 2010.
- [2] ZIEGLER J.P., “Status of reversible electrodeposition electrochromic devices”, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* (**56**): 478, 1999.
- [3] OLIVEIRA S.C., MORAIS L.C., CURVELO A.A.S. and TORRESI R.M., “An Organic Aqueous Gel as Electrolyte for Application in Electrochromic Devices Based in Bismuth Electrodeposition”, *J. Electrochem. Soc.* (**150**): 578-581, 2003.
- [4] OLIVEIRA S.C., MORAIS L.C., CURVELO A.A.S. and TORRESI R.M., “Improvement of thermal stability of an organic-aqueous gel electrolyte for bismuth electrodeposition devices”, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* (**85**): 495, 2005.
- [5] VIEIRA D.F., AVELLANEDA C.O. and PAWLICKA A., “Conductivity study of a gelatin-based polymer electrolyte”, *Electrochim. Acta* (**53**): 1405-1407, 2007.
- [6] HERLEM M., SZÉKELY M., SUTTER E., MATHIEU C., GONÇALVES A.-M., CAILLOT E., HERLEM G., FAHYS B., “Liquid ammoniates: nonaqueous electrolytes for electrochromism”, *Electrochim. Acta* (**46**): 2969, 2001.

ELECTROCHEMICAL SENSOR BASED ON IMPRINTED SOL-GEL AND NANOMATERIALS FOR SENSITIVE DETERMINATION OF CAFFEINE

Wilney de J. R. Santos, Murilo Santhiago, Inez V. P. Yoshida e Lauro T. Kubota

Instituto de Química - Unicamp, Campinas - SP - Brasil; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bionálitica, Campinas - SP – Brasil. wsantos@iqm.unicamp.br

ABSTRACT: Caffeine is the most ingested alkaloid with biological activity on the planet. It presents varied pharmacological action on the human body and has been studied for some decades. In this study, a novel electrochemical imprinted sensor for sensitive determination of caffeine was developed. The sensor was prepared onto glassy carbon electrode (GCE) modified with vinyltrimethoxysilane (VTMS) incorporated multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and a thin film of molecularly imprinted siloxane prepared from a sol constituted of tetraethoxysilane (TEOS), methyltrimethoxysilane (MTMS), 3 - (aminopropyl) trimethoxysilane (APTMS) and caffeine as template molecule. The morphology and performance of the imprinted siloxane film was characterized by scanning electron microscopy (SEM) and differential pulse voltammetry (DPV). After optimization of experimental conditions, the sensor showed a linear range of 0.75 to 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with a limit of detection (LOD) of 0.22 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The imprinted sensor was successfully tested to detect caffeine in real samples.

Keywords: Electrochemical sensor; molecular imprinting siloxane, sol-gel, MWCNTs, caffeine.

INTRODUCTION

Electrochemical sensors (e.g. voltammetric, potentiometric, conductometric and capacitance) are becoming important tools in medical, biological and environmental analysis due to the simplicity, high sensitivity and relative cheapness [1]. Furthermore, the sensitivity and specificity of these systems can be improved considerably by incorporation of highly selective recognition elements (either biological or synthetic substances). Molecular imprinting was just a method.

Molecular imprinting, first constructed by Wulff and Mosbach, is a well established and facile technique for synthesizing molecularly imprinted polymers (MIPs) with specific molecular recognition capacity [2]. The imprinting process involves polymerizing functionalized monomers in the presence of the template molecule. Once the template is removed, a molecular recognition site with appropriate size and chemical functionality is produced to rebind the template.

MIPs are of growing interest for their potential applications as artificial enzymes advanced materials for solid-phase extraction, and thin coatings for sensor devices. MIPs have already been used in some prototype gas sensor devices and liquid-phase sensors. The detection method for the adsorption or binding molecules in imprinted polymers could be achieved by electrochemical, piezo-electric, impedance and optical methods. Among those methods, electrochemical method based on the amperometric and voltametric detection is one of the easiest and most economic way to fabricate a commercial sensor [2].

Among these developed imprinted sensor materials, imprinted sol-gel material, such as the polysiloxane obtained by hydrolysis and condensation of alkoxysilanes, has been widely used in the development of imprinted sol-gel sensor [1,3]. However, as a sensing material, diffusion of the analytes across the inorganic siloxane film needs to be accelerated in order to obtain a quick response. Furthermore, in order to effectively convert the binding signals from the molecular recognition to detectable electrical signals, the design of the signal transducer still remains challenging to enhance the sensitivity of this sensing system. Recently, multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) have attracted attention in their utilization for enhancing the sensitivity of the electrochemical detection. However, up to now, to our knowledge, MWCNT have almost not been employed in the design of a molecularly imprinted based sensor.

The aim of this work was to construct an electrochemical sensor for the detection of caffeine by using the molecularly imprinted technique and a sol-gel siloxane network. In order to enhance the sensitivity of the sensor, MWCNT modified by vinyltrimethoxysilane (VTMS) were introduced during the preparation of the imprinted sensor owing to their unique properties involving huge surface area, strong adsorptive ability, subtle electronic properties and catalytic ability. The combination of MWCNT with the sol-gel technique offers an attractive route to enhance the sensitivity and stability of the imprinted sensor. Caffeine was employed as the template molecule. The sensor was employed to detect caffeine in real samples successfully.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Modification MWNTs by VTMS

In order to obtain MWCNTs modified with vinyltrimethoxysilane (MWCNTs-VTMS), the procedure was adapted from Qin and co-workers [4]. In a 50 mL flask, 50 mg of MWCNT in 70 mL of DMF were added under a nitrogen

atmosphere and stirred for 20 min. Then, 8.0 mL VTMS and 80 mg of AIBN were added. The flask was placed in a thermostated oil bath at 70 °C under stirring, for 48 hours. After this period, the mixture was cooled to room temperature, vacuum-filtered through a 0.20 µm PTFE membrane and washed 10 times with DMF. The resulting solid was dried and stored for later use in the preparation of the dispersion.

Preparation of the imprinted sensor

For the preparation of the imprinted sensor 10 mg MWCNTs-VTMS were dispersed into 1 mL DMF by ultrasonic agitation 30 min to give a homogeneous suspension. Then, 4 µL of the resulting suspension was coated on the surface of carbon electrode and allowed to evaporate solvent at room temperature (RT).

A mixture of 400 µL (1.8 mmol) of TEOS, 65 µL (0.27 mmol) of MTMS, 65 µL (0.37 mmol) of APTMS, 3.0 mL of 2-ethoxyethanol, 100 µL of 0.1 mol L⁻¹ HCl and 90 µL of H₂O was stirred by 2 h to obtain a homogeneous sol at RT. Then, 2 mL of the sol was mixed with 700 µL of 2-ethoxyethanol solution of caffeine (0.03 mol L⁻¹) for an additional 2 h. This solution was used for caffeine imprinted siloxane film, while the original solution was used for reference siloxane film. Finally, the electrode modified with MWCNT-VTMS was immersed in sol and rotated at 1500 rpm for 15 min. The decorated sensor was let to deposit and dry overnight at RT. The doped caffeine was extracted from the imprinted film (MIS/MWCNT-VTMS) by repetitive immersion in solution of methanol containing 10% acetic acid, and then air-dried for 24 h.

Equipments

All the electrochemical measurements were carried out using a potentiostat PGSTAT-30 Model from Autolab Eco Chemie (Utrecht, The Netherlands) connected to a PC (Software GPES 4.9), employing a conventional three-electrode system. Scanning electron micrographs were obtained using a JEOL JSM-5610LV scanning electron microscope (SEM).

RESULTS AND DISCUSSION

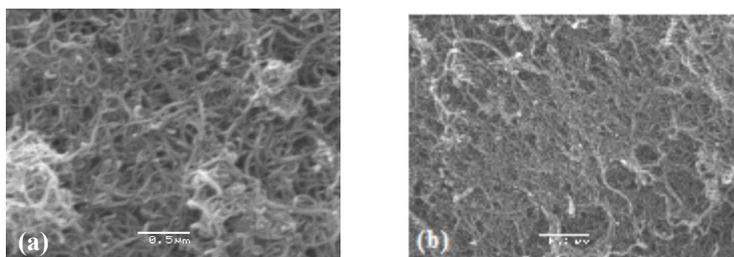


Figure 1: SEM images of the (a) MWNT and (b) MIS/MWCNTs-VTMS/GC electrode.

One of the basic demands for successful imprinting is the presence of functional monomers in the polymeric matrix. The role of these monomers is to assist in the creation of the specific binding cavity by leaving chemical functions after the polymerization inside the cavity, in an optimal position for rebinding, similar to the active site of an enzyme. Firstly, MWCNTs-VTMS was introduced for the enhancement of specific surface area. Thus can promote electronic transmission and enhance the sensitivity. Then, a specific sol-forming mixture containing APTMS, MTMS and TEOS with caffeine as the template was coated on the assembled layer to form a thin uniform film. TEOS contributes to a higher rigidity of the siloxane network around the template, and APTMS was utilized as functional monomer for acted as functionalized monomer for molecular imprinting due to its amino group, which can interact with the template caffeine via hydrogen-bond, MTMOS was incorporated into the sol to introduce additional hydrophobicity and stability to the resultant materials.

In order to further investigate the MIS/MWCNT-VTMS electrode, scanning electron microscope (SEM) was performed to characterize the morphology, and the results were shown in Fig. 1. As shown in Fig. 1a, a MWNT layer was attached to the surface of the GCE electrode uniformly. The Fig. 1b shows the MWCNT layer was enveloped by the imprinting siloxane film, which was regularly distributed on the electrode surface, suggesting that a thin layer of MIS covers MWCNTs, without changing the morphology.

Typical DPV responses of the MIS/MWCNTs-VTMS/GC electrode were shown in Fig. 2A. An apparent response current peak at + 1.4 V was observed in Fig. 2A-a. However, when the MIS/MWCNTs-VTMS/GC electrode was eluted repeatedly with solution of methanol containing 10% acetic acid, there was no current response observed in the DPV in Fig. 4A-b.

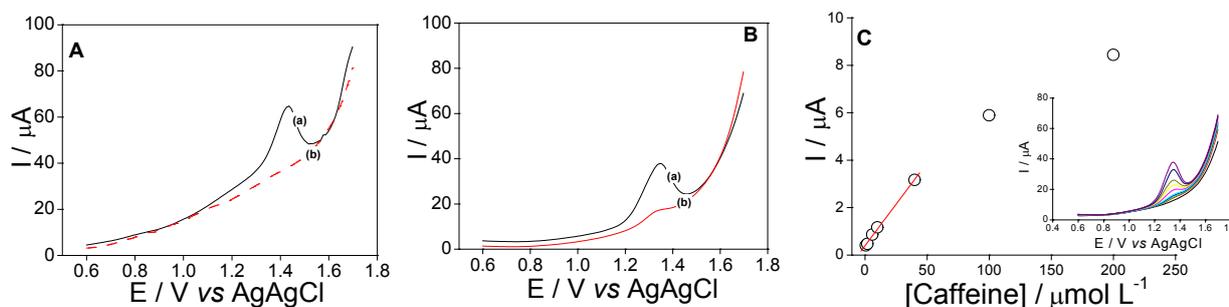


Figure 2: (A) DPV responses of the MIS/MWCNT-VTMS/GC electrode before (a) and after extraction (b). (B) DPV responses of the MIS/MWCNT-VTMS/GC electrode (a) and the NIS/MWCNT-VTMS/GC electrode (b) after incubation in 1 mmol L^{-1} caffeine for 20 min. Supporting electrolyte: 0.15 M phosphoric acid. (C) Analytical curve.

The rebinding ability of the MIS/MWCNT-VTMS/GC electrode with caffeine was investigated by DPV experiments. MIS/MWCNT-VTMS/GC electrode incubated in 1 mmol L^{-1} caffeine solution for 20 min (Fig. 2B-a) exhibited a much higher current response than that of the GC electrode just modified with the non-imprinted film NIS/MWCNT-VTMS/GC electrode (Fig. 2B-b). The excellent sensitivity of the MIS/MWCNT-VTMS/GC electrode towards caffeine was ascribed to the presence of the combination of MWCNT functional layer and the imprinted siloxane film. For determination of caffeine were parameters optimized to obtain better answers to the application of the sensor as shown in Table 1.

Table 1: Parameters used for the construction of the sensor.

Optimized parameters	Better conditions
Effect of rebinding time	20 min
Effect of electrolytes	Phosphoric acid
Effect of pH	1.5

In order to obtain an analytical curve for the developed sensor, experiments were carried out with additions of caffeine in 0.15 mol L^{-1} phosphoric acid (Fig. 2C). Under optimized conditions the proposed sensor showed a linear response range from 0.75 up to $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. A detection limit of $0.22 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ was determined using a $3\sigma/\text{slope}$ ratio and quantification limit was $0.22 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

After the analytical curve analysis was performed the determination the caffeine in samples of coffee and energy. For analysis, the samples did not undergo any pre-treatment, only one dilution. Thus, the sensor presented in this paper is a simple alternative for the detection of caffeine in real sample.

CONCLUSIONS

A sensitive and selective electrochemical imprinted/MWCNT sensor was developed for detection of caffeine via stepwise modification of MWCNT associated with a siloxane imprinted film on glassy carbon electrode. The excellent performance of the imprinted siloxane/MWCNT electrode towards caffeine can be ascribed to the MWCNT functional layer with electrochemical catalytic activities and the porous imprinted film with plentiful selective binding sites. Under the optimized analytical conditions, the peak current was linear to caffeine concentration from 0.75 to $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ with the detection limit of $0.22 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. With high selectivity and sensitivity, the imprinted sol-gel/MWCNTs sensor has great potential in the real sample analysis.

ACKNOWLEDGMENTS: FAPESP, CNPq and INCT de Bionalitica.

REFERENCES

- [1] Zhang, Z.-H., Hua, Y.-F., Zhang, H.-B., Luo, L.-J., Yao, S.-Z., "Electrochemical layer-by-layer modified imprinted sensor based on multi-walled carbon nanotubes and sol-gel materials for sensitive determination of thymidine", *J. Electroanal. Chem.* 644 (2010) 7–12.
- [2] Huang, J., Zhang, X., Lin, Q., He, X., Xing, X., Huai, H., Lian, W., Zhu, H., "Electrochemical sensor based on imprinted sol-gel and nanomaterials for sensitive determination of bisphenol A", *Food Control* 22 (2011) 786-791.
- [3] Abbaspour, A., Shamsipur, M., Sirouejnejad, A., Kia, R., Raithby, P.R., "Renewable-surface sol-gel derived carbon ceramic-modified electrode fabricated by a newly synthesized polypyridil and phosphine Ru (II) complex and its application as an amperometric sensor for hydrazine" *Electrochim. Acta* 54 (2009) 2916–2923.
- [4] Qin, S., Qin, D., Ford, W. T., Herrera, J. E., Resasco, D. E., "Grafting of Poly(4-vinylpyridine) to Single-Walled Carbon Nanotubes and Assembly of Multilayer Films", *Macromolecules* 37 (2004) 9963-9967.

SINERGISMO ENTRE POLI(5-AMINO 1-NAFTOL) E AZUL DA PRÚSSIA NA ELABORAÇÃO DE SENSORES PARA H_2O_2

Elaine Pavini Cintra¹, Denis Gabriel Blanco Limachi¹, Vinicius Romero Gonzalez² e Susana Inês Córdoba de Torresi²

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – IFSP-SP, São Paulo - SP – Brasil; ² Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo - SP – Brasil.

epcintra@gmail.com

RESUMO: Este trabalho descreve a elaboração de eletrodos modificados, para detecção de peróxido de hidrogênio, baseados na associação do polímero condutor funcionalizado poli(5-amino 1-naftol) ao Azul da Prússia (AP), na busca de um sinergismo entre as propriedades de cada um desses componentes. Após intensa investigação das condições ótimas de preparo (estudo em diferentes concentrações, variação na sequência de etapas de preparo, etc) o composto formado apresentou uma sensibilidade frente à detecção de H_2O_2 comparável ao do AP, com a vantagem de poder ser utilizado em meios contendo íons Na^+ .

Palavras-chave: poli(5-amino 1-naftol), azul da Prússia, sensores, polímeros condutores

INTRODUÇÃO

Os polímeros bifuncionalizados associam as interessantes características dos polímeros condutores à presença de grupos funcionais livres que podem realizar ligações com outras moléculas. Os termos monômeros ou polímeros funcionalizados também podem ser encontrados na literatura como referência a materiais que são modificados pela adição de um substituinte, como por exemplo, porfirinas [1], ligantes quirais [2], complexos metálicos, viológenos [3], grupos com potencial atividade catalítica [4], entre outros. Estas modificações são bastante interessantes, entretanto, são normalmente realizadas através de rotas sintéticas trabalhosas. Neste trabalho, o termo polímero funcionalizado refere-se a um polímero proveniente de um monômero que apresenta mais de um grupo funcional como $-OH$, $-NH_2$, $-NO_2$, por exemplo, e que mantém pelo menos um grupo funcional disponível após a eletropolimerização. O poli(5-amino 1-naftol), (poli(5- NH_2 1-NAP)) é um polímero condutor que pode ser eletropolimerizado a partir da monômero 5-amino 1-naftol (5- NH_2 1-NAP), sobre eletrodos de carbono vítreo, platina e ouro, em meio ácido ou básico. Em meio ácido o polímero formado apresenta uma estrutura do tipo “polianilina” (figura 1) é eletroativo e possui grupos $-OH$ disponíveis [5,6].

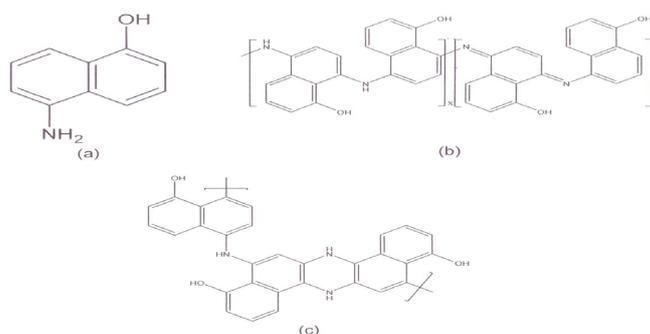


Figura 1: Estrutura do monômero 5-amino 1-naftol (a), e do polímero poli(5-amino 1-naftol) com acoplamento em pára (b), formando uma estrutura do tipo “polianilina”.

