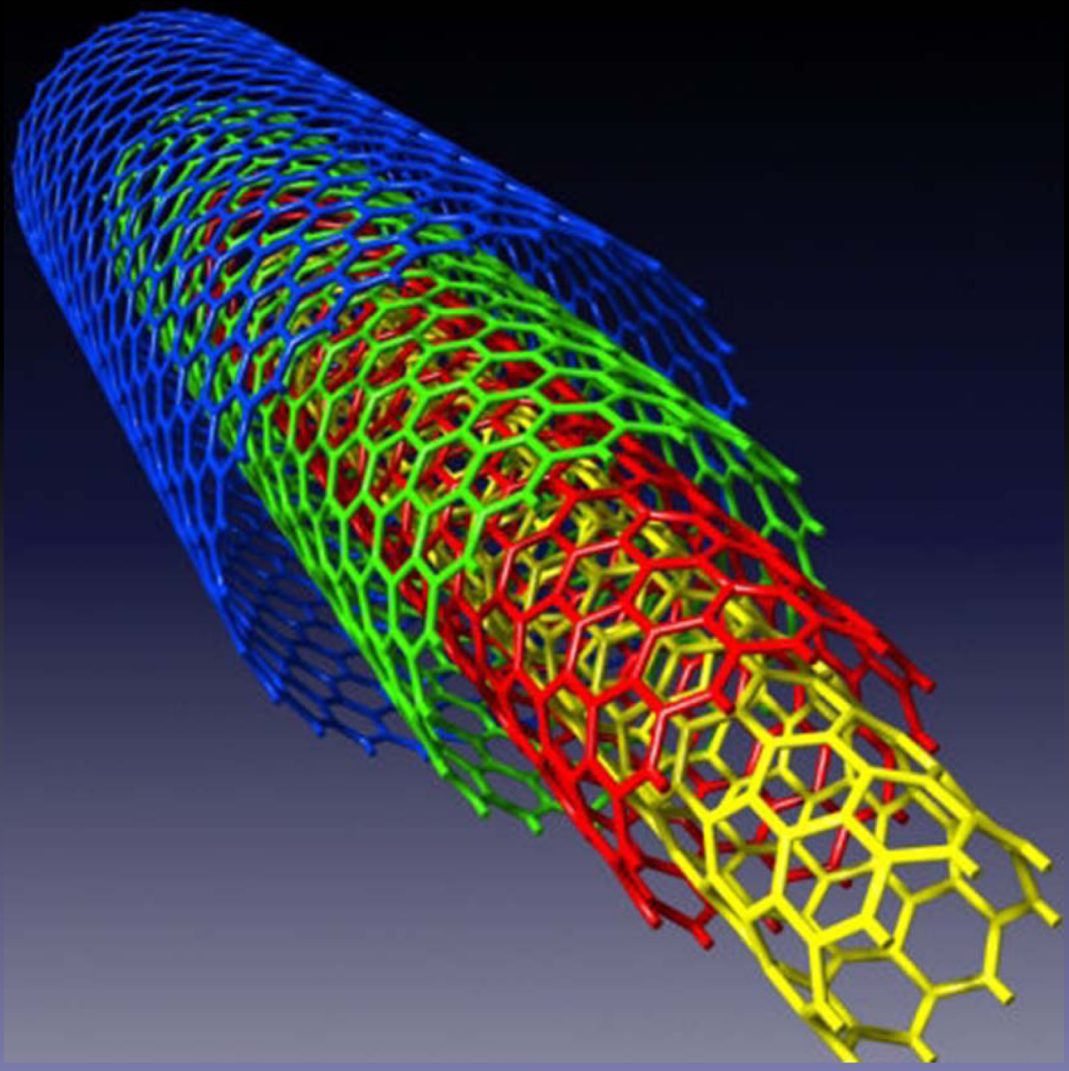
Ricardo Jorge da Cunha Carvalho

Eléctrodos de Carbono Modificados para o Desenvolvimento de Biossensores Electroquímicos



2012

· U C ·

Universidade de Coimbra

Ricardo Jorge da Cunha Carvalho

ELÉCTRODOS DE CARBONO MODIFICADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELECTROQUÍMICOS

Dissertação de Doutoramento na área científica de Bioquímica, especialidade Tecnologia Bioquímica, orientada pelo Senhor Professor Doutor Christopher Michael Ashton Brett e com orientação interna do Senhor Professor Doutor Luis Manuel de Oliveira Martinho de Rosário. Submetida ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

2012

· U C ·

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“Há mais pessoas que desistem do que pessoas que fracassam.” (Henry Ford)

Ao meu querido Avô

Agradecimentos

As minhas primeiras palavras de agradecimento terão de ser forçosamente dirigidas aos meus pais, uma vez que sem o amor, carinho e acima de tudo, sem a enorme paciência que tiveram comigo ao longo destes anos eu não conseguiria chegar até aqui. Ao meu mano, a pessoa que mais que mais me "chateia" no mundo só tenho a dizer que sem ele nada disto era possível. Quero estender também, o agradecimento a toda a minha família especialmente às minhas primas Clarisse e Tonê, que sempre tiveram ao meu lado durante os diferentes estágios da minha vida.

Agradeço ao Professor Christopher Michael Ashton Brett a confiança que depositou em mim, o seu permanente apoio e orientação que foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Não posso deixar passar a oportunidade de agradecer ao Professor Aziz Amine pela forma amável como me recebeu em Marrocos e por toda a sua disponibilidade, que fez com que a minha estadia em Mohammedia fosse extremamente agradável.

Em relação aos amigos/colegas de trabalho é óbvio que um trabalho de doutoramento era impossível de concluir sem o auxílio e apoio de várias pessoas, mas até pela sua ausência neste último ano, tenho de salientar uma muitos especial, que pelo seu apoio, companheirismo se tornou um amigo para toda a vida, o primeiro brinde grande Edilson vais ser para ti. E o que dizer das meninas que me acompanharam durante todo este percurso. Não há palavras para dizer o quão importantes se tornaram, e o quão difícil vai ser começar uma nova etapa sem vocês, Carla, Carolina, Madalina, Madi e Rasa (para evitar confusões coloquei por ordem alfabética) o meu muito obrigado.

Não posso deixar de enviar um agradecimento especial à malta do IPN, Dorinha, Victor, Patrícia, Ana, Adrien, bem como aos amigos e companheiros que foram passando aqui pelo laboratório e que deixaram muitas saudades. Obrigado Adil, pela amizade e pela forma como me recebeste em tua casa; Herbert, palavras para quê, vemo-nos um dia destes; Milla foi um prazer conhecer-te.