Compósitos de polímeros intrinsecamente condutores são materiais elaborados com polímeros condutores conjugados e, pelo menos, um segundo componente, podendo ele ser orgânico, inorgânico ou biológico, resultando num produto final que apresenta melhorias ou aparecimento de propriedades químicas, ópticas, elétricas e mecânicas que não eram observadas nos componentes individuais [7].

O azul da Prússia, um hexacianoferrato de ferro – $(Fe_4[Fe(CN)_6]_3)$, é capaz de realizar a detecção de H_2O_2 com excelentes propriedades eletroanalíticas, tais como alta sensibilidade e baixo limite de detecção [7,8], tendo ainda a vantagem de minimizar a interferência causada por espécies redutoras [8,9]. Daí o grande interesse em utilizá-lo na fabricação de eletrodos quimicamente modificados. Para realizar a compensação de carga entre as formas oxidada e reduzida, o Azul da Prússia necessita da incorporação de cátions nas vacâncias existentes em sua estrutura. Em meios contendo íons K^+ essa compensação ocorre de maneira satisfatória, entretanto, em meios contendo íons Na^+ , cujo raio iônico hidratado é maior do que o do íon K^+ , não existe a compensação de carga e o mediador perde a eletroatividade.

O Azul da Prússia apresenta vacâncias cujo raio estrutural é maior do que o raio iônico hidratado do K^+ , mas menor do que outros cátions como o Na^+ e o H^+ [10,11].

Este trabalho tem como objetivo a síntese de um compósito utilizando o poli(5-amino 1-naftol) e Azul da Prússia na busca de um sinergismo das propriedades de ambos visando a obtenção de um dispositivo otimizado para detecção de H_2O_2 .

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todos os reagentes foram utilizados sem purificação prévia. O poli(5-NH₂ 1-NAP) foi formado através da técnica de voltametria cíclica, aplicando-se um potencial de 0,0V a 0,9V nos dois primeiros ciclos e 0,0V a 0,75V nos demais ciclos, velocidade de varredura de 50mV s⁻¹ durante 50 ciclos em uma solução contendo o monômero 5-NH₂ 1-NAP 1mmol.L⁻¹ + HCl 1mol.L⁻¹. O Azul da Prússia foi formado através de voltametria cíclica, aplicando-se um potencial de -0,1V a 0,5V durante 50 ciclos numa velocidade de varredura de 50mV s⁻¹, em uma solução contendo FeCl₃ 1,5mmol.L⁻¹ + HCl 1mol.L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 1,5mmol.L⁻¹ + KCl 1mol.L⁻¹. O estudo de formação do compósito (poli(5-NH₂ 1-NAP) + azul da Prússia) incluiu duas etapas que foram investigadas com afincio na busca de condições de preparo otimizadas. Na primeira realizou-se a polimerização do monômero dopado com espécies pertencentes a formação primária do azul da Prússia, na segunda etapa incorporou-se à matriz polimérica espécies que completaram a formação do azul da Prússia. Após intensa investigação, onde foram variados as concentrações, a identidade do eletrodo e a ordem de adição dos reagentes formadores do azul da prússia [K₃Fe(CN)₆ e FeCl₃], a condição que apresentou o melhor resultado foi a seguinte: solução de HCl 1mol.L⁻¹, KCl 1mol.L⁻¹, FeCl₃ 1,5mmol.L⁻¹ e monômero (5-NH₂ 1-NAP) 1mmol.L⁻¹, faixa de potencial de 0,0V a 0,9V os dois primeiros ciclos e demais ciclos 0,0V a 0,75V, num total de 50 ciclos, a 50mVs⁻¹ em eletrodo de Au. Na segunda etapa o eletrodo no qual onde ocorreu a polimerização, é mergulhado por 2 horas em solução de K₃Fe(CN)₆ 1,5mmol.L⁻¹ e HCl 1mol.L⁻¹. Após esse tempo o eletrodo foi cilado numa faixa de potencial de 0,0V a 0,75V durante 100 ciclos, com velocidade de varredura de 50mV. A ciclagem do compósito formado foi feita tanto em meio contendo HCl 1mol.L⁻¹ + KCl 0,1mol.L⁻¹ como HCl 1mol.L⁻¹ + NaCl 0,1mol.L⁻¹ a 25mV s⁻¹. A detecção de H₂O₂ foi feita através de croamperometria a 0,0V, adicionando-se alíquotas de 5μL de H₂O₂ 0,1mol.L⁻¹ na solução a cada 300 segundos. A mesma detecção foi realizada substituindo a solução de KCl 0,1mol.L⁻¹ + HCl 1mol.L⁻¹ por NaCl 0,1mol.L⁻¹ + HCl 1mol.L⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro ciclo do processo de polimerização do monômero 5-amino 1-naftol apresenta um processo redox em, aproximadamente, 0,9V e é atribuído à oxidação do monômero [4]. A formação do poli(5-amino 1-naftol) pode ser evidenciada pelo processo redox que aparece a partir do 2º ciclo em aproximadamente +0,30V cuja corrente aumenta gradualmente a cada ciclo. A redução do potencial de inversão a partir do 3º ciclo de +0,9V para +0,75V é necessária para evitar a ocorrência de espécies secundárias que podem interferir na qualidade do polímero formado. O polímero sozinho não apresentou atividade frente a redução do H₂O₂. A figura 2(a) mostra os resultados obtidos na eletropolimerização em meio com HCl 1mol.L⁻¹ + KCl 1mol.L⁻¹ com monômero 5-NH₂ 1-NAP 2mmol.L⁻¹ + FeCl₃ 1,5mmol.L⁻¹ (primeira etapa da formação do compósito). O voltamograma cíclico deste processo apresenta características muito semelhantes àquelas do filme formado na ausência do Fe³⁺_(aq), indicando que a presença desses íons não interferem na eletropolimerização. A ciclagem na presença de HCl 1mol.L⁻¹ e K₃Fe(CN)₆ 1,5mmol.L⁻¹ é apresentada na figura 2(b). A detecção de H₂O₂ é apresentada na figura 2(c) em meio contendo solução de KCl 0,1mol.L⁻¹ + HCl 1mol.L⁻¹ e alíquotas de H₂O₂ 0,1mol.L⁻¹ com a aplicação de potencial fixo de 0,0V.

O comportamento eletroquímico observado durante a formação do compósito não possui diferenças relevantes quando comparado com a formação do poli(5-NH₂ 1-NAP) sozinho [5,6], entretanto, diferentemente do que ocorre com o polímero, o compósito media a redução do H₂O₂ com uma sensibilidade de 279 μA cm⁻² mmol⁻¹ L.

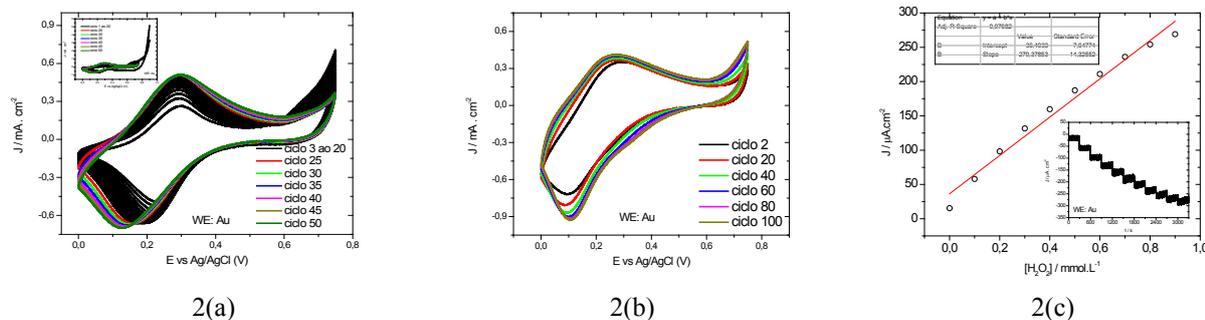


Figura 2: 2(a): eletropolimerização [monômero] = 2mmol L⁻¹, [FeCl₃] = 1,5mmolL⁻¹, [HCl] = 1 mol L⁻¹. 2(b): Ciclagem em meio contendo K₃Fe(CN)₆ em HCl 1molL⁻¹ + KCl 0,1 molL⁻¹, 2(c): Cronoamperograma em função da adição de alíquotas de H₂O₂ 0,1mmolL⁻¹ em HCl 1molL⁻¹ + KCl 0,1molL⁻¹; potencial fixo de 0,0V; adição a cada 300 segundos, após estabilização de 30 minutos a 0,0V. Eletrodo de Au com área = 0,2cm².

É conhecido que o azul da Prússia apresenta limitações para ser utilizado em presença de íons $\text{Na}^+_{(\text{aq})}$. Com o intuito de verificar se o compósito formado possui características distintas daquelas presentes no azul da Prússia, formado de maneira tradicional [10,11], foram realizados experimentos em meio contendo íons $\text{Na}^+_{(\text{aq})}$. Os resultados são apresentados na figura 3.

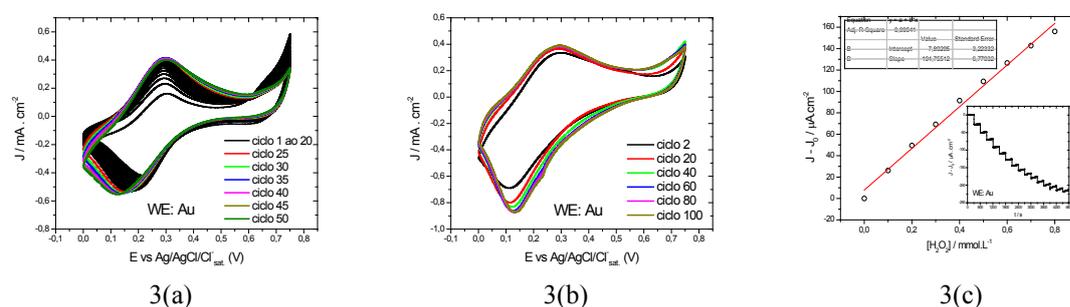


Figura 3 – (a) e (b) voltamogramas cíclicos e (c) cronoamperograma nas mesmas condições da figura 2, alterando o eletrólito na segunda e terceira etapas: $\text{NaCl } 0,1\text{molL}^{-1}$ ao invés de $\text{KCl } 0,1\text{molL}^{-1}$.

Os resultados apresentados na figura 3 mostram que o compósito formado possui características bem distintas daquelas encontradas no azul da Prússia sozinho: ele consegue mediar a redução do H_2O_2 em meio contendo íons $\text{Na}^+_{(\text{aq})}$ com uma sensibilidade da ordem de $195 \mu\text{A cm}^{-2} \text{mmol}^{-1} \text{L}$. Aparentemente os íons $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})}$ presentes durante a eletropolimerização do poli(5-A 1-N) são inseridos na estrutura polimérica e ao entrarem em contato com os íons $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ formam o azul da Prússia, entretanto, com características diferentes daquelas encontradas habitualmente, permitindo que a entrada de íons $\text{Na}^+_{(\text{aq})}$ que possui maior raio hidratado que os íons $\text{K}^+_{(\text{aq})}$.

AGRADECIMENTOS: FAPESP 2010/17008-6 E CNPQ.

REFERÊNCIAS

- [1] BALLARIN, B., SEEGER, R. e TONELLI, D. *Synt. Met.* 114: 279-285, 2000.
- [2] PELLON, P., DELTEL, E. e PILLARD, J. F. *Tetrahedron Lett.* 42: 867-869, 2001.
- [3] COSNIER, S. *Biosensors & Bioelectronics* 14: 443-456, 1999.
- [4] DERONZIER, A. e MOUTET, J.-C. *Acc. Chem. Res.* 22: 249-255, 1989.
- [5] CINTRA, E. P., CÓRDOBA DE TORRESI, S.I. *J. Electroanal. Chem.* 518: 33-40, 2002.
- [6] CINTRA, E.P., TORRESI, R.M., LOUARN, G, CÓRDOBA DE TORRESI S.I., *Electrochim. Acta* 49:1409-1415, 2004.
- [7] HATCHETT, D. W., JOSOWICZ, M. *Chem. Rev.* 108(2): 746-769, 2008.
- [8] CHENG, K.C., CHEN, F.R., Kai, J.J., *Electrochim. Acta* 52 (9): 3330-3335, 2007.
- [9] KARYAKIN, A.A., GITELMACHER, O.V., KARYAKINA, E.E., *Anal. Lett.* 27 (15):2861-2869, 1994.
- [10] FIORITO, P.A., BRETT, C.M.A. e CÓRDOBA DE TORRESI S.I, *Talanta* 69(2): 403, 2006.
- [11] FIORITO, P.A., GONCALES, V.R., PONZIO, E.A., de CÓRDOBA DE TORRESI S.I., *Chem. Commun.* 3: 366-368, 2005.

DETERMINAÇÃO DE L-GLUTATIONA EM ERITRÓCITOS HUMANOS EMPREGANDO UM ELETRODO MODIFICADO COM O COMPLEXO CoTsPc/FeT4MPyP SOB NANOTUBOS DE CARBONO

Ananda X. Oliveira¹, Fernando R. F. Leite¹, Jussara V. Silva¹, Lauro T. Kubota^{2,3}, Wallans T. P. dos Santos¹, Flávio S. Damos¹, Rita C. S. Luz¹

¹ Departamento de Química - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, Diamantina - MG - Brasil; ² Instituto de Química - Unicamp, Campinas - SP - Brasil; ³ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica - UNICAMP, Campinas -SP - Brasil.
ananda.xavier@hotmail.com

RESUMO: A atividade electrocatalítica do complexo supramolecular a base de ftalocianina tetrasulfonada de cobalto (II) e tetra-(N-metil-4-piridil)-porfirina de ferro (III), adsorvidos sob nanotubos de carbono de paredes múltiplas, foi investigada para oxidação de L-Glutationa (GSH). A Microscopia eletrônica de varredura e espectrometria de dispersão de raios-X foram utilizadas para caracterização da morfologia e composição dos materiais. O eletrodo modificado apresentou atividade electrocatalítica eficiente em relação à oxidação da GSH em potencial de oxidação de 0 V (vs. Ag/AgCl). O sensor apresentou resposta linear entre 2 a 210 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de 0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e desvio-padrão relativo para 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de GSH de 2,6% (n=10). O eletrodo modificado foi aplicado para determinação de GSH em eritrócitos humanos e os resultados foram concordantes com os obtidos por um método descrito na literatura, exibindo, portanto, um grande potencial para determinação de GSH em amostras biológicas.
Palavras-chave: L-Glutationa reduzida (GSH); Ftalocianina tetrasulfonada de cobalto (II); Tetra-(N-metil-4-piridil)-porfirina de ferro (III); Nanotubos de carbono de paredes múltiplas; Eritrócitos.

INTRODUÇÃO

A L-Glutationa reduzida (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) é um tiol de baixo peso molecular mais abundante encontrado em células de mamíferos. No corpo humano, a função fisiológica mais importante da GSH é a proteção das células contra os radicais livres e contra as espécies reativas de oxigênio, mantendo um adequado estado redox intracelular. A GSH é também um co-fator importante nos processos biológicos de metabolismo, catabolismo e transporte. Diversos estudos têm indicado que baixas concentrações de GSH em pacientes infectados pelo vírus HIV podem contribuir para sua imunodeficiência, existe, portanto, um grande interesse na quantificação de GSH em amostras biológicas devido ao seu potencial para diagnósticos. Neste sentido, o desenvolvimento de novos métodos para a determinação de GSH é de grande importância para aplicação dos mesmos em amostras biológicas. Sendo assim, o presente trabalho propõe a modificação de um eletrodo de grafite pirolítico de plano basal (GPPB) com os complexos CoTsPc e FeT4MPyP sob nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) para determinação de GSH em amostras biológicas.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectrofotometria de Dispersão de Raios-X foram obtidas para caracterização do NTCPM e do composto CoPsTc/FeT4MPyP/NTCPM. As medidas eletroquímicas foram realizadas com um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 10 acoplado a um microcomputador com o programa GPES 4.9. Para as medidas eletroquímicas foi empregada uma célula eletroquímica composta por três eletrodos – um disco BPPG montado em Teflon®, um de platina e um Ag/AgCl (sat.), sendo de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente.

A modificação do eletrodo GPPB se deu através da adição direta sobre a superfície do mesmo de 30 μL da dispersão preparada com 2,0 mg de NTCPM em 1 mL de solução equimolar de 1,5 mmol L^{-1} de CoTsPc/FeT4MPyP em DMF. O eletrodo foi seco a 80° por 10 minutos.

10 mL de amostras de sangue coletadas de oito voluntários jovens foram, posteriormente, centrifugadas, lavadas com solução tampão fosfato (0,2 mol L^{-1} , NaCl 0,9%, pH 7,4), e alíquotas destes foram hemolisadas (1:1 v/v) em solução $\text{Na}_2\text{H}_2\text{-EDTA}$ 1 mmol L^{-1} . Adicionou-se, em seguida, ácido 5-sulfosalicílico a 10% (m/v) seguido por uma agitação vigorosa e centrifugação. O sobrenadante foi coletado para determinação de GSH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, investigou-se a morfologia dos NTCPM não modificados (Figura 1a) e dos NTCPM modificados com CoTsPc/FeT4MPyP/NTCPM (Figura 1b). Nesta figura, observa-se um material agregado no NTCPM, provavelmente devido à presença do complexo CoTsPc/FeT4MPyP. Este material mostra que os nanotubos são totalmente recobertos

pelos complexos de forma bastante evidente. Posteriormente, realizou-se voltamogramas cíclicos do eletrodo GPPB/CoTsPc/FeT4MPyP/NTCPM em tampão fosfato (pH 7,4) em várias velocidades de varredura, como mostrado na Figura 1c.

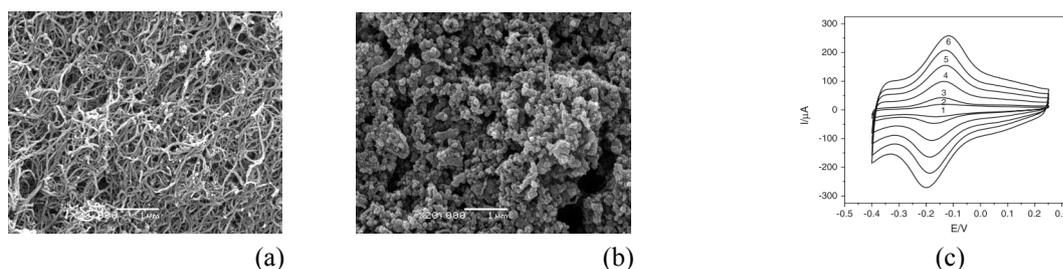


Figura 1: (a) Imagem de MEV dos NTCPM; (b) Imagem dos NTCPM modificados com CoTsPc/FeT4MPyP. (c) Voltamogramas Cíclicos (VC's) do eletrodo GPPB/CoTsPc/FeT4MPyP/NTCPM em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) no intervalo de potencial de varredura de 0,01 – 0,1 V s⁻¹.

Os voltamogramas cíclicos da Figura 1c mostraram um par redox referente às reações redox das espécies imobilizadas [Fe(II)T4MPyP]³⁺ e [Co(I)TsPc]⁴⁻ em [Fe(III)T4MPyP]⁴⁺ e [Co(II)TsPc]³⁻, respectivamente. Em velocidades de varredura até 0,1 V s⁻¹ observa-se que existe uma relação linear entre as correntes anódicas e catódicas com a velocidade de varredura, o que nos sugere a existência de um processo adsorptivo.

Já a Figura 2a mostra a atividade electrocatalítica do eletrodo GPPB/CoTsPc/FeT4MPyP/NTCPM na ausência (curva 1) e na presença (curva 2) de GSH, a qual foi comparada com o VC do eletrodo não modificado (Figura 2b) na ausência (curva 3) e na presença (curva 4) de GSH. O par redox apresentado na Figura 2a curva 1 ocorre devido aos processos redox do ferro e do cobalto – centros metálicos dos complexos. Após a adição de GSH, foi observado um significativo aumento na corrente de pico anódica, não sendo observado pico de corrente catódica (curva 2), caracterizando um processo de oxidação electrocatalítica.

A modificação do eletrodo GPPB apenas com os complexos (sem NTCPM, Figura 2b curva 1) levou a uma resposta mais baixa que a obtida com a modificação do eletrodo com NTCPM (Figura 2b curva 2), demonstrando a importância da presença destes para melhorar a resposta de GSH em baixos potenciais, o que pode estar associado à habilidade que os NTCPM possuem de fixar e dispersar os complexos.

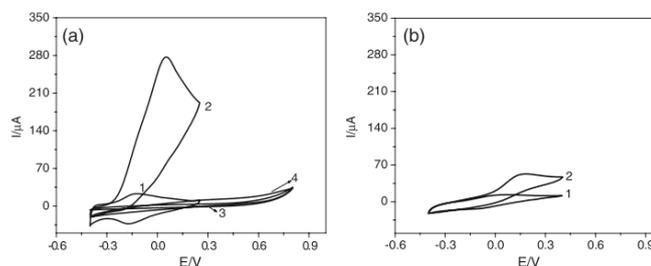


Figura 2: (a) VC do eletrodo GPPB/CoTsPc/FeT4MPyP/NTCPM na ausência (1) e na presença (2) de GSH e VC do eletrodo não-modificado na ausência (3) e na presença (4) de GSH. (b) VC do eletrodo GPPB/CoTsPc/FeT4MPyP na ausência (1) e na presença (2) de GSH. Os voltamogramas foram obtidos usando a concentração de 5,0 mmol L⁻¹ de GSH em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,4).

Após verificar a resposta de GSH nos diferentes eletrodos modificados (Fig. 2), realizou-se a otimização dos parâmetros experimentais (concentração de NTCPM, de CoTsPc/FeT4MPyP, solução tampão e concentração da solução tampão). Posteriormente, uma curva amperométrica (Figura 3a) da oxidação de GSH em diferentes concentrações em 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato (pH 7,4) foram realizados aplicando um potencial de 0 V. O eletrodo GPPB/CoTsPc/FeT4MPyP/NTCPM apresentou uma resposta linear para o analito num intervalo de 2 a 210 μmol L⁻¹ (Figura 3b), com r= 0,999 (n=20). O limite de detecção do sensor desenvolvido foi de 0,03 μmol L⁻¹ e o limite de quantificação foi de 0,1 μmol L⁻¹. Adicionalmente, estudos de interferentes sob a resposta do sensor foram realizados e nenhuma resposta significativa foi observada, demonstrando a seletividade do sistema desenvolvido.

DPR para 10 determinações de 110 μmol L⁻¹ de GSH foi de 2,6% e o DPR para 10 sensores preparados nas mesmas condições foi de 3,8%. Os resultados indicaram uma boa estabilidade e repetibilidade do eletrodo modificado para determinação de GSH.



Figura 3: (a) Curva amperométrica da eletro-oxidação de GSH obtidas em tampão fosfato pH 7,4 para diferentes concentrações: (1) 2, (2) 9,8, (3) 19,4, (4) 28,8, (5) 38,2, (6) 47,2, (7) 56,0, (8) 64,8, (9) 73,2, (10) 82,8, (11) 90,2, (12) 98,0, (13) 114,0, (14) 128,6, (15) 144,0, (16) 158,0, (17) 172,0, (18) 185,0, (19) 198,0 e (20) 210 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Potencial aplicado de 0 V vs Ag/AgCl. (b) Gráfico referente à curva amperométrica.

O eletrodo GPPB/CoTsPc/FeT4MPyP/NTCPM foi aplicado em oito amostras de eritrócitos para determinação de GSH (Tabela 1) através do método de adição padrão. Os desvios-padrão encontrados foram comparados com os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico de referência e se mostraram mais baixos que estes. O teste t de Student para um nível de confiança de 95% mostrou que não há diferença significativa entre os métodos. O teste de recuperação mostrou que não há influência da matriz na resposta do sensor. O sensor foi testado por pelo menos dois meses e não apresentou nenhuma diminuição significativa na resposta para GSH.

Tabela 1: Determinação de L-Glutationa em oito amostras de eritrócitos humanos (realizadas em triplicatas)

Amostras	Através deste Método mmol L^{-1}	Método Espectrofotométrico mmol L^{-1}
1	0,87 ($\pm 0,01$)	0,82 ($\pm 0,04$)
2	0,99 ($\pm 0,01$)	0,94 ($\pm 0,04$)
3	1,18 ($\pm 0,02$)	1,00 ($\pm 0,05$)
4	1,95 ($\pm 0,02$)	1,89 ($\pm 0,06$)
5	0,97 ($\pm 0,02$)	1,32 ($\pm 0,05$)
6	1,36 ($\pm 0,03$)	1,30 ($\pm 0,05$)
7	1,52 ($\pm 0,02$)	1,47 ($\pm 0,06$)
8	1,64 ($\pm 0,03$)	1,60 ($\pm 0,05$)

CONCLUSÕES

A oxidação eletroquímica de GSH foi bastante satisfatória pelo uso de um eletrodo GPPB/CoTsPc/FeT4MPyP/NTCPM. Assim, um sensor sensível a GSH foi desenvolvido quando os complexos CoTsPc e FeT4MPyP são combinados aos NTCPM. O sensor apresentou boas características como amplo intervalo de determinação, baixo limite de detecção e boa estabilidade a longo-prazo. O limite de detecção e a sensibilidade para GSH foram muito melhores que as descritas na literatura. O sensor mostrou boa repetibilidade e baixos desvios-padrão para as medidas. O sensor foi aplicado em amostras biológicas e os resultados foram de acordo com os obtidos pelo método de referência descrito na literatura. Neste sentido, o presente trabalho demonstrou que o eletrodo GPPB/CoTsPc/FeT4MPyP/NTCPM é sensível, robusto e estável, apresentando um grande potencial para determinação de GSH em amostras biológicas.

AGRADECIMENTOS: FAPEMIG, CNPQ.

REFERÊNCIAS

- [1] WILDGOOSE G.G., BANKS C.E., LEVENTIS H.C., COMPTON R.G., "Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis", *Microchim Acta* 152:187-214, 2006.
- [2] WILDGOOSE G.G., WILKINS S.J., WILLIAMS G.R., FRANCE R.R., CARNAHAN D.L., JIANG L., JONES T.G.J., COMPTON R.G., "Graphite powder and multiwalled carbon nanotubes chemically modified with 4-nitrobenzylamine", *Chem Phys Chem* 6:352-362, 2005.

AVALIAÇÃO DE UM ELETRODO COMPÓSITO PARA DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS

Francielle Calegari¹ (IC), Lismery Pereira de Souza¹ (IC), Ronilson Vasconcelos Barbosa² (PQ), Luiz Humberto Marcolino Júnior¹ (PQ), Marcio Fernando Bergamini¹ (PQ)

¹ Laboratório de Sensores Eletroquímicos (LabSensE), Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-PR; ² Laboratório de Polímeros Sintéticos (LabPol), Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba - PR.
fran_calegari@hotmail.com, lis_souza84@hotmail.com

RESUMO: O comportamento voltamétrico de um novo eletrodo compósito preparado com Etileno Vinil Acetato(EVA) e Negro de Fumo(NF) é relatado. Diversos parâmetros experimentais como a composição do material eletródico, intervalo útil de potencial em diferentes eletrólitos, foram investigados. Os melhores resultados foram obtidos para eletrodos preparados com 60% (m/m) NF e 40% (m/m) EVA. Os dispositivos foram avaliados como eletrodo redox em uma titulação potenciométrica de íons Fe^{2+} , na determinação voltamétrica de ácido ascórbico(AA) e como suporte para preparação de um eletrodo quimicamente modificado(EQM) empregando um filme de azul da Prússia. Depois de otimizadas as condições experimentais, uma curva analítica com linearidade na resposta entre $5,0 \times 10^{-6}$ e $5,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foi obtida para o AA, com um limite de detecção de $2,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O eletrodo compósito avaliado na preparação de um EQM também apresentou estabilidade na resposta voltamétrica, o que evidencia a potencialidade analítica do eletrodo proposto na preparação de sensores voltamétricos.

Palavras-chave: Eletrodo compósito, Negro de Fumo, EVA, azul da prússia.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento dentro da Química Analítica. Os novos desafios propostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental, têm levado a uma crescente busca por dispositivos com melhores características, tais como alta sensibilidade, seletividade, estabilidade^[1], maior robustez e possibilidade de adaptações no tamanho e arranjo de eletrodos. Atualmente, diversos tipos de materiais são empregados na preparação e construção de sensores, destaque para eletrodos metálicos e eletrodos a base de carbono. Além desses dispositivos, uma gama enorme de possibilidades é relatada para eletrodos compósitos, os quais podem ser definidos como “um material que consiste em pelo menos uma fase condutora misturada com pelo menos uma fase isolante”^[2]. Em linhas gerais, a fase condutora é composta por um metal ou pó de carbono e a fase isolante por um aglutinante orgânico.

Diversos trabalhos são relatados empregando principalmente o carbono em suas várias formas alotrópicas e granulares como material condutor. Esses materiais condutores são misturados a diversas espécies de materiais poliméricos para formar o compósito. O uso principal encontrado para o polímero EVA na preparação de eletrodos é como plastificante na fabricação de membranas utilizadas em sensores potenciométricos íons seletivos. Entretanto, poucos estudos investigaram o uso deste polímero na construção de eletrodos compósitos. Dentre as diversas características do EVA as principais vantagens na utilização desse polímero como aglutinante está na estabilidade mecânica e a possibilidade de realizar medidas em solventes não aquosos. A aplicabilidade dos dispositivos pode ser aumentada pela introdução de espécies na superfície eletródica, visando alterar as características da interface eletrodo/solução e contribuindo assim para melhorar a seletividade e sensibilidade. Um bom exemplo é o azul da Prússia (PB), um modificador muito utilizado para a determinação de peróxido de hidrogênio^[3], ácido ascórbico^[4], além de poder ser utilizado em meio não-aquoso^[5].

Sendo assim, o presente trabalho apresenta uma investigação do uso de um material compósito formado por EVA e NF na preparação de eletrodos, os quais foram avaliados em condições potenciométricas e voltamétricas.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Preparação do Material Compósito e construção do eletrodo: Os materiais compósitos utilizados no preparo dos eletrodos de trabalho foram preparados e cedidos pelo LabPol na forma de discos irregulares com composições variando 25 a 70% EVA e 30 a 75% NF. Para a construção dos eletrodos, o material foi cortado manualmente em pequenos fios e o contato elétrico foi feito através de um fio de cobre envolto em uma extremidade do filete. Como suporte para a montagem foram utilizadas ponteiros de micropipetas de 1000 μ L preenchidas com adesivo epóxi.

Equipamentos: Para as medidas potenciométricas foi utilizado um pHmetro 780 metrohn® com um conjunto de dois eletrodos. As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato

μ AUTOLAB tipo III empregando uma célula convencional de três eletrodos. Em ambos os casos, os eletrodos de referencia e trabalho foram de Ag/AgCl, KCl sat. e o compósito EVA/NF, respectivamente. Para medidas voltamétricas o contra eletrodo foi um fio de Platina.

Determinação de AA: Voltmetria cíclica em uma solução de tampão fosfato de pH 2,5, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , em um intervalo de potencial entre 0 e 1,1 V. (vs. Ag/AgCl KCl sat.).

Titulação potenciométrica: Utilizando $(\text{NH}_4)\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como titulante e $(\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$, em meio ácido.

Formação do filme: O filme de azul da Prússia (PB) foi preparado empregando um procedimento potenciodinâmico. A formação do PB foi efetuada utilizando uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , com ciclagem consecutiva (30 ciclos), em um intervalo de potencial entre -0,5 e 1,2 V (vs. Ag/AgCl KCl saturado) em solução contendo $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de FeCl_3 , $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de KCl e $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de HCl.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi realizado um estudo visando investigar qual a melhor composição de material eletródico para a construção de um sensor voltamétrico. A Figura 1 apresenta voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ferricianeto de potássio para eletrodos de diferentes composições.

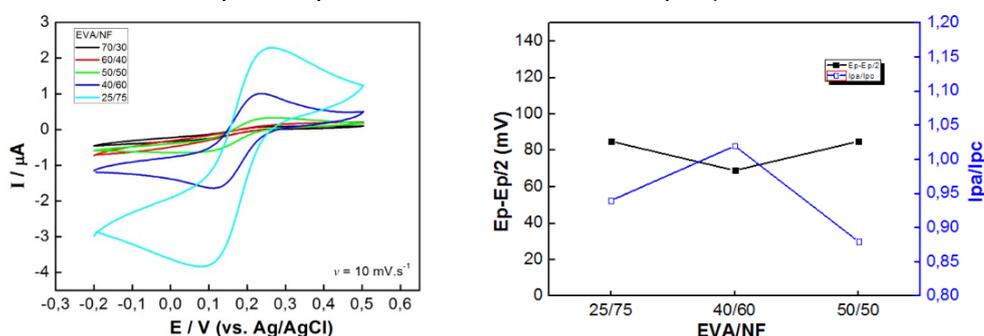


FIG 1: (a) Voltamogramas ciclicos obtidos em solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. (b) Influência da composição do material eletródico na razão das correntes de pico e de $E_p - E_{p/2}$.

De acordo com a Figura 1 é possível observar que o eletrodo que apresentou o melhor desempenho foi o de 40 EVA/60 NF, o qual foi selecionado para estudos posteriores. Eletrodos preparados com maior quantidade de negro de fumo não apresentaram homogeneidade suficiente, além de um baixa resistência mecânica. Amostras com maiores teores de EVA apresentaram um perfil voltamétrico resistivo e uma menor magnitude de corrente. Um estudo da velocidade de varredura com a composição selecionada apresentou uma variação linear das correntes de pico, anódica e catódica, em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, o que sugere um transporte de massa por difusão. O intervalo de potencial útil para o eletrodo 40/60 foi avaliado em diferentes meios: KNO_3 , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (-0,35 V a 1,35 V), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH (-0,65 V a 1,10 V) e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ H_2SO_4 (-0,40 V a 1,30 V) demonstrando que o eletrodo compósito apresenta uma ampla faixa de potencial útil, sendo possível a sua aplicação para determinação de diversos analitos, como ácido ascórbico. Depois de otimizadas as condições experimentais, construiu-se uma curva analítica no intervalo de concentração de AA de $5,0 \times 10^{-6}$ à $5,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de $2,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foi obtido. Foi possível determinar a concentração de Fe^{2+} através de uma titulação potenciométrica utilizando o eletrodo compósito desenvolvido, na qual utilizou-se um volume de titulante de 14,50 mL, apresentando um erro de 3,33% em relação a concentração real da amostra.

A figura 2 mostra o perfil voltamétrico do filme de PB formado sob a superfície do eletrodo compósito. Mesmo com sucessivas ciclagens o perfil permanece estável, o que indica a possibilidade da utilização do filme para estudos futuros, como por exemplo, na determinação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

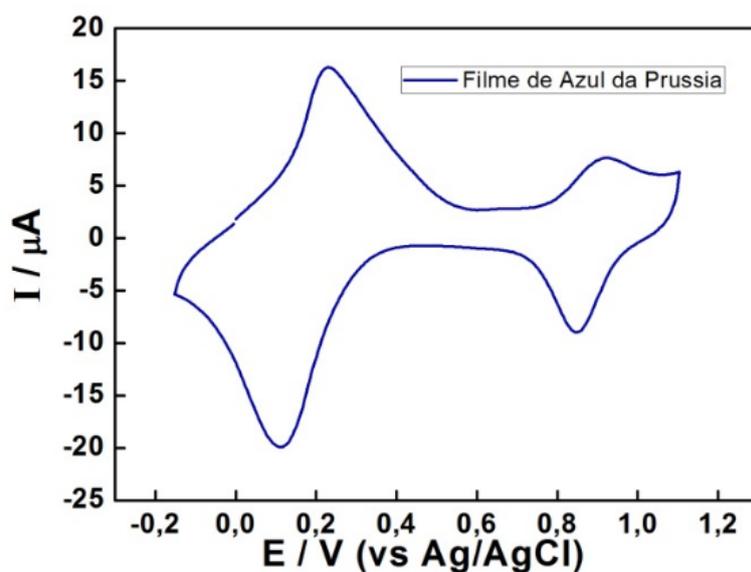


FIG 2: Voltametria cíclica do eletrodo composto modificado com filme de azul da prússia utilizando velocidade de 25 mV s^{-1} em meio de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

CONCLUSÕES

A proporção de 40% de EVA e 60% de NF apresentou melhores resultados para usos analíticos. O Eletrodo de composição selecionada foi empregado com sucesso para o monitoramento de uma titulação potenciométrica e na determinação voltamétrica de AA. O eletrodo modificado com o filme de PB apresenta um perfil voltamétrico estável e pode ser promissor para o desenvolvimento de sensores voltamétricos.