Quero agradecer também o apoio financeiro facultado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, bolsa de doutoramento SFRH/BD/46496., sem a qual este trabalho não seria possível de concretizar.

Para terminar quero agradecer aquela pessoa que me acompanhou na recta final deste trabalho, mas que eu espero sinceramente que esteja ao meu lado ao longo das próximas etapas. Obrigado Amè.

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

COMPETE

QREN QUADRO DE REFERÊNCIA ESTRATÉGICO NACIONAL

UNIÃO EUROPEIA

Resumo

O objectivo deste trabalho foi o estudo, caracterização e modificação de diferentes materiais de carbono com o intuito de desenvolver sensores e biossensores electroquímicos. Também foi estudado a melhoria das propriedades analíticas destes sensores através da modificação por diferentes mediadores redox e polímeros condutores.

Foi realizado um estudo da influência de três marcas de nanotubos de carbono de parede múltipla com diferentes quantidades no revestimento de eléctrodos de carbono vítreo, com vista ao desenvolvimento de sensores e biossensores electroquímicos. Investigou-se a influência das diferenças entre as três marcas de nanotubos na electropolimerização do monómero vermelho neutro. Estes eléctrodos modificados foram aplicados na determinação oxidativa do ascorbato, e os efeitos electrocatalíticos obtidos foram diferentes de acordo com a marca dos nanotubos. Um estudo da estabilidade operacional e de armazenamento dos eléctrodos modificados também foi efectuado.

Foi estudado pela primeira vez como material de eléctrodo para sensores, o tecido de carbono revestido com nanotubos de carbono e com nanotubos de carbono dopados com azoto. O comportamento da espécie electroactiva modelo hexacianoferrato(II) foi estudado e avaliado o efeito da dopagem dos nanotubos com azoto na resposta electroquímica. Foi formado um filme do polímero condutor poli(3,4-etilenodioxitiofeno) para melhorar as características físicas do tecido de carbono, reduzindo a capilaridade, de forma a optimizá-lo para ser usado como biossensor electroquímico com a enzima glucose oxidase imobilizada por reticulação.

Eléctrodos impressos de carbono, devido ao seu baixo custo e simplicidade de operação, foram utilizados como eléctrodo-substrato para diferentes modificações, com o intuito de se desenvolver um sensor para a determinação directa de aminoácidos electroactivos. Os eléctrodos foram modificados com dois tipos de carbono nanoestruturado, nanotubos de carbono e negro de carbono, e foi comparada a resposta à oxidação de vários aminoácidos. A electrodeposição de nanopartículas de cobre foi, também, investigada, e a respostas de todos os eléctrodos modificados na determinação do aminoácido triptofano foi avaliada.

Foi, adicionalmente, investigada a modificação de eléctrodos de filme de carbono com o mediador hexacianoferrato de cobalto ou de cobre e com a enzima glucose oxidase, com o objectivo de se determinar catiões de concentração micromolar de vários metais pesados por inibição enzimática utilizando amperometria a potencial fixo. O método foi optimizado em relação ao potencial aplicado e à influência do pH da solução electrolítica. Os iões de cádmio, cobalto, cobre e níquel foram detectados na presença de quantidades fixas de glucose, e a resposta à glucose foi testada na ausência e na presença de uma concentração fixa de inibidor. As constantes de inibição foram determinadas, sendo o mecanismo de inibição competitivo e reversível.

Abstract

The aim of this work was to study, characterise and modify carbon materials in order to develop electrochemical sensors and biosensors. The improvement of the analytical properties of these sensors was carried out by modifying the substrates with different redox mediators and conducting polymers.

A study of the influence of three brands of multiwalled carbon nanotubes with different coating loadings on glassy carbon electrodes was performed, with a view to sensor and biosensor development. The influence of the extent to which differences between nanotube brands can influence the electropolymerisation of neutral red monomer was investigated. These modified electrodes were applied to the oxidative determination of ascorbate, the electrocatalytic effects observed varying according to the type of nanotubes. A study of operational and storage stability was also performed.

Carbon cloth materials modified with carbon nanotubes and with nitrogen-doped carbon nanotubes were employed for the first time for the development of new electrode sensor materials. The behaviour of the model electroactive species hexacyanoferrate(II) was studied and the influence of nitrogen doping on the electrochemical response evaluated. A film of the conducting polymer poly(3,4-ethylenedioxythiophene) was formed in order to improve the physical characteristics of the carbon cloth reducing capillarity, in order to optimise it for use as an electrochemical biosensor with the enzyme glucose oxidase immobilized by cross-linking.

Screen-printed carbon electrodes, due to their low cost and simplicity of operation, were used as electrode substrate for different modifications, with the aim of developing a sensor for direct determination of electroactive amino acids. These electrodes were modified with two types of nanostructured carbon, carbon nanotubes and carbon black, and the response to the oxidation of several amino acids was compared. The deposition of copper nanoparticles was also investigated, and the response of all the modified electrodes in the determination of the amino acid tryptophan was evaluated.

Additionally, the modification of carbon film electrodes with the mediators cobalt hexacyanoferrate or copper hexacyanoferrate, and with glucose oxidase enzyme was investigated, with the aim of determining micromolar concentrations of heavy metal cations by enzyme inhibition using fixed potential amperometry. The method was optimised in relation to applied potential and the value of pH of the electrolyte solution. Cadmium, cobalt, copper and nickel ions were detected in the presence of fixed amounts of glucose and the glucose response was tested in the absence and presence of a fixed concentration of inhibitor. Inhibition constants were determined and the inhibition was found to be competitive and reversible.