AGRADECIMENTOS

CNPq, CAPES/PROCAD, PET, UFPR, DQUI.

REFERÊNCIAS

- [1] Freire, R. S.; Pessoa, C. A.; Kubota, T. "Emprego de Monocamadas Auto-Organizadas no Desenvolvimento de Sensores Eletroquímicos." *Química Nova*; 26, 381, 2002.
- [2] Tallman, D. E.; Petersen, S. L. "Composite electrodes for electroanalysis: Principles and applications." *Electroanalysis*; 2, 499, 1990.
- [3] Karyakin, A. A.; Karyakina, E. E.; Gorton, L. "On the mechanism of H_2O_2 reduction at Prussian Blue modified electrodes." *Electrochemistry Communications*; 1, 78, 1999.
- [4] Castro, S. S. L.; Balbo, V. R., Barbeira, P. J. S., Stradiotto, N. R. "Flow Injection amperometric detection of ascorbic acid using a prussian blue film-modified electrode" *Talanta*; 55, 249, 2001.
- [5] Tosta, L. M. "COMPORTAMENTO ELETROCRÔMICO DE FILMES DE AZUL DA PRÚSSIA EM CARBONATO DE PROPILENO" Curitiba, Programa de Pós Graduação em química – UFPR, 2008. Dissertação de mestrado.

DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO À BASE DE PAPEL COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA SEQUENCIAL DE PARACETAMOL E 4-AMINOFENOL

Leandro Y. Shiroma¹, Murilo Santhiago¹, Ângelo Luiz Gobbi²,
Lauro T. Kubota¹

¹ Instituto de Química - UNICAMP, Campinas - SP - Brasil; ² Laboratório Nacional de Luz Síncrotron-LNLS, Campinas – SP – Brasil. INCTBio – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica. leandroyoshio@hotmail.com

RESUMO: O presente trabalho descreve a construção e aplicação de dispositivos microfluídicos de separação à base de papel com detecção eletroquímica visando a detecção e quantificação de maneira rápida e simplificada de paracetamol e 4-aminofenol. Os canais de separação foram criados no papel através de um processo de impressão com cera para delimitar as regiões do dispositivo. O sistema de detecção constituído por eletrodos de ouro foi formado ao final dos canais através de um processo conhecido como sputtering. Os parâmetros experimentais como tipo de papel, pH, composição do eluente, volume de amostra, tamanho e largura da coluna de papel foram avaliados e, nas condições de maior resposta, foi possível construir uma curva analítica com uma ampla faixa linear (0,05 até 2,00 mmol L⁻¹). O dispositivo foi aplicado em amostras reais apresentando resultados satisfatórios.

Palavras-chave: Detecção eletroquímica, microfabricação, papel, dispositivos simples, paracetamol.

INTRODUÇÃO

A descoberta do paracetamol (PA) como um efetivo antipirético e analgésico em meados da década de 1940, levou a um grande avanço na área farmacêutica em relação às outras substâncias utilizadas para o mesmo propósito. Por exemplo, a fenacetina e a acetanilida, ambos usados desde o fim da década de 1880, apresentavam efeitos colaterais hematológicos e nefrotóxicos no organismo de seus usuários, o que não ocorria com o paracetamol [1]. Assim, desde essa época, medicamentos que contém pelo menos como um de seus componentes o paracetamol estão colocados entre os mais comercializados e consumidos de todo o mundo.

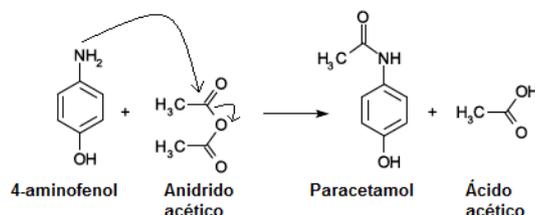


Figura 1-Reação de síntese do paracetamol

A síntese industrial do paracetamol ocorre através da reação de acetilação do 4-aminofenol com anidrido acético, como esquematizado na Figura 1. Em determinadas condições, o paracetamol pode sofrer degradação, tendo como produto principal o 4-aminofenol (AF). Estudos demonstram que o AF tem propriedades nefrotóxicas e teratogênicas no organismo humano [2], fazendo com que precise ter seus níveis de concentração controlados nos medicamentos à base de paracetamol. Esse controle, atualmente, pode ser realizado através da análise do medicamento por HPLC em fase reversa ou espectrofotometria [3,4]. No entanto, existe uma necessidade atual por dispositivos analíticos mais simples que possam fornecer resultados rápidos e análises descomplicadas, sem a necessidade de uma estrutura laboratorial para efetuar a análise. Tal necessidade tem impulsionado a procura por materiais com custo reduzido e que possam agregar inúmeras vantagens ao dispositivo. Além do baixo custo, o papel apresenta vantagens que são atrativas para o desenvolvimento de dispositivos analíticos, como: (i) produção em larga escala em todo o mundo, (ii) versatilidade e fácil manipulação (impressão, revestimento e impregnação), (iii) pode ser reciclado, (iv) biodegradável, (v) celulose tem origem natural e (vi) a estrutura porosa do papel possibilita a construção de dispositivos microfluídicos.

Dispositivos microfluídicos à base de papel são facilmente construídos através da inserção de paredes hidrofóbicas no papel. Nesses dispositivos as amostras são direcionadas através da ação da capilaridade para o sistema de detecção. O acoplamento da detecção eletroquímica nesses dispositivos é interessante devido à possibilidade de miniaturização, portabilidade, baixo custo e alta sensibilidade desse sistema de detecção.

Assim, o presente trabalho propõe a detecção e quantificação de paracetamol e 4-aminofenol em um dispositivo de separação à base de papel com detecção eletroquímica, atendendo assim às exigências de uma análise de baixo custo e simples, podendo ser estendida à portabilidade da mesma.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente, canais de 50 mm de comprimento e com largura de 1 – 5 mm foram desenhados utilizando um software gráfico computacional. Com o desenho estabelecido, folhas de papel WHATMAN n.º 1 e trocador catiônico P81 foram colocadas em uma impressora Xerox phaser que possui cera na formulação da tinta. Os canais foram impressos nas folhas e em seguida tratados termicamente a 110 °C por cerca de 2 minutos em uma chapa de aquecimento.

Após a construção dos canais, foi construída uma máscara em cobre com desenho de três eletrodos. Para a construção do sistema de detecção eletroquímico a máscara em cobre foi posicionada sobre a superfície do papel de modo que os contatos fossem estabelecidos na porção hidrofóbica e os eletrodos na porção hidrofílica. Em seguida, um filme de ouro de aproximadamente 200 nm foi depositado sobre a superfície do papel através de um processo conhecido como *sputtering*. Para estabelecer o contato elétrico com o dispositivo foi construído um conector utilizando cabos coaxiais, capa DB9, peças em teflon e um conector N/Lock, conforme ilustrado na Figura 2(a).

Todos os testes de otimização foram realizados com padrões de paracetamol e 4-aminofenol, preparados em solução tampão acetato de sódio/ ácido acético 0,1 mol L⁻¹. O eluente utilizado foi também o tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, e as medidas eletroquímicas foram feitas em um potenciostato / galvanostato modelo PGSTAT 302N da AUTOLAB.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O dispositivo microfluídico de separação apresenta seis regiões importantes para o seu funcionamento, Figura 2(b). Após o dispositivo ter sido devidamente encaixado no conector o eluente é colocado na região de entrada do dispositivo. Assim, o eluente se move por ação da capilaridade através do canal hidrofílico até a região de escape do dispositivo, que funciona como um reservatório de descarte. As amostras e soluções padrões são injetadas após a entrada do eluente e detectadas amperometricamente no sistema de detecção eletroquímico que fica ao final do canal.

Inicialmente os dispositivos usados foram construídos com a utilização de papel WHATMAN n.º 1, por se apresentarem versáteis para diversas análises cromatográficas em papel. Entretanto, a separação dos analitos não ocorre nessa plataforma, assim como pode ser observado no cromatograma ilustrado na Figura 2(c). Assim foi necessária a busca de outro tipo de papel em que a separação pudesse ocorrer em função do pKa dos analitos. Visto que os analitos possuem valores bem distintos de pKa, 9,51 para o grupo R–OH do paracetamol e 5,48 para o grupo R–NH₃ do 4-aminofenol, foram construídos dispositivos utilizando um papel trocador catiônico WHATMAN P81 para favorecer o processo de separação. Como pode ser observado na Figura 2(d), há uma separação em nível de linha de base para os analitos, justificando, portanto, a escolha desse tipo de papel para a construção dos dispositivos microfluídicos.

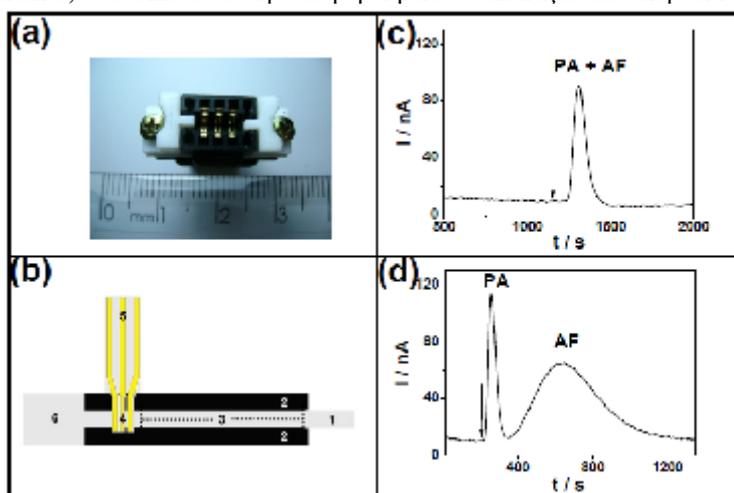


Figura 2: (a) Foto da região frontal do conector. (b) Ilustração esquemática do microdispositivo e suas regiões principais: 1) Entrada do eluente; 2) paredes hidrofóbicas; 3) região de adição da amostra; 4) região de trabalho dos eletrodos; 5) região do dispositivo que é encaixada no conector e 6) região de escape do eluente. Cromatogramas utilizando como eluente solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,5 e E_{ap} = 0,4 vs. Au empregando o papel WHATMAN n.º 1 (c) e P81 (d). As setas indicam o tempo de injeção de 500 nL de uma solução contendo PA e AF 2 mmol L⁻¹ cada.

No contexto da separação por troca iônica, o pH é uma variável que afeta diretamente os resultados na busca por uma separação satisfatória. Dessa maneira, foram realizadas análises em diversos valores de pH e o que apresentou

melhor separação foi 4,5. Nesse meio o AF se encontra na sua forma protonada e o PA desprotonado, portanto o AF fica mais retido na coluna e favorece o processo de separação.

Após o estudo do pH, foram conduzidos experimentos para avaliar a influência de alguns parâmetros na separação dos analitos. No estudo da distância de injeção de amostra em relação aos eletrodos foi observada uma melhor resolução dos picos ($R_s \sim 1,2$) e menor tempo de análise para a distância de 10 mm. Assim a distância de 10 mm foi selecionada e empregada para avaliar o efeito do volume de amostra na separação. Nesse estudo, foram testados seis diferentes volumes de alíquotas injetadas no dispositivo: 500 a 3000 nL. Volumes superiores a 1000 nL apresentaram sobreposição de picos (devido à sobrecarga de amostra na coluna), portanto, o volume de 500 nL foi selecionado e empregado nos testes subsequentes.

As dimensões do dispositivo, comprimento e largura da coluna cromatográfica, também foram avaliadas. O comprimento foi estudado na faixa de 15 até 35 mm e, já que em todos os comprimentos testados as resoluções dos picos foram satisfatórias, o comprimento de 15 mm foi selecionado devido ao menor tempo de análise nessa condição. A largura de canal de 2,0 mm apresentou maior resolução, maior área de picos e ainda com o menor tempo de análise, assim, essa largura de canal foi selecionada para a construção da curva analítica.

Com os parâmetros definidos foi construída a curva analítica para os analitos, utilizando a área dos picos para fins quantitativos. A curva analítica apresentou uma faixa linear de resposta de $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ a $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$. Os coeficientes de correlação foram maiores que 0,997 e os limites de detecção ficaram na ordem de $25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

Após a construção da curva analítica foram feitas análises de amostras de medicamentos contendo paracetamol. Para as análises, as amostras não passaram por nenhum tipo de pré-tratamento, apenas uma diluição. Dessa maneira, o próprio papel foi encarregado de realizar a etapa de *clean-up* da amostra.

O dispositivo microfluídico apresentado neste trabalho é uma alternativa simples e de baixo custo para detecção e quantificação de paracetamol e 4-aminofenol em amostras de medicamentos.

AGRADECIMENTOS: FAPESP, CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] BRODIE, B.B.; AXELROD; "The Fate of Acetanilide in Man" *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 94(1): 29-38, 1948.
- [2] Song H., Chen T.S. "p-Aminophenol-induced liver toxicity: Tentative evidence of a role for acetaminophen", *J. Biochem.Mol. Toxicol.*, 15(1): 34-40, 2001.
- [3] SORNCHAITHAWATWONG, C.; VORRARAT, S.; NUNTHANAVANIT, P.; "Simultaneous Determination of Paracetamol and its main degradation product in generic Paracetamol tablets using Reverse-Phase HPLC". *J. Health Res.*, 24(3): 103-106, 2010.
- [4] KAMYABI, M.A.; "Simultaneous Spectrophotometric Determination of Paracetamol and p-Aminophenol by Using Mean Centering of Ratio Kinetic Profiles". *J. Chin. Chem. Soc.*, 56(1): 142-149, 2009.

DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR SELETIVO E CATALÍTICO PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE DOPAMINA E NADH EMPREGANDO SAMs MISTAS.

Ana Luísa A. Lage¹ (IC), Danielle D. Justino¹ (IC), Rita de Cássia S. Luz^{1,3} (PQ), Lauro T. Kubota^{1,2} (PQ) e Flavio S. Damos^{1,3} (PQ)

¹ Departamento de Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, Diamantina - MG – Brasil; ² Instituto de Química - Unicamp, Campinas - SP - Brasil; ³ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, UNICAMP, Campinas-SP-Brasil.
analuisalage@gmail.com

RESUMO: Este trabalho apresenta o desenvolvimento de uma Monocamada Auto-Organizada (SAM, do Inglês Self-Assembled Monolayer) mista composta de ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e ácido 4-mercaptobenzóico (MBA). Após a confecção da SAM mista, o grupo nitro do ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico foi reduzido com o propósito de gerar na superfície o par redox (-NHOH/-NO). A SAM foi então avaliada em relação à sua à Dopamina (DA) frente ao Ácido Ascórbico (AA) possibilitando a detecção de dopamina na presença de AA. Conforme observado, o aumento na densidade de grupos carboxílicos com a introdução do MBA na SAM de DTNB resultou numa excelente seletividade à DA frente ao AA sem prejuízo à eletrocatalise do NADH.

Palavras-chave: Monocamadas Auto-organizadas, Dopamina, Ácido Ascórbico, NADH.

INTRODUÇÃO

A oxidação eletroquímica da adenina dihidroxicotinamida dinucleotídeo (NADH) tem recebido considerável interesse devido ao seu papel importante como co-fator enzimático. No entanto, a oxidação direta do NADH em um eletrodo sólido convencional é altamente irreversível, exige uma alta energia de ativação e há envenenamento da superfície do eletrodo [1]. Por outro lado, a Dopamina (DA) desempenha um importante papel fisiológico como um mensageiro químico celular e como resultado, sua determinação em amostras biológicas em tempo real tem sido de grande importância em estudos neuroquímicos [2].

Além da necessidade de se alcançar baixos limites de detecção, a determinação de DA é complicada pela coexistência de compostos interferentes. Entre eles, o ácido ascórbico (AA) é de particular importância por estar em maiores concentrações no organismo [3]. Desse modo, a seletividade e a sensibilidade são extremamente importantes para o desenvolvimento de qualquer procedimento para a determinação de DA. Neste sentido, as técnicas eletroquímicas tem se mostrado extremamente vantajosas para este tipo de determinação uma vez que apresenta excelente sensibilidade. Embora a DA seja eletroativa de forma a poder ser determinada eletroquimicamente, um problema que persiste na determinação eletroquímica de DA na presença de AA, causado pela sobreposição de potenciais de oxidação dos mesmos sobre os mais variados materiais de eletrodo bem como modificações de superfície [2].

Por outro lado, o uso de monocamadas auto-organizadas (SAM's, do inglês self-assembled monolayers) tem sido bastante explorado nos últimos anos para a determinação de espécies eletroativas, principalmente por aumentarem a seletividade e a sensibilidade de sensores eletroquímicos. SAM's são conjuntos orgânicos formados pela adsorção molecular de componentes da solução ou da fase gasosa para a superfície de sólidos ou em matrizes regulares sobre a superfície de líquidos e organizam-se espontaneamente sobre o substrato. As moléculas ou ligantes que formam as SAM's contêm um 'grupo cabeça' que possuiu uma afinidade específica a determinados substratos bem como o grupo -SH de elevada afinidade por ouro metálico [4].

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho é desenvolver um sensor para a detecção de Dopamina (DA) e NADH eliminando a interferência do Ácido Ascórbico (AA) utilizando monocamadas auto-organizadas mistas de tióis orgânicos com propriedades distintas, porém complementares, adsorvidos sobre eletrodo de ouro.

Procedimento Experimental

Primeiramente limpou-se o eletrodo mecanicamente utilizando alumina e em seguida eletroquimicamente realizando-se voltamogramas cíclicos em solução de H_2SO_4 0,5 molL⁻¹. Posteriormente, adicionou-se a este eletrodo solução de ouro coloidal para obter-se uma maior área superficial e o mesmo foi seco em estufa a 40°C. Posteriormente, foram conduzidos estudos de um eletrodo de ouro modificado com uma SAM de ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico e ácido 4-mercaptobenzóico. Neste sentido, modificou-se o eletrodo de ouro por 24 horas com os respectivos tióis e posteriormente foram conduzidas análises dos eletrodos modificados em tampão fosfato pH 7,0. As medidas eletroquímicas foram conduzidas em um Potenciostato AUTOLAB PGSTAT 128N com módulo de Impedância Eletroquímica (FRA2).

Resultados e Discussão

Inicialmente foram conduzidos estudos de voltametria cíclica com eletrodo de Au modificado com DTNB e MBA em tampão fosfato pH 7 com o propósito de ativar a superfície através da redução do grupo nitro gerando o grupo hidroxilamina da SAM de DTNB (Figura 1).

Conforme pode ser observado, após a redução do grupo nitro na primeira varredura catódica (com potencial de pico catódico em -500mV), no segundo ciclo fica evidente um par redox em 0,02 mV e -0,025 mV ($v = 10\text{mVs}^{-1}$) referente à oxidação da hidroxilamina e redução do nitrosil, respectivamente. Posteriormente à redução do grupo nitro, fez-se um estudo de diferentes velocidades de varredura do potencial elétrico para a SAM de DTNB/MBA para analisar-se o comportamento eletroquímico da SAM bem como estima o coeficiente de transferência eletrônica (α) e a constante de velocidade heterogênea (k) (Figura 2).

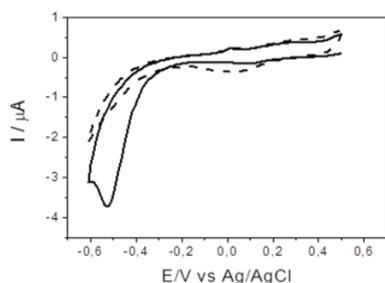


Figura 1. Redução do grupo nitro gerando hidroxilamina na SAM de DTNB/MBA. Velocidade de varredura de 50mV em tampão fosfato pH 7.

A Figura 2b mostra as magnitudes dos potenciais de pico anódico e catódico em função do logaritmo da velocidade de varredura do potencial elétrico ($\log v$). A partir dos coeficientes angulares para as curvas E_p vs $\log v$ catódico e anódico foram obtidos os valores para α catódico e α anódico de 0,55 e 0,45, respectivamente com base na Teoria de Laviron (onde coeficiente angular = $-2,303RT/\alpha nF$ para o pico catódico e $2,303RT/\alpha nF$ para o pico anódico).

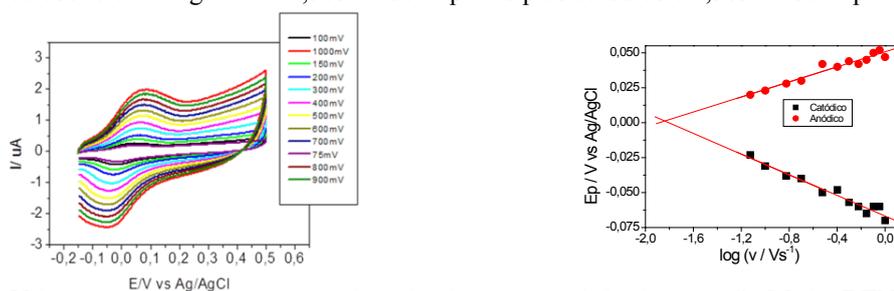


Figura 2. Voltamogramas cíclicos para eletrodo de ouro modificado com SAM de DTNB/MBA em velocidades de varredura entre 75 mVs^{-1} a 1000 mVs^{-1} (a). Em (b) é apresentada a variação do potencial de pico anódico e catódico versus o logaritmo da velocidade de varredura do potencial elétrico.

Neste sentido, o valor médio de α (0,5) foi usado nos estudos subsequentes. A partir do modelo de Laviron a constante de velocidade heterogênea pode ser estimada pela expressão:

$$\log k = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log\left(\frac{R}{nFv}\right) - \alpha(1 - \alpha)n_a f\left(\frac{\Delta E}{2,3R}\right)$$

onde v representa a velocidade de varredura do potencial elétrico e os demais termos tem seu significado usual em eletroquímica.

Com base na expressão anterior foi estimado um valor de $k=31,6 \text{ s}^{-1}$ $k = 31,6 \text{ s}^{-1}$, que por sua vez é superior ao encontrado na literatura para inúmeros modificadores de superfície e métodos de imobilização [5].

Posteriormente, foram feitas comparações com o eletrodo modificado em SAM mista de DTNB-MBA e no eletrodo não modificado em solução de tampão fosfato pH 7,00 com NADH. Observou-se que no eletrodo não modificado há redução de oxigênio e não há transferência eletrônica significativa entre a interface eletrodo/solução. No eletrodo modificado, observou-se uma melhor resposta na transferência eletrônica entre a interface.

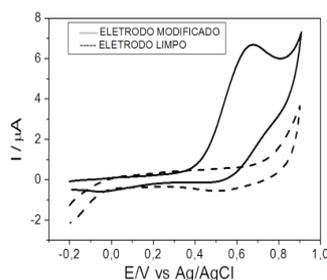


Figura 3. Voltamogramas cíclicos para oxidação de NADH 1 mmol L^{-1} sobre eletrodo limpo (linha pontilhada) e eletrodo modificado (linha contínua). $v=10 \text{ mVs}^{-1}$. Tampão fosfato, $\text{pH}=7$.

Por fim, foram realizados estudos de voltametria de pulso diferencial com eletrodo modificado em diferentes concentrações de DA e na presença de NADH (à esquerda) e o mesmo eletrodo modificado com SAM mista de DTNB-MBA em diferentes concentrações de AA e em presença de NADH (à direita).

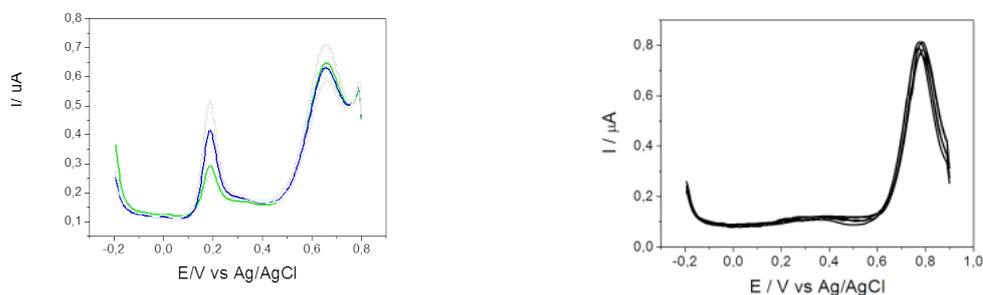


Figura 2. Voltamogramas de pulso diferencial para eletrodo de ouro modificado com SAM de DTNB/MBA para NADH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sob diferentes adições de DA ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$) (a) e sob diferentes adições de AA ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Observou-se no gráfico à direita, contendo-se NADH e DA que com o aumento da concentração de DA há um aumento significativo de corrente referente à oxidação da DA, comportamento este não observado no gráfico à direita contendo-se NADH e AA. Neste último, o aumento da concentração de AA não é sentida pelo eletrodo já que o mesmo bloqueia a oxidação do AA devido o elevado número de grupos carboxílicos na superfície.

CONCLUSÃO

Do exposto, fica evidente que a combinação de tióis com características distintas como DTNB e MBA possibilita uma excelente superfície seletiva para a determinação de DA frente ao AA sem a perda da capacidade catalítica do DTNB ao NADH. Neste sentido, o presente estudo expõe o caráter promissor por trás da combinação de moléculas electrocatalíticas a outras com caráter seletivo a determinadas moléculas na confecção de monocamadas auto-organizadas altamente planejadas.

REFERÊNCIAS:

- [1] A. Bergel, J. Soupe, M. Comtat, *Anal. Biochem.* 179 (1989) 382–388.
- [2] J.A. Stamford, J.B. Justice, *Anal. Chem.* 68 (1996) 359A–363A.
- [3] A. Domenech, H. Garcia, M.T. Domenech-Carbo, M.S. Galletero, *Anal. Chem.* 74 (2002) 562–569.
- [4] Love, J.C et al. *Chem. Rev.* 105 (2005) 1106.
- [5] H.R. Zare, F. Memrzadeh, M.M. Ardakani, M. Namazian, S.M. Golabi, *J. Electroanal. Chem.* 50 (2005) 3495.

DETERMINAÇÃO DE GLICEROL EM BIODIESEL UTILIZANDO MICROELETRODOS DE COBRE

Luiza M.F. Dantas¹, Pollyana S. Castro¹, Ana P.R. de Souza¹, Thiago R.L.C. Paixão¹ e Mauro Bertotti¹

¹Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo – Brasil.

luizafdantas@yahoo.com.br

RESUMO: No presente trabalho, apresentam-se resultados sobre a determinação de glicerol livre em biodiesel de mamona empregando-se um microeletrodo de cobre em meio básico. Nesta superfície a oxidação do glicerol ocorre por meio de processo eletrocatalítico mediado por intermediário de Cu(III) gerado em potenciais positivos. O glicerol foi separado da amostra via extração por solvente (água desionizada) e uma curva de calibração foi obtida em ampla faixa linear de concentração (5 a 122 mg L⁻¹). A concentração de glicerol encontrada em uma amostra de biodiesel foi de (70 ± 3) mg kg⁻¹ e este valor está dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira. Adicionalmente, a exatidão do método proposto foi avaliada por adição e recuperação e obteve-se o resultado de 110 %, valor aceitável pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists).

Palavras-chave: Glicerol livre, Biodiesel e Microeletrodo de cobre.

INTRODUÇÃO

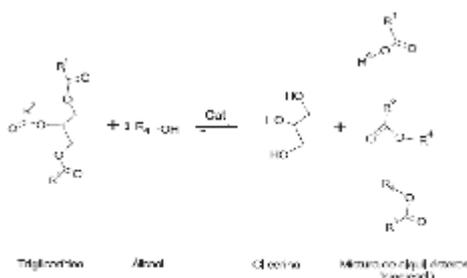


Figura 1: Reação de transesterificação de triglicerídeos. [3]

De acordo com a Lei nº 11.097, o biodiesel é definido como um “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil” [1]. O biodiesel é um combustível alternativo importante, constituído de uma mistura de ésteres metílicos e/ou etílicos de ácidos graxos, comumente obtido através de reação de transesterificação de triglicerídeos de óleos e gorduras com álcoois de cadeia curta, tendo como subproduto o glicerol (1,2,3-propanotriol) [2,3].

Altas concentrações de glicerol no biodiesel podem acarretar em problemas de estocagem, pois quando o biodiesel é misturado ao diesel de petróleo ocorre a separação do glicerol nos tanques de estocagem, formação de depósitos e entupimento dos bicos injetores. Além disso,

durante a combustão o glicerol presente no biodiesel pode conduzir à emissão de acroleína, uma substância altamente tóxica para o ambiente [2].

No Brasil, a Lei 11097/05 institui a obrigatoriedade da adição de 2% de biodiesel ao diesel (mistura B2) a partir de janeiro de 2008 e torna obrigatória as misturas de 5% até 2013. Assim, a resolução nº 7 de 2008 da Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis (ANP) estabelece as especificações necessárias para a produção de biodiesel. O limite máximo de glicerol livre e glicerol total deve ser de 0,02% e 0,25% (m/m), respectivamente [1]. A determinação de glicerol é realizada através dos métodos cromatográficos EN ISO 14105 e EN ISO 14106 (norma européia) e o método ASTM D6584 (norma americana), sendo estes adotados pela norma brasileira [3].

Outras técnicas analíticas têm sido propostas para a determinação de glicerol livre em biodiesel [4]. Pela simplicidade, rapidez e precisão, o uso das técnicas eletroanalíticas tem crescido acentuadamente nos últimos anos, especialmente aquelas que empregam microeletrodos como eletrodo de trabalho. Estes dispositivos possuem diversas vantagens e entre elas podem ser citadas: portabilidade, baixo consumo de reagentes e amostras, elevada frequência analítica, queda ôhmica desprezível e transporte de massa efetivo devido à difusão radial. O eficiente processo difusional possibilita o rápido transporte das espécies eletroativas à superfície do eletrodo e, conseqüentemente, há pouca interferência de efeitos hidrodinâmicos sobre o sinal de corrente, possibilitando a análise in loco [5].

Tendo em vista a importância da utilização do biodiesel e a necessidade de desenvolver métodos de análise eficientes e que assegurem uma melhor qualidade do combustível, este trabalho tem o objetivo de propor um procedimento alternativo para a determinação de glicerol em biodiesel utilizando microeletrodos de cobre em soluções estacionárias.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todos os reagentes foram utilizados sem purificação prévia. Todas as soluções foram preparadas pela dissolução dos reagentes sólidos ou diluição de soluções concentradas em água desionizada. Os reagentes utilizados foram:

Glicerol (99,9% de pureza - Merck), biodiesel de mamona fabricado no laboratório, ferricianeto de potássio (Baker), metil viologênio (Aldrich), cloreto de potássio (Merck) e hidróxido de sódio (Synth).

Todas as medidas voltamétricas e amperométricas foram realizadas com um bipotenciostato da Autolab PGSTAT 30 (Eco Chemie), com uma célula eletroquímica convencional e sistema de três eletrodos. O eletrodo de referência usado foi de Ag/AgCl (KCl_{sat}) e um fio de platina foi utilizado como eletrodo auxiliar. O eletrodo de trabalho foi um microeletrodo de cobre fabricado no laboratório com fibra de cobre por meio da selagem da fibra com resina epóxi em pipeta de Pasteur. O contato entre a microfibras e o fio de Ni/Cr foi feito com cola de prata. A superfície do microeletrodo foi polida com lixas de granulação decrescente e posteriormente com alumina. O raio do microeletrodo foi determinado medindo-se a corrente limite (I_L) em uma solução de metil viologênio (MV^{2+}) de concentração conhecida, utilizando a equação $I_L = 4nFDc$. O coeficiente de difusão do MV^{2+} em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi determinado experimentalmente utilizando microeletrodos de platina de diferentes raios fabricados no próprio laboratório.

Para a determinação do glicerol no biodiesel foi necessário uma etapa de extração, que consistiu na pesagem de 1g de amostra de biodiesel diretamente em um tubo de 15 mL e adição de 10 mL de água desionizada. A mistura foi agitada por 30 minutos em uma mesa giratória, com os tubos posicionados na horizontal. A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm [2]. A fase orgânica foi removida com uma pipeta Pasteur e o glicerol livre foi determinado na fase aquosa. As curvas de calibração foram construídas utilizando soluções padrão de glicerol preparadas a partir da diluição de uma solução estoque com água.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 2 estão apresentados os voltamogramas cíclicos para o sistema MV^{2+} ($9,94 \text{ mmol L}^{-1}$, solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) obtidos com microeletrodos de platina de diferentes raios. Os raios dos microeletrodos de platina foram obtidos com solução de ferricianeto de potássio 1 mmol L^{-1} em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). A figura mostra o aumento da corrente limite (I_L) com o aumento do raio dos microeletrodos de platina. Através da inclinação da reta calculou-se o coeficiente de difusão do MV^{2+} , que foi de $6,39 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, e este valor foi concordante com o reportado na literatura ($D = 6,56 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) [6]. Assim, com o voltamograma apresentado no inset da figura 2 foi possível calcular o raio do microeletrodo de cobre ($21,4 \text{ }\mu\text{m}$).

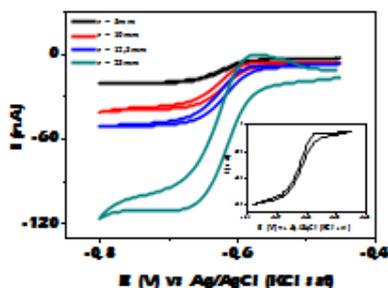


Figura 2: Voltamogramas cíclicos registrados em solução de MV^{2+} $9,94 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para microeletrodos de platina com diferentes raios ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$). No inset está representado o voltamograma obtido com o microeletrodo de cobre na mesma solução.

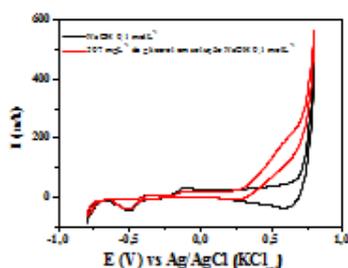


Figura 3: Voltamogramas cíclicos do microeletrodo de cobre em solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ antes e após adição de glicerol.

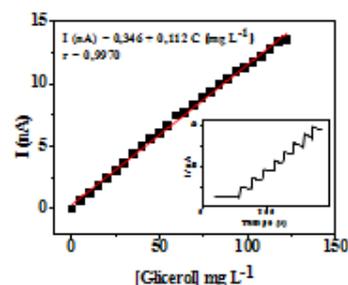


Figura 4: Curva de calibração e alguns dados da curva amperométrica construída a partir de soluções padrão de glicerol $E = 0,6 \text{ V}$, solução estacionária de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Experimentos preliminares de voltametria cíclica foram realizados a fim de caracterizar o processo eletrocatalítico associado à oxidação do glicerol em superfícies de cobre. Na Figura 3 está ilustrado o comportamento voltamétrico do microeletrodo de cobre em solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 507 mg L^{-1} de glicerol, na faixa de potencial de $-0,45$ a $-0,80 \text{ V}$ com uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Um processo irreversível pode ser observado na região que corresponde à formação de Cu(III), demonstrando que a oxidação de glicerol é mediada pela espécie Cu(III) [7].

No intuito de determinar a concentração de glicerol livre em amostras de biodiesel, curvas de calibração foram construídas com soluções padrão de glicerol. Pela análise da Figura 4, é possível observar um comportamento linear no intervalo de concentração de 5 a 122 mg L^{-1} com a equação de regressão linear: $I (\text{nA}) = 0,346 + 0,112 C (\text{mg L}^{-1})$ e coeficiente de correlação igual a $0,9970$. A resposta se mostrou linear até valores bem acima de 122 mg L^{-1} .