Índice

Notação: símbolos principais ---------- i

Abreviaturas ---------- ii

Constantes físicas fundamentais ---------- iv

1. Introdução

1.1. Carbono como material de eléctrodo ---------- 1

1.1.2. Grafite ---------- 3

1.1.3. Nanotubos de carbono ---------- 4

1.1.4. Negro de carbono ---------- 6

1.2. Eléctrodos de carbono ---------- 8

1.2.1. Eléctrodo de carbono vítreo ---------- 8

1.2.2. Eléctrodo de filme impresso ---------- 9

1.2.3. Eléctrodo de filme de carbono ---------- 12

1.3. Biossensor: Definição e características ---------- 13

1.4.Enzimas ---------- 17

1.4.1. Conceitos gerais e funções ---------- 17

1.4.2. Cinética e mecanismos enzimáticos ---------- 19

1.4.3. Glucose oxidase ---------- 23

1.4.4. Imobilização de enzimas ---------- 25

1.4.4.1. Adsorção física ---------- 25

1.4.4.2. Reticulação ---------- 26

1.4.5. Inibição enzimática ---------- 28

1.5. Mediadores redox e polímeros condutores ---------- 32

1.5.1. Fenazinas---------- 32

1.5.2. PEDOT ---------- 35

1.5.3 Hexacianoferratos metálicos ---------- 37

1.6. Métodos de Caracterização Electroquímica e Morfológica ---------- 39

1.6.1. Reacções de eléctrodo: cinética e difusão ---------- 39

1.6.2. Técnicas electroquímicas ---------- 42

1.6.2.1. Voltametria cíclica ---------- 42

1.6.2.2. Cronoamperometria ---------- 49

1.6.2.3. Voltametria de onda quadrada ---------- 52

1.6.2.4. Espectroscopia de impedância electroquímica ---------- 53

1.6.3. Microscopia electrónica de varrimento ---------- 57

2. Experimental

2.1. Reagentes e soluções tampão ---------- 61

2.2. Instrumentação---------- 63

3. Estudo comparativo de diferentes marcas de nanotubos de carbono

3.1. Introdução ---------- 69

3.2. Pré-tratamento dos eléctrodos ---------- 70

3.2.1. Funcionalização e preparação dos MWCNT e pó de grafite ------ 70

3.2.2. Deposição de poli(vermelho neutro) ---------- 71

3.3. Caracterização electroquímica dos eléctrodos MWCNT ---------- 72

3.4. Electropolimerização do vermelho neutro ---------- 76

3.4.1. Mecanismo de reacção ---------- 77

3.4.2. Efeito do pH ---------- 78

3.4.3. Influência do CNT na electropolimerização do vermelho neutro ---------- 80

3.5. Microscopia de varrimento electrónico----------84

3.6. Oxidação electroquímica do ascorbato ----------86

3.6.1. Voltametria cíclica ----------86

3.6.2. Amperometria a potencial fixo----------89

3.7. Estabilidade dos eléctrodos GC modificados----------93

3.8. Avaliação da influência da estrutura e pureza dos CNT sobre o comportamento do sensor ----------94

3.9. Conclusões----------98

4. Eléctrodos de tecido de carbono modificado por nanotubos de carbono

4.1. Introdução---------- 103

4.2. Preparação e modificação dos eléctrodos ---------- 105

4.2.1. Fabricação das fibras de carbono ---------- 105

4.2.2. Preparação do eléctrodo e do biossensor ---------- 106

4.3. Caracterização electroquímica da fibra de carbono---------- 107

4.3.1. Determinação das áreas electroactivas de CCl, CNT_CCl e CNx_CCl ---------- 107

4.4. Electropolimerização de EDOT em CCl, CNT_CCl e CNx_CCl ------ 110

4.5. Biossensores baseados em PEDOT modificado CCl, CNT_CCl e CNx_CCl---------- 113

4.5.1. Optimização do método de imobilização enzimática ---------- 113

4.5.2. Optimização do potencial ideal para a determinação amperométrica ---------- 114

4.5.3. Propriedades analíticas dos biossensores modificados com PEDOT: CCl, CNT_CCl e CNx_CCl ---------- 115

4.5.4. Estudo da estabilidade dos biossensores GOx_PEDOT_CNT/CNx_CCl---------- 115

4.5.5. Caracterização por EIS dos eléctrodos modificados PEDOT e GOx_PEDOT ---------- 117

4.6. Conclusões ----------123

5. Eléctrodos impressos modificados com nanotubos de carbono e com negro de carbono

5.1. Introdução ----------125

5.2. Preparação e modificação dos eléctrodos----------128

5.2.1 Pré-tratamento dos eléctrodos impressos ----------128

5.2.2 Preparação de SPE modificados por MWCNT e CB----------128

5.2.3. Electrodeposição de nano-particulas de cobre----------129

5.3. Optimização da preparação do eléctrodo modificado----------130

5.3.1. Escolha da concentração de CNT e CB ----------130

5.3.2. Estudo do potencial de pré-concentração ----------131

5.3.3. Estudo do tempo de pré-concentração----------132

5.4. Caracterização dos eléctrodos SPE modificados ----------133

5.4.1. Caracterização morfológica ----------133

5.4.2. Voltametria cíclica----------134

5.4.3. Espectroscopia de impedância electroquímica ----------137

5.5. Estudo da oxidação electrocatalítica de triptofano na superfície de SPE modificado com nanopartículas ----------139

5.5.1. Voltametria de onda quadrada ----------139

5.5.2. Espectroscopia de impedância electroquímica ----------142

5.5.3. Parâmetros analíticos----------144

5.5.4. Estabilidade operacional e selectividade ----------146

5.6. Conclusões ----------148

6. Determinação de metais pesados por inibição enzimática

6.1. Introdução ----------153

6.2. Preparação dos eléctrodos de filme de carbono----------154

6.2.1. Pré-tratamento do eléctrodo ---------- 154

6.2.2. Deposição de hexacianoferrato de cobalto ---------- 155

6.2.3. Deposição de hexacianoferrato de cobre---------- 156

6.2.4. Imobilização da enzima ---------- 156

6.3. Deposição e caracterização de eléctrodos modificados com hexacianoferrato ---------- 156

6.3.1. Voltametria cíclica ---------- 156

6.3.2. Espectroscopia de impedância electroquímica---------- 158

6.4. Biossensores de inibição – Optimização ---------- 160

6.4.1. Influência do potencial aplicado ---------- 160

6.4.2. Influência do pH da solução tampão ---------- 161

6.4.3. Influência do mediador redox ---------- 164

6.5. Determinação da inibição enzimática por amperometria a potencial fixo ---------- 164

6.6. Determinação do tipo de inibição enzimática ---------- 172

6.7. Espectroscopia de impedância electroquímica dos biossensores ------- 174

6.8. Conclusões---------- 177

7. Conclusões ---------- 181

Bibliografia ---------- 187

Notação: símbolos principais

A		área	cm^2
b		energia de adsorção	
C		concentração	mol dm^{-3} (M)
C_{dl}		capacidade da dupla camada	F
D_o		coeficiente de difusão	$m^2\ s^{-1}$
e		carga do electrão	C
E		potencial do eléctrodo	V
	E^o	potencial do eléctrodo padrão	
	$E^{o\prime}$	potencial formal	
	E_p	potencial do pico	
	$E_{p/2}$	potencial de meia-onda	
	ΔE_s	degrau de potencial	
f		frequência	Hz
I		corrente eléctrica	A
	I_a, I_c	corrente anódica, catódica	
	I_C	corrente capacitiva	
	I_f	corrente farádica	
	I_p	corrente de pico	
	I_0	amplitude do sinal da corrente	
	I_{50}	50% de inibição enzimática de corrente	
J		densidade de corrente eléctrica	A m^{-2}
k		constante de corrente de ordem zero	mol $L^{-1}\ s^{-1}$
k_0		constante de velocidade de transferência de electrões padrão	cm s^{-1}
K_{eq}		constante de equilíbrio	–
K_M		constante Michaelis-Menten	mol L^{-1}
n		número de electrões transferidos	–
n'		número de electrões transferidos na etapa determinante	–
R		resistência	Ω

R_{ct}	resistência à transferência de carga	
R_{Ω}	resistência da solução numa célula	
R^2	coeficiente de correlação	
sccm	centímetro cubico padrão por minuto	Sccm
t	tempo	S
T	Temperatura	K
v	velocidade da reacção	Mol L^{-1} s^{-1}
v_0	velocidade inicial de reacção	
v_{max}	velocidade de reacção máxima	
v	velocidade de varrimento	V s^{-1}
$W_{1/2}$	largura a meia-altura do pico	mV
x	distância	Cm
Z	impedância	Ω
Z'	parte real da impedância	
Z''	parte imaginária da impedância	
Z_w	impedância de Warburg	
α	coeficiente de transferência de carga electroquímica	–
α	parâmetro de rugosidade do eléctrodo	–
Γ	concentração à superfície	mol cm^{-2}
Θ	$\exp[(nF/RT)(E-E^{0\prime})]$	–
σ	$v(nF/RT)$	–
Φ	deslocamento corrente-potencial	–
χ	potencial eléctrico de superfície	V
χ^2	erro médio	–
Ω	frequência radial	rad s^{-1}

Abreviaturas

AA	ácido L-ascórbico
DNA	ácido desoxirribonucleico
ATP	adenosina trifosfato

RNA	ácido ribonucleico
BSA	albumina sérica bovina
CA	cronoamperometria (*chronoamperometry*)
CB	negro de carbono (*carbon black*)
CCFS	resíduos carbonáceos carboxilados
CCl	tecido de carbono (*carbon cloth*)
CF	eléctrodos de filme de carbono (*carbon film*)
CNT	nanotubos de carbono (*carbon nanotubes*)
CPE	elemento de fase constante (*constant phase element*)
CoHCF	hexacianoferrato de cobalto
CuHCF	hexacianoferrato de cobre
Cys	cisteína
CV	voltametria cíclica (cyclic voltammetry)
CVD	deposição química em fase de vapor
EIS	espectroscopia de impedância electroquímica (*electrochemical impedance spectroscopy*)
FAD	flavina adenina dinucleotídeo (*flavin adenine dinucleotide*)
$FADH_2$	flavina adenina dinucleotídeo, forma reduzida
FRA	analisador da resposta de frequência (*frequency response analyzer*)
FTIR	infravermelho com transformadas de Fourier
GA	glutaraldeído
GC	carbono vítreo (*glassy carbon*)
GOx	glucose oxidase
GP	pó de grafite
MHCF	hexacianoferrato metálico
HPLC	cromatografia liquida de alta eficiencia (*high performance liquid chromatography*)
ISE	eléctrodo selectivo de iões (*ion-selective electrode*)
IUPAC	União Internacional de Quimica Pura e Aplicada (IUPAC)
MWCNT	nanotubos de carbono de paredes múltiplas
NAD^+	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada

NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
$NADP^+$	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NC-IUBMB	Comité de Nomenclaturas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
NP	nano-partícula
NR	vermelho neutro
OCP	potencial em circuito aberto (*open circuit potential*)
PAN	poliacrilonitrila
PB	azul de Prússia (*Prussian blue*)
PEDOT	poli(3,4-etilenodioxitiofeno)
POCT	*"point-of-care testing"*
PNR	poli(vermelho neutro) (poly (neutral red))
RSD	desvio padrão relativo (*relative standard deviation*)
SCE	eléctrodo de calomelanos saturado (saturated calomel electrode)
SEM	microscopia electrónica de varrimento (*scanning electron microscopy*)
SPE	eléctrodos de filmes impressos (screen printed electrodes)
SWV	voltametria de onda quadrada (square wave voltametry)
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
UV-VIS	ultravioleta-visível

Constantes físicas fundamentais

E	unidade de carga eléctrica	1.602×10^{-19} C
F	constante de Faraday	9.648×10^{4} C mol^{-1}
R	constante dos gases ideais	8.314 J K^{-1} mol^{-1}

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

Neste capítulo serão apresentadas algumas noções e conceitos gerais sobre carbono e materiais de carbono utilizados no domínio da electroquímica. Será introduzido o conceito de mediador redox e a sua importância na arquitectura de um biossensor e apresentados os principais mediadores estudados com o intuito de melhorar as características da superfície dos eléctrodos bem como a sua resposta a diferentes analitos. Uma vez que as técnicas electroquímicas são fundamentais na caracterização de biossensores, estas, bem como alguns conceitos básicos de electroquímica serão também sujeitos a uma breve descrição.

1.1. Carbono como material de eléctrodo

Materiais à base de carbono apresentam normalmente uma maior janela de potencial do que os eléctrodos de metal [1], e satisfazem os principais requisitos para um bom material de eléctrodo, como por exemplo, estabilidade a longo prazo, amplo intervalo de potencial com baixa corrente residual, principalmente na região de potencias positivos e uma boa condutividade eléctrica [1]. A escolha de um material de eléctrodo está directamente relacionado com a janela de potencial numa determinada solução bem, como as qualidades e pureza desse material [2].

O carbono demonstrou ao longo do tempo ser muito útil como material de eléctrodo e uma das suas maiores vantagens é o facto de o carbono ser uma das substâncias mais abundantes do planeta e que ocorre livremente em formas cristalinas, tais como o diamante e a grafite. As estruturas destes tipos de carbono estão representadas na Fig. 1.1, onde se observa que a o diamante e a grafite apresentam duas estruturas claramente diferentes. No caso do diamante o facto dos átomos de carbono estarem organizados numa configuração tetraédrica com as ligações hibridas sp^3 [3] faz com que o diamante seja a substância proveniente da natureza mais dura que se conhece e consequentemente é usado amplamente na indústria como abrasivo.

Devido às suas propriedades físicas, químicas e mecânicas o carbono é extensamente usado como material de eléctrodo [4]. Os diferentes tipos de materiais de

carbono utilizados neste trabalho serão discutidos mais detalhadamente nas secções seguintes. Os critérios de selecção da escolha dos eléctrodos à base de carbono podem ser classificados de acordo com as necessidades de utilização [5-7].