A repetibilidade foi avaliada considerando-se 10 medidas sucessivas realizadas em uma mesma solução contendo $24,87 \text{ mg L}^{-1}$ de glicerol. Após as medidas das correntes de pico, o valor médio foi de $3,47 \text{ nA}$ com desvio padrão relativo de $1,72\%$, demonstrando que o método apresenta precisão aceitável.

Para verificar a exatidão da metodologia foi realizado o teste de adição e recuperação, obtendo-se uma porcentagem de recuperação de 110% , dentro dos limites aceitos pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists).

A Figura 5 apresenta uma curva amperométrica de adição de padrão para a análise de amostra de biodiesel. Para a realização deste experimento, adicionou-se um volume de 2 mL de solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ à célula eletroquímica e o sinal de corrente do branco foi lido. Em seguida, adicionou-se 1 mL da amostra (previamente alcalinizada) e foram feitas adições sucessivas de $5 \mu\text{L}$ de solução padrão de glicerol $1,25 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$, efetuando-se as respectivas leituras. A concentração de glicerol na amostra determinada com base na extrapolação da reta foi $2,32 \text{ mg L}^{-1}$. Considerando-se as diluições efetuadas na amostra, a concentração de glicerol em biodiesel foi de $70 \pm 3 \text{ mg kg}^{-1}$ ($0,007\%$ (m/m) de glicerol no biodiesel).

Comparando-se as inclinações das curvas de calibração mostradas nas Figuras 3 e 5 foi possível verificar que há interferência da matriz, justificando o uso do método de adição de padrão para as quantificações realizadas pelo método proposto.

CONCLUSÕES

A atividade electrocatalítica de eletrodos de cobre no que diz respeito à oxidação de glicerol em meio alcalino permitiu o desenvolvimento de método simples, de baixo custo e com boa repetibilidade. O intervalo linear obtido (5 a 122 mg L^{-1}) possibilita a determinação de glicerol em biodiesel após procedimento de extração com água. Desta forma, a metodologia proposta pode ser uma alternativa viável para a quantificação desta espécie química.

AGRADECIMENTOS: CNPq, FAPESP e ao IQ-USP.

REFERÊNCIAS

- [1] Agência Nacional do Petróleo (ANP): <http://www.anp.gov.br> acessado em 20/05/2011.
- [2] SILVA S.G., ROCHA F.R.P., "A flow injection procedure based on solenoid micro-pumps for spectrophotometric determination of free glycerol in biodiesel", *Talanta*, 83, 559-564, 2010.
- [3] LÔBO I.P., FERREIRA S.L.C., "Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos", *Quim. Nova*, 32, 1596-1608, 2009.
- [4] FILHO GONÇALVES L.C., MICKÉ G.A., "Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis", *J. of Chrom. A*, 1154, 477-480, 2007.
- [5] PAIXÃO T.R.L.C., BERTOTTI M., "Métodos para fabricação de microeletrodos visando a detecção em microambientes", *Quim. Nova*, 32 (5): 1306-1314, 2009.
- [6] KAIFER, A.E., BARD A.J., "Micellar Effects on the Reductive Electrochemistry of Methylviologen", *J. Phys. Chem.*, 89: 4876-4880, 1985.
- [7] PAIXÃO T.R.L.C., CORBO D., BERTOTTI M., "Amperometric determination of ethanol in beverages at copper electrodes in alkaline medium", *Anal. Chim. Acta*, 472: 123-131, 2002.

NANOESTRUTURAS PEPTÍDICAS FUNCIONALIZADAS COM ÁCIDO 1-PIRENO BUTÍRICO VISANDO POTENCIAL APLICAÇÃO EM BIOSENSORES

Camila Pinheiro Sousa, Wendel Andrade Alves

Centro de Ciências Naturais e Humanas–Universidade Federal do ABC, Santo André - SP -Br *camila.sousa@ufabc.edu.br*; *wendel.alves@ufabc.edu.br*

RESUMO: O presente trabalho apresenta uma alternativa eficaz de matriz para oxidação de diferentes substratos. Para isso foi utilizado a funcionalização de nanotubos de difenilalanina com o ácido 1 pireno butírico, a fim de aumentar a atividade eletrocatalítica do substrato por meio do aumento de grupos carboxílicos em sua superfície. As características estruturais das nanoestruturas foram verificadas por medidas de infravermelho e as características morfológicas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de fluorescência. A atividade eletrocatalítica do eletrodo de carbono vítreo modificado com as nanoestruturas foi verificada por voltametria cíclica e por voltametria de pulso diferencial. A sensibilidade obtida frente a oxidação de dopamina para o eletrodo modificado com as nanoestruturas peptídicas funcionalizadas foi 54% maior que a do eletrodo modificado somente com nanotubos peptídicos.

Palavras-chave: nanoestruturas de L-difenilalanina, L-dopamina, voltametria de pulso diferencial.

INTRODUÇÃO

As nanoestruturas obtidas a partir de biomoléculas são bastante atrativas devido a sua biocompatibilidade, habilidade para reconhecimento molecular e facilidade para modificação química, fatores necessários para diversas aplicações de interesse. Nesta nova classe de materiais, os compostos peptídicos aparecem como candidatos promissores a “*building blocks*”, devido à sua fácil preparação e estabilidade físico-química¹.

Recentemente foi desenvolvido pelo grupo sensores de peróxido de hidrogênio onde a microperoxidase 11 foi incorporada aos nanotubos de L-difenilalanina obtendo-se assim uma eficiente interface bioeletroquímica². Um outro estudo desenvolvido pelo grupo pode verificar a interação do ácido 1-pirenocarboxílico com os nanotubos de L-difenilalanina obtendo um recobrimento homogêneo e sem significativas alterações estruturais e morfológicas das nanoestruturas³.

A fim de aplicar este mesmo sistema para ancoramento de enzimas e aplicações eletroquímicas, este trabalho tem como objetivo a utilização do ácido 1-pirenobutírico para funcionalização dos nanotubos de L-difenilalanina e posterior aplicação eletroquímica.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os nanotubos peptídicos foram obtidos a partir de 3 mg do dipeptídeo (L-Phe ···L-Phe) dissolvidos em 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol. Posteriormente, o peptídeo foi diluído em 1000 µL de solução tampão fosfato pH 7. Os nanotubos funcionalizados com ácido 1 pireno butírico foram obtidos de forma semelhante utilizado a diluição em 500 µL de solução tampão fosfato pH 7 e 500 µL do ácido 1-pireno butírico $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diclorometano.

Os experimentos eletroquímicos foram realizados com um potenciostato/galvanostato (μ Autolab tipo III), em célula para três eletrodos utilizando como eletrólito 10mL de tampão fosfato pH 7,0, $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. O eletrodo de referência utilizado foi o de calomelano saturado, SCE, e o auxiliar de platina.

Como eletrodo de trabalho foi utilizado um eletrodo de carbono vítreo de 3mm de diâmetro. Após polimento deste utilizando alumina de 1,0µm, 0,5µm, 0,03µm e sucessivas lavagens, o eletrodo foi sonificado com etanol e modificado com 2µL de glutaraldeído 0,025% e 2 µL da solução do respectivo nanotubo em concentração de 1 mg ml^{-1} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de verificar a imobilização do ácido 1 pireno butírico aos nanotubos de difenilalanina foram realizadas medidas de espectroscopia no infravermelho, onde poucas modificações no espectro vibracional podem ser observadas (Figura 1 a), provavelmente devido a baixa quantidade de ácido 1-pireno butírico imobilizada na superfície das nanoestruturas. Ao realizar a microscopia de fluorescência com excitação em 360nm foi possível observar a fluorescência do ácido 1 pireno butírico nos nanotubos peptídicos funcionalizados que estão dispersos homogêneamente nas nanoestruturas, como observado na figura 1b.

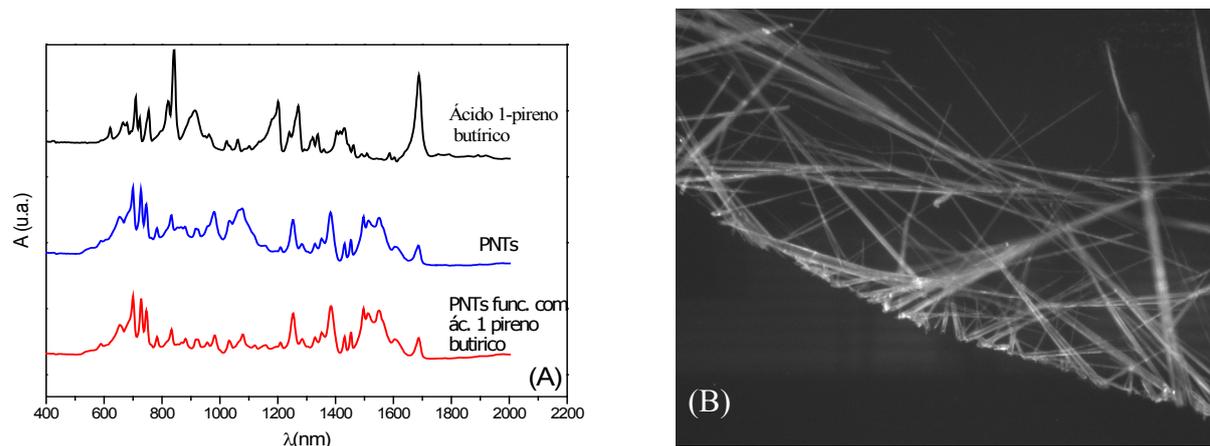


Figura 01_ (a) Espectros vibracionais de FTIR das amostras utilizadas obtido sutilizzando a tecnica de ATR (b) Microscopia de fluorescência dos nanotubos de difenilalanina modificados com ácido 1 pireno butírico ($\lambda_{ex} = 360nm$)

Imagens de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas a fim de verificar as estruturas obtidas. Por meio destas imagens é possível notar a formação de microestruturas peptídicas bem dispersas, com nucleação preferencial a partir de um ponto como podemos observar nos *inserts* da figura 2. Este comportamento pode ser observado tanto para as nanoestruturas peptídicas funcionalizadas como para as nanoestruturas sem funcionalização (Figura 2). Após a funcionalização das nanoestruturas peptídicas não houve alteração estrutural visível nos nanotubos o que está de acordo com Martins e colaboradores.³

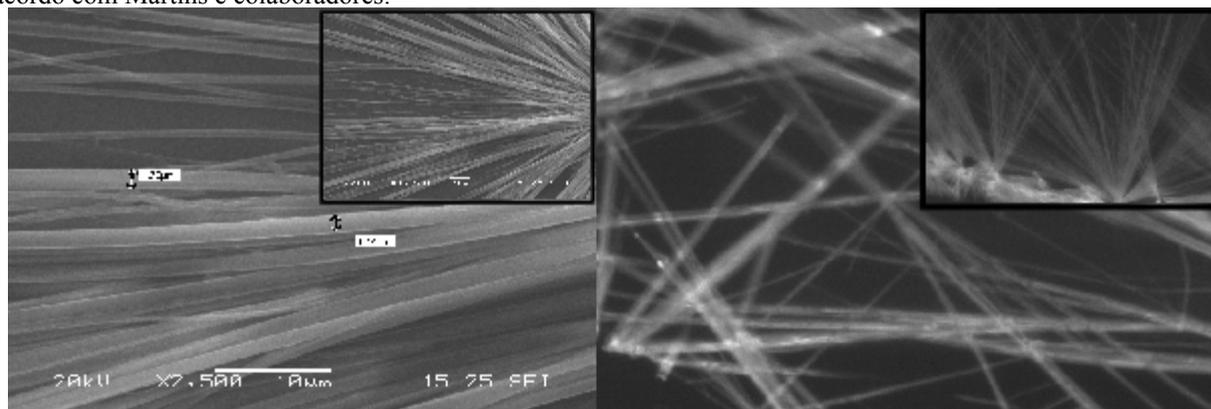


Figura 2_ (a) Microscopia eletrônica de varredura dos nanotubos peptídicos (b) Microscopia de fluorescência dos nanotubos de difenilalanina modificados com ácido 1 pireno butírico ($\lambda_{ex} = 360nm$)

Após a caracterização da estruturas peptídicas, estas foram imobilizadas ao eletrodo de carbono vítreo por meio da utilização do glutaraldeído. Esta solução foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura onde podemos verificar a interação entre os nanotubos com o glutaraldeído e a dispersão destes por toda a área do eletrodo(Figura 3a).

A atividade eletrocatalítica foi analisada frente a oxidação de dopamina, tanto por voltametria cíclica como por voltametria de pulso diferencial.

Na voltametria cíclica realizada na presença de 5 mM de dopamina podemos observar o deslocamento de pico nos diferentes materiais. Ao utilizar os nanotubos peptídicos funcionalizados com o ácido 1-pireno butírico os potenciais de oxidação e redução foram deslocados de 0,10 V e 0,02V respectivamente. Esta deslocamento sugere a mudança da superfície do material. Além do deslocamento de picos é possível observar uma maior corrente no eletrodo onde as nanoestruturas sofreram a funcionalização, o que pode ser atribuído a uma transferência eletrônica mais eficiente.

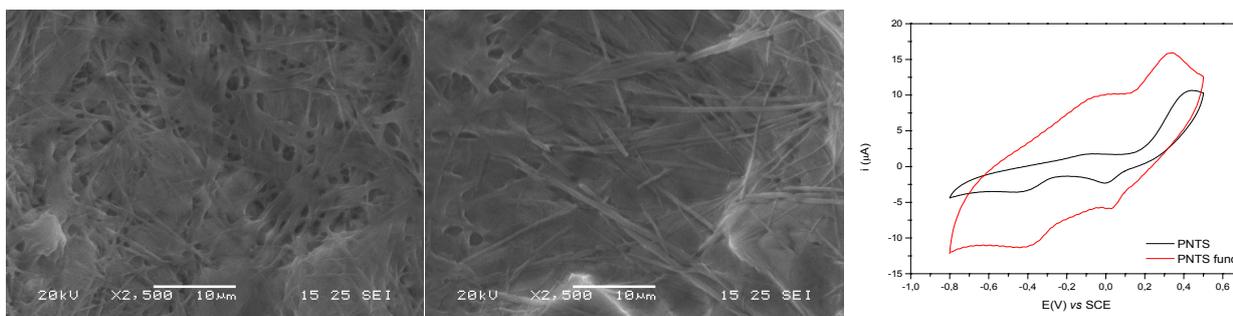


Figura 3_ (A) Microscopia Eletrônica de Varredura (B) Voltametria cíclica dos eletrodos de CV modificados com nanotubos de peptídeo e nanotubos peptídicos funcionalizados.

Estudos frente a adição de dopamina por meio da voltametria de pulso diferencial também foram realizadas nos eletrodos modificados com nanotubos de peptídeos e nanotubos de peptídeos funcionalizados obtendo sensibilidades de $5,57 \text{ mA}\mu\text{mol}^{-1}\text{L}$, $8,62 \text{ mA}\text{L}^{-1}\mu\text{mol}^{-1}$, respectivamente. (Figura 4) O que implica em um acréscimo de 54% no valor da sensibilidade quanto utilizamos os nanotubos funcionalizados com 1 pireno carboxílico.

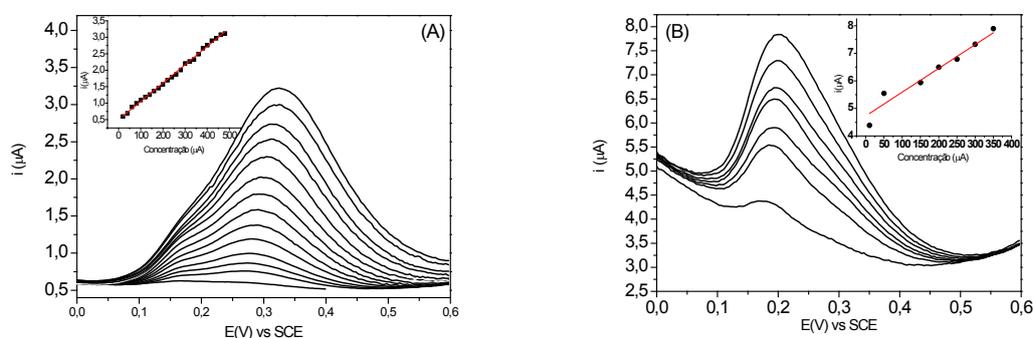


Figura 4_ VPD dos eletrodos de CV modificados com (a) nanotubos de peptídeo, (b) nanotubos de peptídeo funcionalizados com o ácido 1 pireno butírico. Adições de (a) e (c) $50\mu\text{M}$ (b) $20\mu\text{M}$ de dopamina. Amplitude: 50mV .

Um deslocamento de $0,12 \text{ V}$ VS SCE no pico de oxidação da dopamina pode ser observado com a funcionalização das nanoestruturas com o ácido 1 pireno butírico.

CONCLUSÕES

A funcionalização dos nanotubos peptídicos com 1 pireno butírico foi bem sucedida o que pode ser demonstrado pelo aumento de 54% na sensibilidade frente a oxidação de dopamina quando comparamos ao nanotubo peptídico sem funcionalização. Estudos ainda serão realizados a fim de otimizar a quantidade do ácido 1 pireno butírico presente nos nanotubos.

AGRADECIMENTOS: UFABC, FAPESP, CAPES, CNPq e INCT- Bio.

REFERÊNCIAS

- [1] Cheng, J.; Zhu, J. C.; Liu, B. *Chem Phys* **2007**, *333*, 105.
- [2] Cipriano, T. C.; Takahashi, P. M.; de Lima, D.; Oliveira, V. X.; Souza, J. A.; Martinho, H.; Alves, W. A. *J Mater Sci* **2010**, *45*, 5101.
- [3] Martins, T. D.; de Souza, M. I.; Cunha, B. B.; Takahashi, P. M.; Ferreira, F. F.; Souza, J. A.; Fileti, E. E.; Alves, W. A. *Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115*, 7906.

DESENVOLVIMENTO SENSOR BIOMIMÉTICO PARA ANÁLISE DE 3,5,6-TRICLORO-2-PIRIDINOL O PRINCIPAL METABOLITO DO CLORPIRIFÓS

André Luiz dos Santos (PG). Eduardo Carneiro Figueira (PG) e Maria Del Pilar Taboada Sotomayor (PQ).