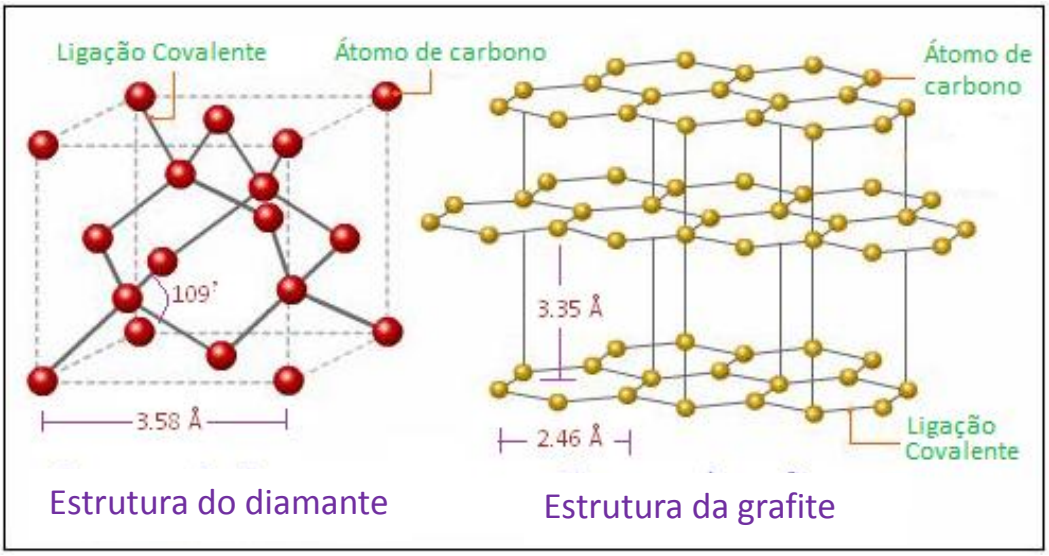


Figura 1.1 – Estrutura do diamante e da grafite.

O primeiro critério está relacionado com a necessidade de se trabalhar com correntes de fundo baixas e uma larga janela de potencial. Para técnicas voltamétricas, as correntes de carga que os eléctrodos usualmente exibem estão dependentes do tipo de carbono. A porosidade, adsorção iónica, procedimento de pré-tratamento e processos redox que ocorrem na superfície de eléctrodos à base de carbono, são atribuídos a estes factores, que faz com que estes materiais de carbono exibam um comportamento voltamétrico onde se observa um aumento do valor capacitivo acima do valor esperado pelo efeito da dupla camada, permitindo determinações analíticas na ordem de 10^{-12} ou até mesmo menores.

Os segundos critérios de desempenho são a reprodutibilidade e a estabilidade. Estes parâmetros estão largamente dependentes do operador, uma vez que necessitam de pré-tratamentos de eléctrodo semelhantes.

O terceiro critério de desempenho está relacionado com a cinética de transferência dos electrões. O uso de técnicas voltamétricas no estudo dos mecanismos de reacção está

dependente de uma resposta cinética adequada por parte do eléctrodo utilizado, particularmente para reacções rápidas.

A adsorção é outro critério que influencia o desempenho, mas só é desejada ocasionalmente porque é normalmente considerada um efeito indesejado numa resposta analítica, em processos de transporte de massa controlados por difusão. Além disso, a adsorção de impurezas e/ou produtos de reacção pode diminuir ou mesmo desactivar a resposta do eléctrodo (envenenamento). O tipo de eléctrodo escolhido é fundamental de forma a evitar esta mesma situação.

1.1.2. Grafite

O carbono apresenta uma estrutura “amorfa” ou “não estruturada”, enquanto a grafite é um polimorfo do carbono que surpreendentemente à temperatura e pressão atmosférica apresenta-se numa forma estável. A grafite tem uma estrutura de folhas onde os átomos se alinham num plano e onde as folhas de grafite inferior e superior estão fracamente ligadas. A grafite é um dos materiais mais suaves que se conhece e a sua estrutura apresenta planos lamelares de carbonos hibridizados em sp^2 organizados em hexágonos (Fig. 1.1.) com um alto grau de deslocalização dos electrões-π, apresentando uma boa condutividade electrónica [7,8]. A diferença entre carbono e grafite está dependente de uma definição um tanto ou quanto subjectiva uma vez que a maioria dos carbonos apresenta cristalitos com estrutura grafítica.

A grafite pode ser natural ou sintética. A grafite natural é uma das formas alotrópicas do carbono encontradas na natureza, já a sintética é produzida industrialmente com uso de altas temperaturas e pressão na presença de matérias-primas tais como o coque de petróleo ou a antracite. A grafite natural pode ser encontrada em mais de uma forma na natureza: a microcristalina, conhecida comercialmente como "grafite amorfo", a forma cristalina conhecida como grafite cristalino tipo floco ou "*flake*" ou a grafite de veio "*lump*, sendo esta uma das formas mais raras e produzida somente no Sri Lanka [9]. Grafite altamente organizada como a grafite pirolítica (PG) tem propriedades muito especiais. É produzida por decomposição química de vapor (CVD), que se apresenta como um processo

teoricamente simples e baseado na decomposição térmica de um hidrocarboneto gasoso. Este material pode ser produzido a partir de uma variedade de precursores [10,11]. Por exemplo, o metano pode ser pirolisado através da passagem por um substrato do tipo carbono vítreo a 1000ºC [12], vitrocerâmica a 926ºC [13] ou em quartzo aquecido em temperaturas moderadas [14]. Esta é muito pura e exibe propriedades anisotrópicas relativamente à orientação do cristal. A orientação do plano basal, em particular, não é muito reactiva e as suas propriedades electroquímicas são muito semelhantes ao mercúrio [15], contudo a grafite apresenta um sobrepotencial mais elevado para, por exemplo, a electrólise da água (libertação de H_2 e O_2) e uma janela de potencial estável mais ampla que o mercúrio [7,8].

1.1.3. Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono (CNT – *carbon nanotubes*) foram descobertos em 1991 por Iijima [16], logo depois da descoberta dos fulurenos por Kroto *et al*. em 1985 [17]. Ambos são formações de carbono, sendo que os nanotubos de carbono são formações cilíndricas que ocorrem a partir de uma camada de grafite que se enrola, usualmente com diâmetro de poucos Å a algumas dezenas de nanómetros, enquanto o comprimento pode variar desde várias centenas de nm a vários µm [18,19].

Do ponto de vista estrutural, os CNT podem ser classificados em nanotubos de parede simples (SWCNT – *singled walled carbon nanotubes*) e os de parede múltiplas (MWCNT – *multi-walled carbon nanotubes*). Os primeiros são constituídos apenas por uma única folha de grafeno enrolada sobre si mesma formando um tubo cilíndrico de diâmetro na ordem de 0,2 nm a 2 nm, enquanto os MWCNT envolvem múltiplas folhas de grafeno enrolados de forma concêntrica, cujo diâmetro coaxial varia entre 2 nm a 100 nm, com uma distância entre camadas de 0,34 a 0,36 nm [20]. A estrutura de SWCNT pode ser definida [21] utilizando um vector enrolamento r e um angulo quiral Θ, Fig. 1.2. O vector de enrolamento é definido como uma combinação linear dos vectores base a e b do hexágono de acordo com:

$$r = na + mb \quad (1.1)$$

onde *n* e *m* são números inteiros. Deste modo, diferentes tipos de nanotubos podem ser definidos consoante os valores de *n* e *m*, sendo importante notar que a maneira pela qual a folha de grafeno é enrolada determina a estrutura dos nanotubos e as suas propriedades físicas. De acordo com estudos teóricos, os SWCNT podem ser metálicos ou semicondutores em função do seu diâmetro e do seu angulo de quiralidade Fig.1.2 [22]. A razão entre o comprimento e o diâmetro dos nanotubos é superior a 1000, sendo por isso considerados como uma estrutura unidimensional.

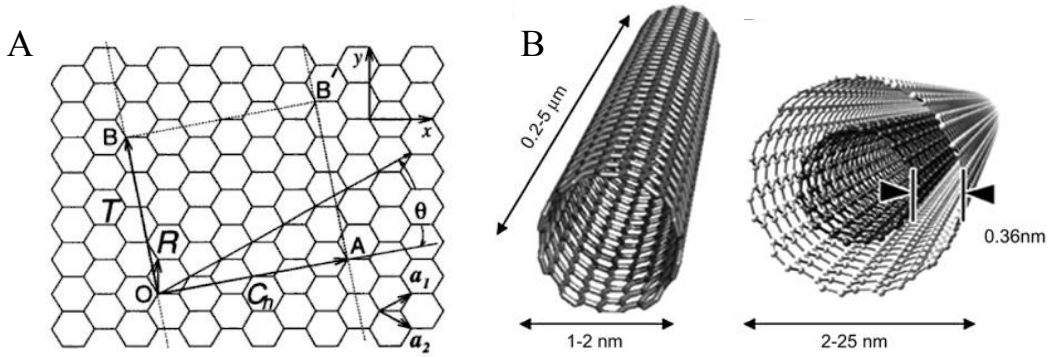


Figura 1.2 - A) Esquema ilustrativo do modo de enrolamento para a formação de nanotubos cilíndricos partindo de uma folha planar de grafeno [22]; B) representação de SWCNT e MWCNT [23].

Os CNT podem actuar como suporte para eletrocatalisadores orgânicos e inorgânicos para formarem nanodispositivos electroquimicamente funcionais e sensores [24]. Estas funcionalidades podem ser atribuídas às paredes laterais π-conjugadas e altamente hidrofóbicas formadas por átomos de carbono sp^2 que apresentam extremidades abertas com grupos funcionais oxigenados [25]. Estas propriedades únicas estruturais e electrónicas torna os CNT capazes de formar matrizes tridimensionais condutoras que podem ser usados para a imobilização de enzimas [26] e DNA [27], permitindo a transferência de electrões directa, de e para essas biomacromoléculas com excelentes melhoramentos das respostas farádicas [28]. Para tais fins, é necessária a funcionalização não covalente das paredes laterais de CNT, a fim de preservar a estrutura nanotubo sp^2 e, portanto, as suas características electrónicas [29].

Devido à natureza hidrofóbica dos CNT, é difícil obter dispersões deste composto em soluções aquosas e solventes orgânicos. Desta forma, para conferir um carácter hidrófilico e ao mesmo tempo activar quimicamente os locais com defeitos, os nanotubos precisam de ser purificados e quimicamente funcionalizados. Estes tratamentos podem ser efectuados por métodos químicos: por exemplo, o tratamento com ácidos oxidantes fortes é uma maneira eficaz e usual para gerar grupos-COOH na sua superfície [30].

Nas últimas décadas a síntese de nanotubos de carbono teve uma evolução significativa. Os métodos mais utilizados são a descarga de arco eléctrico, vaporização por laser e decomposição catalítica de hidrocarbonetos, também designada por CVD [31].

Como consequência do processo de fabrico, os nanotubos de carbono contêm também carbono amorfo, impurezas metálicas e alguns resíduos. Além disso, os métodos de produção actualmente existente produzem nanotubos de vários comprimentos, diâmetros e estruturas, resultando numa falta de consistência nas propriedades dos mesmos. Neste trabalho vai-se investigar até que ponto estes defeitos têm influência nas determinações eletroanalíticas.

1.1.4. Negro de carbono

O negro de carbono (CB) é praticamente carbono puro elementar sob a forma de partículas coloidais que são produzidos pela combustão incompleta ou decomposição térmica de hidrocarbonetos gasosos ou líquidos sob condições controladas. A sua aparência física é a de um sedimento preto finamente dividido ou pó. A sua utilização em pneus, produtos de borracha e de plástico, tintas de impressão e de revestimentos está relacionado com as propriedades de área de superfície específica, tamanho de partícula e da condutividade, estrutura e cor.

Aproximadamente 90% de negro de carbono é utilizado em aplicações envolvendo borracha, 9% como pigmento, e os restantes 1% como um ingrediente essencial em centenas de diversas aplicações [32].

Tabela 1.1 - Características do negro de carbono.

Item	Valores	Notas
percentagem de carbono	97%-99% (m/m)	mistura de C_{60}/C_{70} (6/4)
estado híbrido do carbono	carbonos sp^2	alto grau de pureza
homogeneidade das microestruturas	100%	característica comum em pirólise de alta temperatura
compostos iniciais	carbonáceos provenientes de resíduos industriais	óleo residual ou coque de petróleo
método de produção	método de fornaça	decomposição térmica (pirólise)
custo de produção	~1€/kg	preço sem grandes oscilações
produção/ano	~10 Mton	distribuído por fábricas em todo o mundo
aplicações	pó preto granulado	utilizado normalmente como reforço de borracha ou *toner* de impressão

O tamanho da partícula e a estrutura do negro de carbono influenciam directamente o critério de escolha, uma vez que, o CB de partículas finas e alta estrutura, apresenta melhores características para modificação de substratos electroquímicos apesar de demostrarem uma mais difícil incorporação do que o CB com tamanho de partículas maiores e de baixa estrutura. As partículas do negro de carbono tendem a se reunir em aglomerados (Fig. 1.3). Esta tendência de aglomeração é definida como índice de estrutura, quanto maior a aglomeração maior o índice, ou seja, o índice é maior quanto maior o número de partículas fundidas entre si para formar aglomerados e formar uma cadeia. Estas propriedades físicas vão estar intimamente ligadas com a sua resposta electroquímica, e é um parâmetro fundamental na escolha do tipo de CB a utilizar (capítulo 5).