Instituto de Química –UNESP, Araraquara – SP – Brasil. algumascoizaz@hotmail.com

RESUMO: Descreve-se o desenvolvimento de um sensor biomimético para determinação 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) o principal metabolito do clorpirifós. O sistema proposto está baseado na inibição da corrente observada na presença do TCP em um sensor construído à base de pasta de carbono modificada com o complexo 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro-29H,31H-ftalocianina de cobalto (II). As medidas foram realizadas utilizando voltametria de onda quadrada (VOQ) em solução tampão B-R (pH = 10). Nestas condições a resposta voltamétrica obtida no potencial de pico (E_p) de -0,1 V vs Ag/AgCl, KCl_{sat} foi linear ($R = 0,9998$) entre $4,85 \times 10^{-6}$ e $1,35 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com limites de detecção e quantificação de $3,5 \times 10^{-7}$ e $1,2 \times 10^{-6}$, respectivamente. O perfil completo de resposta do sistema apresenta-se hiperbólico, o qual permitiu calcular através do gráfico do duplo recíproco a constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}) obtendo-se o valor de $4,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Palavras-chave: sensores biomiméticos, voltametria de onda quadrada, 3,5,6-tricloro-2-piridinol.

INTRODUÇÃO

Devido ao grande aumento da população humana nas últimas décadas, acarretando uma necessidade no crescimento da oferta de alimentos com a finalidade de garantir condições mínimas de nutrição, surgiram novas alternativas, dentre elas a síntese de novos pesticidas e o aumento excessivo e indiscriminado dos já existentes. Assim, os pesticidas vêm sendo cada vez mais utilizados na agricultura e atualmente, é difícil imaginar a produção de alimentos sem o seu uso, pois tais produtos são responsáveis pelo controle de pragas e de doenças que afetam a produção, o processamento, o armazenamento, o transporte e a estocagem de alimentos e de produtos agrícolas em geral. Desta forma, pesticidas são todas as substâncias de origem natural ou sintética utilizadas no controle e/ou eliminação/diminuição de pragas (insetos, ervas daninhas, etc.), as quais acarretam prejuízos na produção de alimentos ou transferem enfermidades aos seres humanos. A terminologia “agrotóxicos” também é usada na designação destas substâncias, enfatizando seu caráter tóxico. O uso indiscriminado, sem critérios e sem conhecimento aprofundado de sua ação e efeitos, trouxe e está trazendo problemas muito sérios ao meio ambiente e, conseqüentemente, à qualidade de vida do ser humano [1].

O clorpirifós (Figura 1A), *O,O*-dietil-*O*-(3,5,6-piridila) fosforotionato, é um inseticida organofosforado que inicialmente foi fabricado e comercializado em 1965 pela Dow Chemical Company nos estados Unidos e atualmente é um dos cinco inseticidas mais comercializados. O mecanismo de ação toxicológica do clorpirifós é a inibição da enzima acetilcolinesterase que resulta no acúmulo da acetilcolina, um neurotransmissor que em excesso causa paralisia muscular em pulmões e coração, através da interrupção dos impulsos nervosos [2]. Dentre os metabólitos gerados pela decomposição do clorpirifós, seu principal produto de degradação é o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) mostrado na Figura 1B, e é o composto monitorado para controle biológico da atividade da colinesterase no sangue e urina após 24 horas de exposição ao agrotóxico [3].

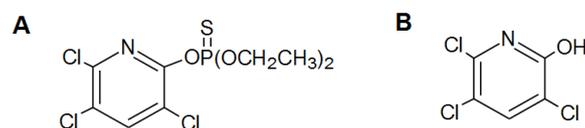


Figura 1: Fórmula estrutural do clórpirifós (A) e seu principal metabólito, o 3,5,6-tricloro-2-piridinol [TCP] (B).

O método oficial empregado para ensaios de determinação de clorpirifós e seus metabólitos é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que está bem estabelecida, entretanto, apresenta algumas desvantagens para seu uso em larga escala, como o alto custo do equipamento, assistência altamente especializada, além da inviabilidade operacional de sua aplicação *in loco*, para o monitoramento em tempo real da agregação do pesticida e seus metabólitos em matrizes ambientais. Contudo, técnicas eletroanalíticas vêm sendo satisfatoriamente desenvolvidas para determinação de pesticidas em águas puras, naturais, solos e alimentos [4]. A principal vantagem desses métodos é a possibilidade de se determinar a presença do pesticida diretamente na amostra, sem pré-tratamentos ou separações

químicas. Neste sentido, sensores biomiméticos [5] apresentam-se como ferramentas promissoras, seletivas e robustas para determinação de diversos pesticidas em matrizes de interesse ambiental e clínico.

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um sensor biomimétrico com transdução voltamétrica para determinação de TCP, baseado na inibição da corrente obtida em função do aumento da concentração do analito. O complexo empregado como possível catalisador biomimético de heme-enzimas foi o 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro-29H,31H-ftalocianina de cobalto.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O EPCM foi preparado pela mistura de grafite em pó (80%, m/m), o complexo de cobalto (20%, m/m) e tampão Britton–Robinson (tampão B-R, pH 10,0). A mistura foi deixada secar à temperatura ambiente e após secagem foi adicionado óleo mineral (Nujol®) para obtenção da pasta de carbono, a qual foi colocada na extremidade de um tubo de vidro de 4 mm de diâmetro interno e 1 mm de profundidade, para obter o respectivo sensor biomimético.

As voltametrias de onda quadrada foram realizadas com o auxílio de um potenciostato Autolab® utilizando-se cela eletroquímica convencional de três eletrodos empregando como eletrodo de referência o de Ag/AgCl, KCl_{sat}, uma espiral de Pt como contra eletrodo e o sensor biomimético contendo o complexo de cobalto (II) como eletrodo de trabalho. Previamente ao uso de um novo sensor, este foi “ativado” varrendo o potencial entre -1 e +1 V. As análises em VOQ foram realizadas no intervalo de potencial de -0,4 a 0,2 V, E_{step} de 0,001 V, amplitude de degrau de 0,025 V e frequência de 9 Hz, através de adições sucessivas de alíquotas de uma solução padrão 1,26 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de TCP no eletrólito suporte (tampão B-R, pH 10,0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2A mostra o perfil voltamétrico da inibição de sinal em função do aumento da concentração de TCP (linhas sólidas) analogamente ao que se observa em biossensores à base de heme e cupro-enzimas [6]. A análise do voltamograma mostra dois picos nos valores de potencial de -100 e +75 mV. O primeiro deles pode ser atribuído à redução da quinona formada após a interação do TCP com o complexo na superfície do eletrodo. Já o segundo pico corresponde ao cobalto no complexo, pois como pode ser observado na ausência de TCP (linha pontilhada) este pico é bastante acentuado. O monitoramento da diminuição da corrente de pico com o aumento da concentração de TCP (Figura 2B) foi realizado no potencial de -100 mV, correspondente ao primeiro pico, pois foi o apresentou melhores características para a quantificação analítica deste composto.

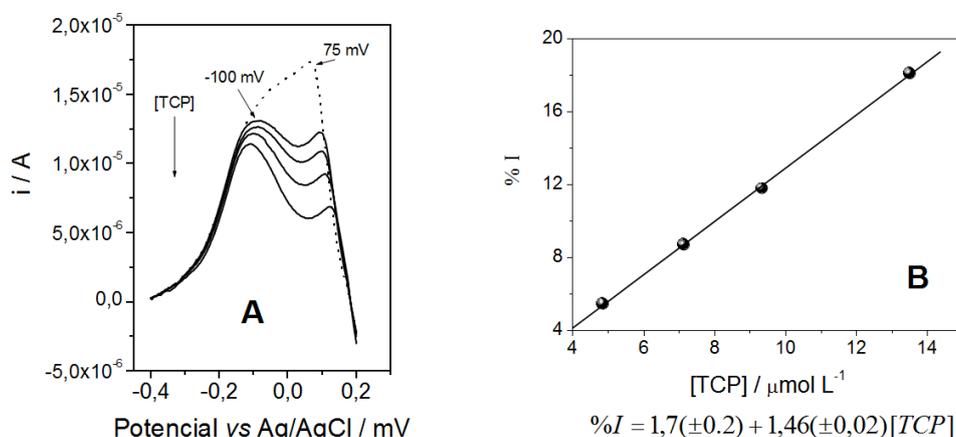


Figura 3: (A) Influência da concentração de TCP no perfil voltamétrico do sensor, medidas realizadas em tampão B-R (pH 10,0) usado como branco (linha pontilhada) e adições sucessivas de TCP (linhas sólidas). $f = 9,0$ Hz, amplitude = 25,0 mV, incremento = 1 mV. (B) Curva analítica obtida com os dados mostrados na Figura 3A.

Sob as condições de análise descritas anteriormente o sensor apresentou resposta linear ($R = 0,9998$) no intervalo de $4,85 \times 10^{-6}$ a $1,35 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com limites de detecção e quantificação calculados em $3,5 \times 10^{-7}$ e $1,2 \times 10^{-6}$, respectivamente. Após avaliadas as características analíticas do sensor, a seguir foram avaliadas as características biomiméticas. Na Figura 3, mostra-se o perfil hiperbólico do sensor para TCP, e tal como esperado foi análogo aos biossensores enzimáticos convencionais. A constante aparente de Michaelis-Menten () foi calculada através do gráfico do duplo recíproco obtendo-se um valor de $4,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, o qual se encontra em concordância com valores obtidos com biossensores enzimáticos e sensores biomiméticos reportados na literatura, indicando uma forte afinidade deste complexo pelo analito estudado [5].

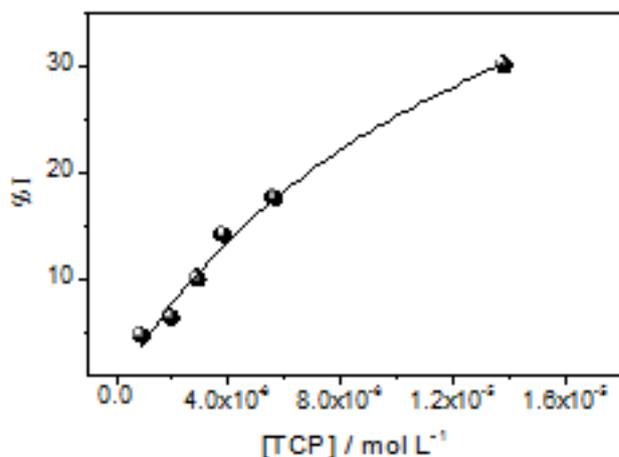


Figura 3: Perfil hiperbólico do sensor desenvolvido para TCP.

CONCLUSÕES

Neste trabalho apresenta-se um sensor de inibição *pseudo*-enzimática para o 3,5,6-tricloro-2-piridinol, o principal metabolito da decomposição do pesticida clorpirifós. Os resultados obtidos mostram-se promissores para a identificação deste analito, e nas etapas a seguir serão avaliadas a seletividade e aplicação deste sensor. O complexo de cobalto usado para modificar a pasta de carbono comporta-se como as enzimas peroxidase e tirosinase que na presença de determinados pesticidas inibem sua atividade enzimática.

AGRADECIMENTOS: AO CNPq (470419/2009-1, 557199/2010-7 e 300527/2009-8)

REFERÊNCIAS

- [1] Holland, P.T.; *Pure Appl. Chem.* **1996**, *62*, 1167.
- [2] Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. [tradução da 10. ed. original, Carla de Melo Vorsatz, et al] Rio de Janeiro: McGraw-Hill, **2005**.
- [3] FERSOL S.A FISPQ - Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico. Disponível em: <http://www.fersolna.com.br/fersol/fichas/fispq/Clorpirifos.pdf>. Acessado em 01 de junho de 2011.
- [4] Vaz, C.M.P.; Crestana, S.; Machado, S.A.S.; Mazo, L.H.; Avaca, L.A.; EMBRAPA: Comunicado técnico “Análise de pesticidas por técnicas eletroanalíticas” **2006**, *7*, 1-12.
- [5] Sotomayor, M.D.P.T.; Tanaka, A.A.; Freire, R.S.; Kubota, L.T.; Amperometric Sensors Based on Biomimetic Catalysts. In: *Encyclopedia of Sensors*. California: ASP, **2006**.
- [6] Moccelini, S.K. *Tese de Doutorado em Química* - Universidade Federal de Santa Catarina, **2011**.

DESENVOLVIMENTO DE SENSOR AMPEROMÉTRICO À BASE DE PASTA DE CARBONO MODIFICADA COM FTALOCIANINA METÁLICA PARA DETERMINAÇÃO DE METRIBUZIM

Eduardo C. Figueira (PG) e Maria D.P.T. Sotomayor (PQ)

Instituto de Química - UNESP, Araraquara - SP - Brasil. du.figueira@hotmail.com

RESUMO: *Descreve-se a construção de um sensor amperométrico para a detecção do agrotóxico metribuzim, empregando pasta de carbono modificada com ftalocianina de cobalto II. A preparação da pasta assim como as condições de análise foram otimizadas em relação à quantidade de modificador, eletrólito suporte, pH, concentração do tampão e potencial aplicado. Os resultados obtidos demonstraram que o sensor biomimético proposto mostra-se promissor na detecção dessa classe agrotóxico.*

Palavras-chave: *Metribuzim, agrotóxico, sensor amperométrico.*

INTRODUÇÃO

O aumento acentuado da população humana nos últimos anos demandou na mesma intensidade o crescimento na oferta de alimentos para garantir condições mínimas de nutrição e sobrevivência da espécie. Desafiados por esta realidade, a ciência vêm em uma busca incessante pelo desenvolvimento de novas tecnologias e principalmente pela síntese de novas substâncias que possam ser utilizadas como fertilizantes ou agrotóxicos na rota produtiva da lavoura.

O agrotóxico que está sendo estudado neste trabalho é o metribuzim o qual foi escolhido pelo seu uso intensivo durante o último século, visando melhorar a produtividade agrícola. Entretanto, possui papel fundamental na contaminação ambiental, sobretudo em águas superficiais, devido a sua altíssima toxicidade, sendo assim, o desenvolvimento e aplicação de metodologia analítica simples, rápida e sensível para a análise do mesmo é necessária.

Com o advento das técnicas eletroanalíticas, os sensores eletroquímicos ganharam novos espaços nas diversas áreas de pesquisas. Dessa forma, vários trabalhos vêm sendo publicados em revistas especializadas, em que os autores relatam diferentes tipos de eletrodos utilizados na quantificação de espécies eletroativas, podem-se destacar entre eles os eletrodos à base de pasta de carbono (EPCs). O primeiro EPC foi desenvolvido por Adams [1], com intuito de substituir o eletrodo gotejante de mercúrio, cujo objetivo era atingir potenciais mais positivos, nos quais o eletrodo de mercúrio não podia ser aplicado. Os primeiros trabalhos de Adams visaram à caracterização do EPC, aplicando técnicas básicas em eletroquímica [2]. Adicionalmente, o desenvolvimento e aplicação de eletrodos modificados (EM), tem tido crescente interesse nas áreas de ciências e tecnologia, com aplicação em diversos campos de pesquisa, tais como electrocatálise, síntese electroorgânica, conversão de energia solar e, principalmente, em electroanálise [3-7].

A denominação de eletrodos quimicamente modificados foi sugerida por Murray *et al.* [8] na década de 70 para definir eletrodos com espécies quimicamente ativas devidamente imobilizadas na superfície desses dispositivos. Nesse aspecto, são encontradas na literatura diversas revisões que descrevem as diferentes estratégias para construção de eletrodos modificados [9]. Uma classe de eletrodos quimicamente modificados são os sensores biomiméticos [10], os quais têm demonstrado ser seletivos e sensíveis em diversos tipos de aplicações [11-13]. Nestes sensores, são mimetizadas as reações biológicas catalisadas por enzimas óxido-redutases, através do uso de complexos metálicos que mimetizam a estrutura do sítio ativo dessas enzimas. Esta estratégia na construção de sensores eletroquímicos fornece dispositivos de análise, que além de possuírem alta seletividade apresentam a robustez desejada para aplicação real em matrizes de amostras onde materiais biológicos tenderiam a desnaturar.

Desta forma, este trabalho propõe o desenvolvimento de um sensor amperométrico para metribuzim (MET), construído usando uma ftalocianina metálica, que imita a estrutura do sítio ativo da enzima P450, de forma a obter uma metodologia analítica altamente sensível e seletiva na determinação desse agrotóxico amplamente usado nas lavouras brasileiras.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Construção dos sensores amperométricos

Com a finalidade de tentar imitar o sítio ativo da enzima P450, e baseados nas características vantajosas de ftalocianinas e porfirinas, foram construídos vários sensores à base de pasta de carbono modificada usando os complexos: ftalocianina de cobre; ftalocianina de cobalto II; 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 22, 23, 24, 25 – hexadecafluoro - 29H - 31H - ftalocianina de cobalto II; *bis*(piridil)ftalocianina de ferro (II); ftalocianina clorada de ferro (III); 5, 10, 15, 20 *tetra*quismetoxifenil porfirina de cobalto II; e 5, 10, 15, 20 – *tetra*quispentafluorofenil porfirina de ferro (III).

A preparação de cada pasta de carbono modificada foi realizada misturando 85 mg de pó de grafite, 15 mg do complexo e 1,00 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). O material foi cuidadosamente homogeneizado com uma espátula e a seguir deixado secar ao ambiente por um período de 24 horas para evaporação da fase líquida. Sobre o material seco, adicionou-se o agente aglutinante, óleo mineral (Nujol®) para a formação da pasta de carbono.

Cada pasta de carbono preparada foi colocada na cavidade de um eletrodo composto de um tubo de vidro e um fio de platina incorporado nele que está em contato com um disco de platina de 4 mm de diâmetro e colocado à profundidade de 1 mm de uma das extremidades do tubo, deixando uma cavidade própria para a incorporação da pasta no eletrodo. Finalmente, a superfície foi uniformizada com papel sulfite limpo.