Como foi referido na secção anterior, trabalhos sucessivos demonstraram, que a propriedade electrocatalítica dos nanotubos pode ser atribuída em grande parte aos defeitos inatos na sua estrutura [25, 34].

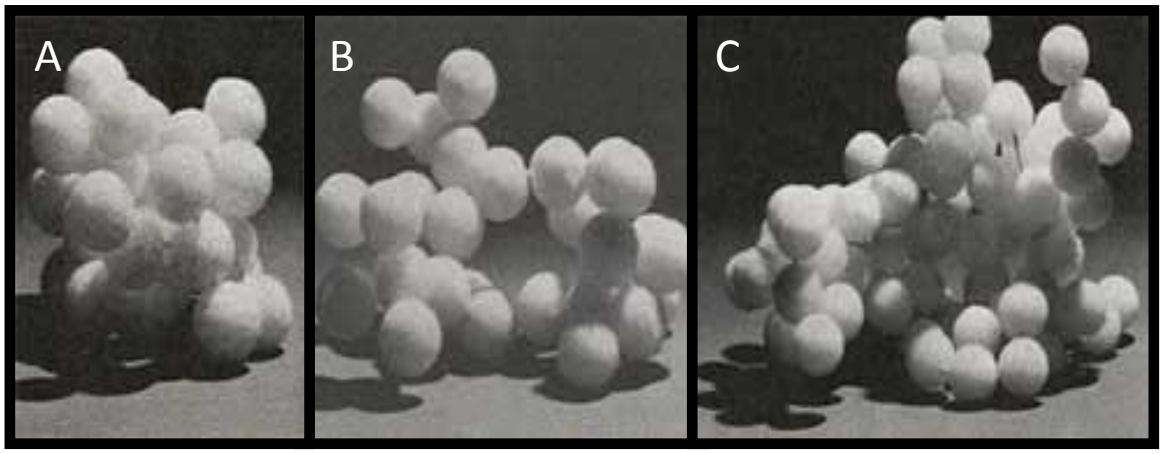


Figura 1.3 - A) Estrutura baixa, morfologia compacta; B) estrutura elevada, morfologia aberta; C) estrutura elevada, morfologia intermédia [33].

Trabalhos recentes provaram a existência de uma grande quantidade de tipo de defeitos em amostras de CB disponíveis comercialmente [35, 36].

Para além das aplicações industriais, mencionadas anteriormente, o CB tem sido largamente utilizado como material de carbono para a construção de sensores para a detecção de analitos em fases gasosas [37], em células de combustível [38] e no desenvolvimento de baterias de sodio e lítio [39,40]. No entanto, até 2011, poucas aplicações foram publicadas com negro de carbono como material de eléctrodo para detecção do analito em solução [41,42].

1.2. Eléctrodos de carbono

1.2.1 Carbono vítreo (GC)

O carbono vítreo é fabricado através de resinas poliméricas, tais como poliacrilonitrilo ou polímeros fenol/formaldeído através de uma serie de tratamentos de calor (normalmente sobre pressão) entre os 1000 e os 3000 ºC [2], obtendo-se como resultado final um material de carbono duro, condutivo e impermeável a soluções [43-47]. GC também pode ser fabricado a temperaturas relativamente baixas (~700 ºC) a partir de um percursor polimérico reactivo, que permite “dopar” o polímero com diversos

heterótomos, bem como o produto final, incluído halogéneos, silicone e catalisadores metálicos [48, 49].

Após a carbonização, o material residual é essencialmente vítreo, ou seja, apresenta uma ordem de longo alcance do tipo cristalino, *i.e.*, quando o arranjo dos seus constituintes moleculares é apenas algumas vezes o tamanho de cada constituinte [15, 50]. No caso do carbono vítreo esta característica representa pequenos cristalitos, de espessura até ~3 nm, orientadas aleatoriamente.

Os primeiros modelos estruturais apresentados para o GC sugeriam que os átomos de carbono apresentavam ligações sp^2 e sp^3 [43]. Supostamente esta estrutura apresentava um domínio tetraédrico, ligada por pequenas pontes que continham oxigénio. Após este primeiro modelo estrutural, muitas outras estruturas foram sugeridas; contudo, sabe-se agora que o carbono vítreo contém 100% de ligações sp^2 [6, 51]. A estrutura do GC consiste em planos grafíticos dispostos de forma aleatória numa topologia complexa. Devido à sua alta densidade e dimensão de poros relativamente pequena, nenhum procedimento de impregnação provou ser necessário. O GC mostrou então ser impermeável a líquidos e gases, fácil de polir e compatível com todos os solventes comuns. Estas propriedades e o facto da resistência do GC ser suficientemente baixa para ser insignificante na maioria das aplicações electroquímicas levaram a que este tipo de material de eléctrodo utilizado de uma forma generalizada na análise voltamétrica e mecanismo de reacção de vários compostos [2]. Foi demonstrado que as taxas de oxidação de certos GC em oxigénio, dióxido de carbono ou vapor de água são mais baixas que para qualquer outro tipo de carbono [1].

1.2.2. Eléctrodos de filmes impressos (SPE)

Baixo custo e facilidade de uso são determinantes no desenvolvimento de versões comercializáveis de sensores electroquímicos. Na prática, eléctrodos sólidos são os mais adequados para fins comerciais, uma vez que apresentam sensibilidade, selectividade, estabilidade, precisão e resposta rápida.

As infinitas possibilidades de modificação de eléctrodos sólidos permitem o desenvolvimento dos mais variados sensores de forma a atender à crescente procura, principalmente na área medicinal, industrial e ambiental [52]. Por outro lado, a regeneração da superfície após o uso é um enorme entrave para o desenvolvimento deste tipo de eléctrodos para uso comercial. No ponto de vista do utilizador, a regeneração física ou química de um eléctrodo é algo que se poderá tornar moroso e dispendioso, por isso uma das soluções para este problema é o desenvolvimento de eléctrodos descartáveis.

Eléctrodos impressos (SPE - *screen printed electrodes*) representam uma das melhores alternativas no desenvolvimento de novos sensores, e têm vindo a ser desenvolvidos e melhorados com maior intensidade na última década devido ao facto de apresentarem resposta rápida, alta sensibilidade e boa capacidade de operarem a temperatura ambiente [53, 54].