Medidas Eletroquímicas

As medidas eletroquímicas em batelada foram realizadas em um potenciostato Palm-Sense® da Palm Instruments BV (Holanda) usando uma célula eletroquímica convencional de 03 eletrodos, contendo um eletrodo de referência de Ag|AgCl, um fio de platina em forma de espiral como eletrodo auxiliar e o eletrodo de pasta de carbono modificada como eletrodo(s) de trabalho. Foram empregadas as técnicas de voltametria cíclica, no intervalo de potencial de 0,0 V a -0,8 V e velocidade de varredura de 0,05 V s⁻¹; e, a amperometria em potencial de -690 mV vs Ag|AgCl, com adições sucessivas de alíquotas de uma solução padrão de metribuzim dissolvido em água.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta etapa da pesquisa foram otimizadas as condições de preparação da pasta em relação ao modificador e a quantidade do mesmo, as condições de análise em relação à natureza do tampão, pH, concentração do tampão e o potencial aplicado na amperometria.

As condições que proporcionaram as melhores respostas estão indicadas na Tabela 1.

Tabela 1: Dados dos parâmetros otimizados.

Modificador	Proporção de modificador	Natureza do tampão	pH	Concentração do tampão	Potencial aplicado
Ftalocianina de cobalto II	15% (m/m)	Britton Robinson	2,0	0,08 mol L ⁻¹	-690 mV

A Figura 1A mostra o perfil voltamétrico comparativo do eletrólito suporte (a), e após a adição de 1,3 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ do analito (b). Observa-se claramente um aumento da corrente de redução a partir de -200 mV.

A Figura 1B, mostra a curva analítica obtida através da amperometria em um potencial de -690mV, previamente avaliado, e no gráfico inserido o perfil amperométrico do sensor.

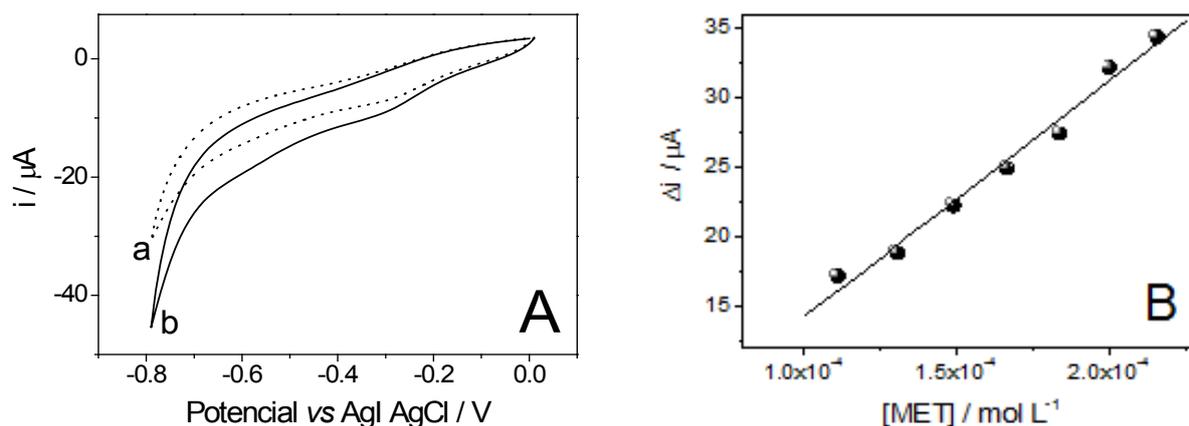


Figura 1: (A) Voltamogramas obtidos para o sensor modificado com ftalocianina de cobalto II em: (a) eletrólito suporte (tampão Britton Robinson, 0,08 mol L⁻¹ e pH 2,0) e (b) na presença de 1,3 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ do analito. Medidas realizadas em velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. (B) Curva analítica obtida com os resultados mostrados na figura inserida. Medidas realizadas em solução tampão Britton Robinson 0,08 mol L⁻¹ (pH 2,0) e potencial -690 mV.

O sensor mostrou resposta linear na faixa entre 1,0 x 10⁻⁴ e 2,2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, a equação que ajustou os dados (R = 0,992 e n = 7) foi a seguinte:

$$\Delta i / \mu A = -3,0(\pm 1,7) + 171.324(\pm 0.008)[\text{Metribuzim}] / \text{mol L}^{-1} \quad (1)$$

Sob as condições otimizadas o sensor mostrou limite de detecção e quantificação de $2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $7,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

CONCLUSÕES

O sensor desenvolvido a base de pasta de carbono modificada com ftalocianina de cobalto (II) mostrou-se promissor na detecção de metribuzim. Entretanto, apesar dos resultados obtidos a detectabilidade do método deverá ser melhorada. Pensando nisto, estudos deverão ser realizados empregando nanotubos de carbono, na seguinte etapa do projeto.

AGRADECIMENTOS: À CAPES pela bolsa concedida e ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- [1] Adams, R.N.; *Anal. Chem.* 1958, 30, 1576.
- [2] Oslon, C.; Adams, R.N.; *Anal. Chim. Acta* 1960, 22, 582.
- [3] Cox, J. A.; Tess, M. E.; Cummings, T. E.; *Rev. Anal. Chem.* 1996, 15, 173.
- [4] Gilmartin, M. A. T.; Hart, J. P.; *Analyst* 1995, 120, 1029.
- [5] Kalcher, K.; Kauffmann, J. M.; Wang, J.; Svancara, I.; Vytras, K.; Neuhold, C.; Yang, Z.; *Electroanalysis* 1995, 7, 5.
- [6] Santos, A. D.; Gorton, L.; Kubota, L. T.; *Electrochim. Acta* 2002, 47, 3351.
- [7] Wang, J.; *Electroanalysis* 1991, 3, 255.
- [8] Janegitz, B.C.; Marcolino-Junior, L.H.; Fatibello-Filho, O.; *Quim. Nova* 2007, 30, 1673.
- [9] Pereira, A.C.; Santos, A.S.; Kubota, L.T.; *Quim. Nova* 2002, 25, 1012.
- [10] Sotomayor, M.D.P.T.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* 2002, 25, 123.
- [11] Oliveira, M.C.Q.; Lanza, M.R.V.; Tanaka, A.A.; Sotomayor, M.D.P.T.; *Anal. Methods* 2010, 2, 507.
- [12] Boni, A.C.; Sotomayor, M.D.P.T.; Lanza, M.R.V.; Tanaka, S.M.C.N.; Tanaka, A.A.; *J. Braz. Chem. Soc.* 2010, 21, 1377.
- [13] Batista, I.V.; Lanza, M.R.V.; Dias, I.L.T.; Tanaka, S.M.C.N.; Tanaka, A.A.; Sotomayor, M.D.P.T.; *Analyst* 2008, 133, 1692.

DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA POR ONDA QUADRADA DE METOTREXATO EM FÁRMACOS UTILIZANDO ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO

Déborah Christine Azzi, Geiser Gabriel de Oliveira, Romeu C. Rocha-Filho e Orlando Fatibello-Filho

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP
deborah.azzi@yahoo.com.br

RESUMO: No presente trabalho é proposto um método para determinação de metotrexato (MTX) em amostras farmacêuticas empregando-se a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV) com um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) pré-tratado catódicamente. Obteve-se um aumento de corrente anódica linearmente proporcional à concentração de MTX em um intervalo de concentração de 0,10 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de 0,041 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Valores de desvios padrões relativos ($n = 10$) de 2,58 % e 3,46 % foram obtidos para a repetibilidade intradias para as concentrações de MTX de 2,50 e 7,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave: eletrodo de diamante dopado com boro, metotrexato, voltametria de onda quadrada.

INTRODUÇÃO

O metotrexato (ácido N-[4-[(2,4-diamino-6-peridínil) -metil] metilamina] benzoil]-1-glutâmico, MTX), é um antimetabólito antineoplásico (Figura 1) utilizado especialmente no tratamento de câncer e outras doenças, como artrite reumatoide, leucemia infantil aguda e psoríase [1]. O MTX atua de forma não-específica no organismo, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e do sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da sua quimioterapia: náuseas, perda de cabelo, maior susceptibilidade a infecções [2]. Outros efeitos colaterais mais graves também são constatados, como anemia, cefaleia, convulsão, hepatotoxicidade, insuficiência renal, toxicidade pulmonar, e até morte.

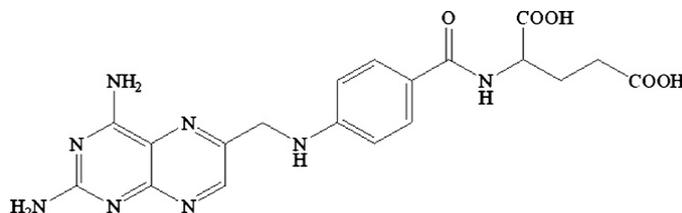


Figura 1: Estrutura molecular do metotrexato (MTX).

Há interesse no desenvolvimento de procedimentos analíticos que consumam uma quantidade menor de reagentes e que sejam rápidos e simples quando comparados com outras técnicas de quantificação ou monitoramento deste fármaco. Diferentes métodos para a quantificação de MTX são descritos na literatura, tais como espectrofotometria [3], fluorometria [4], cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [5,6] e polarografia [7,8]. Porém, algumas dessas técnicas não apresentaram boa sensibilidade a baixas concentrações do analito, estão associadas a complicadas técnicas de pré-concentração das amostras, apresentam consumo elevado de reagentes ou baixa frequência de amostragem.

O eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) apresenta várias propriedades relevantes, a saber: alta estabilidade, baixa e estável corrente de fundo, ampla janela de potencial em meios aquosos e não-aquosos, extraordinária estabilidade morfológica e microestrutural a altas temperaturas, fraca adsorção de moléculas polares, estabilidade de sua resposta e transparência óptica nas regiões de UV/Vis e IV do espectro eletromagnético [9].

Considerando o exposto, no presente trabalho descreve-se o desenvolvimento de um método para a determinação de MTX em formulações farmacêuticas usando a voltametria de onda quadrada (SWV) com um eletrodo de BDD, tendo sido realizados estudos do efeito de pré-tratamentos eletroquímicos do eletrodo de BDD e de otimização dos parâmetros da SWV.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As medidas eletroquímicas foram realizadas com um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT12 (Eco Chemie) gerenciado pelo programa computacional GPES 4.9. Utilizou-se um sistema de três eletrodos, sendo o

eletrodo de trabalho o eletrodo de BDD (8000 ppm de boro e área de 0,32 cm²), um eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), ao qual todos os potenciais estão referidos.

Previamente foram realizados pré-tratamentos do eletrodo de BDD, aplicando-se densidades de corrente da seguinte maneira: 0,5 A/cm² por 30 s, para o pré-tratamento anódico, e -0,5 A/cm² por 180 s, para o pré-tratamento catódico, ambos em eletrólito suporte de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹.

Para obtenção da curva analítica usando a voltametria de onda quadrada (SWV), alíquotas da solução padrão de MTX 25 μmol L⁻¹ em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ foram adicionadas à célula eletroquímica contendo 10 mL de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. Portanto, voltamogramas de onda quadrada foram obtidos após cada adição da solução padrão de MTX.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, usando a voltametria cíclica ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) e uma solução de MTX 50 μmol L⁻¹ em 10 mL de H₂SO₄ mol L⁻¹, foi estudado o efeito dos pré-tratamentos catódico e anódico sobre o sinal analítico (Figura 2). Como pode ser observado nesta figura, o pré-tratamento catódico do eletrodo de BDD levou a um aumento significativo do sinal analítico (~2,4 vezes maior) quanto comparado àquele obtido empregando-se o eletrodo com pré-tratamento anódico; assim, o pré-tratamento catódico foi selecionado como o mais apropriado para determinação do MTX. Por outro lado, utilizando-se a voltametria cíclica, obteve-se um pico de oxidação do MTX no potencial de cerca de 0,95 V, associado a um processo irreversível, pois não há presença de picos no sentido reverso da varredura de potencial.

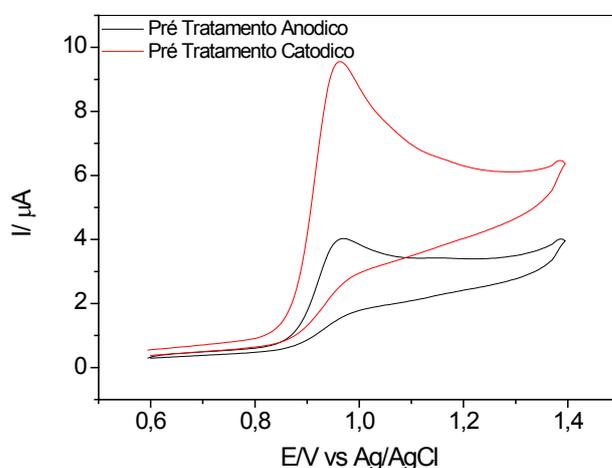


Figura 2: Voltamogramas cíclicos ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) obtidos para solução de MTX 50 μmol L⁻¹ em eletrólito suporte de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, empregando-se o eletrodo de BDD após ser pré-tratamento catódico ou anódico.

Em prosseguimento, foi realizada a investigação do efeito dos parâmetros da SWV utilizando uma solução de MTX 2,50 μmol L⁻¹ em solução de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹. Os valores selecionados para os parâmetros foram: frequência de 75 Hz, amplitude de 45 mV e incremento de varredura de 5 mV.

Finalmente, a curva analítica (Figura 3) foi construída e os registros dos valores de corrente de pico anódico geraram uma relação linear com a concentração de MTX no intervalo de 0,10 a 10 μmol L⁻¹, representada pela equação ($I_{pa}/\mu\text{A} = 0,0125 + 0,604 [\text{MTX}]/(\mu\text{mol L}^{-1})$) com um coeficiente de correlação de 0,998 ($n = 3$) e um limite de detecção de 0,041 μmol L⁻¹ (três vezes o desvio padrão de dez brancos dividido pelo coeficiente angular da curva analítica). Em testes de repetibilidade intra-dias ($n = 10$), os valores obtidos para o desvio padrão relativo (RSD) foram de 2,58 %, para uma solução de MTX 2,5 μmol L⁻¹, e de 3,46 %, para uma solução de MTX 7,5 μmol L⁻¹.

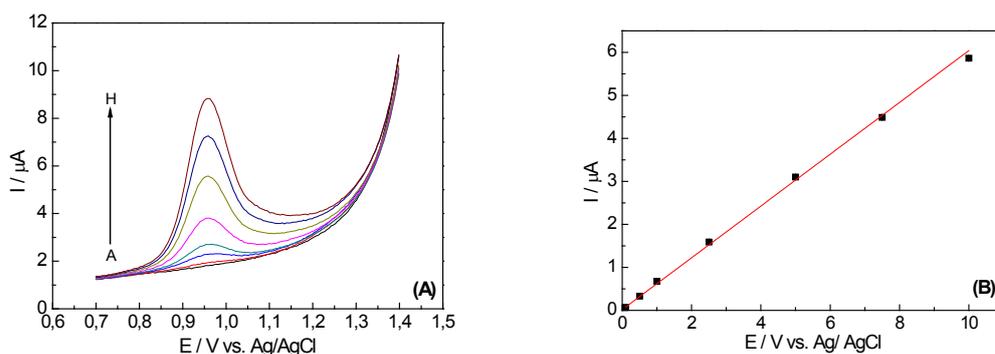


Figura 3: (A) Voltamogramas de onda quadrada ($f = 75$ Hz; $a = 45$ mV; $\Delta E = 5$ mV) para o MTX em H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} nas seguintes concentrações: branco (A), 0,10 (B), 0,50 (C), 1,0 (D), 2,5 (E), 5,0 (F), 7,5 (G) e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (H). (B) Curva analítica.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que o tratamento catódico promoveu um aumento significativo na magnitude do sinal de corrente, sendo observado um aumento do sinal analítico de cerca de 2,4 vezes. O eletrodo BDD pôde ser aplicado na determinação de MTX utilizando-se a técnica de voltametria de onda quadrada, obtendo-se uma boa faixa linear de concentração com limite de detecção de 0,041 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Esses resultados indicam que o método desenvolvido pode ser usado para a determinação deste fármaco em amostras farmacêuticas.

AGRADECIMENTOS: CNPq, CAPES e FAPESP.

REFERÊNCIAS

- [1] F. WANG, Y. J. WU, J. X. LIU, B. X. YE. "DNA Langmuir-Blodgett modified glassy carbon electrode as voltammetric sensor for determination of methotrexate". *Electrochim. Acta*, **54**, 1408, 2009.
- [2] V. L. DE ALMEIDA, A. LEITAO, L. D. B. REINA, C. A. MONTANARI, C. L. DONNICI. "Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução". *Quim. Nova*, 28, 118, 2005.
- [3] R. GANDHI, A. J. KHOPADE, N. K. JAIN. "Difference spectrophotometric method for determination of methotrexate in tablets". *Indian Drugs*, 34, 455, 1997.
- [4] A. ESPINOSA-MANSILLA, I. D. MERAS, A. Z. MADERA, L. PEDANO, C. FERREYRA. "Kinetic fluorimetric determination of the antineoplastic methotrexate (MTX) in human serum". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 29, 851, 2002.
- [5] R. G. BUICE, P. SIDHU. "Reversed-phase high-pressure liquid chromatographic determination of serum methotrexate and 7-hydroxymethotrexate". *J. Pharm. Sci.*, 71, 74, 1982.
- [6] M. M. HUANG, L. PENN, J. BONGERS, S. BURMAN. "Validation of a shielded-hydrophobic-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of residual methotrexate in recombinant protein biopharmaceuticals". *J. Chromatogr. A*, 828, 303, 1998.
- [7] A. J. M. ORDIERES, A. C. GARCIA, J. M. F. ALVAREZ, P. T. BLANCO. "Phase-selective alternating current polarographic assay of methotrexate in human serum". *Anal. Chim. Acta*, 233, 281, 1990.
- [8] R. C. GURIRA, L. D. BOWERS. "Electrochemistry of methotrexate: Part I. Characteristics of reduction". *J. Electroanal. Chem.*, 146, 109, 1983.
- [9] G. R. SALAZAR-BANDA, L. S. ANDRADE, P. A. P. NASCENTE, P. S. PIZANI, R. C. ROCHA-FILHO, L. A. AVACA. "On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments". *Electrochim. Acta*, 51, 4612, 2006.