Existem variados procedimentos de *screen printing*, mas os SPE que foram utilizados neste trabalho foram fabricados recorrendo à tecnologia de filme espesso, "*thick film"*, que se baseia na deposição sequencial de diferentes camadas de tintas ou pastas num suporte ou substrato isolador que consiste num método rápido e fácil para produção em massa de sensores electroquímicos descartáveis (Fig. 1.4) [55].

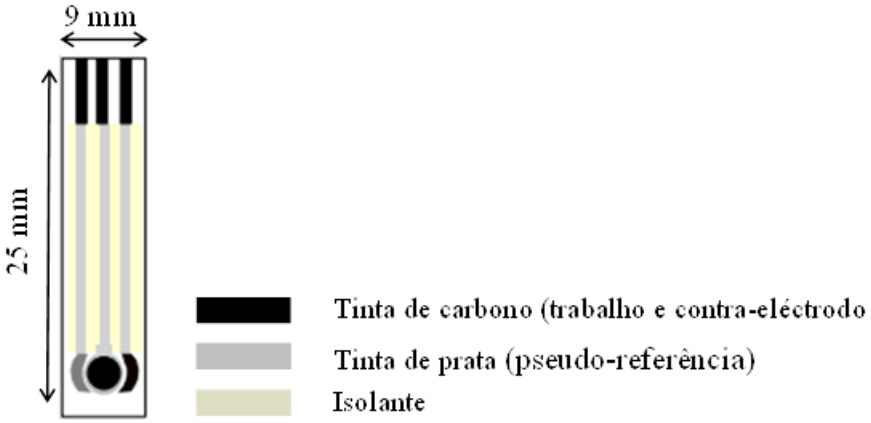


Figura 1.4 - Esquema de eléctrodo impresso de carbono (SPE).

Os substratos dos eléctrodos de filmes impressos (SPE) são normalmente de cerâmica ou plástico. De forma a se obter uma boa configuração electrónica, as tintas

normalmente utilizadas são de carbono juntamente com metais nobres tais como ouro, platina ou prata [56].

Uma das características mais atrativas da tecnologia de eléctrodos impressos é a capacidade de se poder imprimir diversas tintas em diferentes substratos e a possibilidade de se poder introduzir modificações na tinta base. Esta característica juntamente com o facto de os SPE poderem sem criados com qualquer geometria, faz com que estes eléctrodos se possam adaptar ao analito que se pretende determinar mas também ao meio em que está inserido, fazendo dos SPE eléctrodos altamente selectivos.

De salientar que a superfície dos SPE não é tão lisa como as dos eléctrodos mais tradicionais, fabricadas por exemplo a partir de GC ou grafite pirolítica [57], apresentando bastante rugosidade. Os compostos de ligação (*binders*) presentes nas tintas de carbono que poderão estar na origem desta rugosidade fazem com que se observem voltamogramas com características estranhas e que a superfície destes eléctrodos apresente uma cinética mais lenta e heterogénea [1].

O facto dos eléctrodos impressos serem descartáveis e assim sendo serem utilizados uma única vez é, juntamente com o seu baixo custo, os maiores atributos deste tipo de eléctrodos, que fazem com que os SPE apresentem diversas vantagens, tais como, o facto de se poder evitar a contaminação e eliminação de problemas de falta de resposta devido ao envenenamento do eléctrodo e da desnaturação da enzima no caso de um biossensor.

A caracterização e identificação dos locais com defeitos nas extremidades do carbono presente nos SPE [35, 58] demonstraram que as performances analíticas destes eléctrodos podem ser melhoradas aumentando o número de locais (*edge sites*) com defeitos, fazendo dos SPE ideais para a modificação com outros tipos de carbono *e.g.* CB e CNT [35].

SPE representam então uma das mais interessantes alternativas na arquitectura de novos sensores electroquímicos. Estes sensores têm vindo a ser citados em diversos artigos como sensores para análises em áreas tão diversas como a química, bioquímica, biomédica, ambiental e industrial [56]. Para além de todos os benefícios referidos anteriormente, um dos mais importantes prende-se na facilidade de operação destes eléctrodos, que uma vez

que comportam a célula electroquímica na totalidade, não necessitam de ser manuseados por pessoal qualificado, e permitem juntamente com um potenciostato portátil serem utilizados com grande facilidade fora do laboratório.

1.2.3 Eléctrodos de filme de carbono

Os eléctrodos de filmes de carbono (CF – *carbon film*) têm sido amplamente utilizados no nosso grupo de pesquisa, uma vez que apresentam excelentes propriedades electroquímicas para além de serem bastante práticos e económicos [59, 60].

Os eléctrodos de filme de carbono podem ser preparados a partir de resistências de filme de carbono que podem apresentar diferentes valores nominais; os filmes de carbono são formados sobre cilindros de cerâmica com o diâmetro de 0,15 cm e o comprimento de 0,6 cm. Os CF podem ser preparados por diversos métodos [6], mas aqueles utilizados neste trabalho foram produzidos através da deposição pirolítica de carbono a uma temperatura de 1100ºC numa atmosfera de azoto com metano. A pirólise poderá durar entre 10 a 60 minutos formando-se uma camada de carbono com espessura 5 a 500 Ω sq^{-1}, estando o tempo de deposição directamente relacionado com a resistência e espessura do filme depositado. Neste trabalho utilizou-se resistência de 2,0 Ω com uma espessura de filme de 15 µm [61].

Figura 1.5 Esquema de preparação dos eléctrodos de filme de carbono.

Como se observa na Fig. 1.5, as resistências possuem em cada extremidade um contacto metálico que tem a dupla função de protecção da superfície e funcionam como contacto externo. De forma a tornar estas resistências funcionais para serem usadas como eléctrodos, removeu-se um dos contactos metálicos e na outra extremidade, como se visualiza na figura anterior, procedeu-se ao seu isolamento com um tubo de plástico e resina epóxida, obtendo-se uma área geométrica de aproximadamente 0,20 cm^2.

1.3. Biossensor. Definição e características

Diversos processos químicos ocorrem em simultâneo em cada organismo vivo e mesmo nos mais simples ocorrem inúmeros processos bioquímicos que têm as suas funções bem definidas e se complementam de forma perfeita, sendo caracterizados por uma selectividade e eficiência extraordinária [62]. Existe actualmente um esforço extraordinário no sentido de se desenvolver novas metodologias para análises quantitativas e qualitativas, que consigam combinar alta selectividade com eficiência.

Um biossensor electroquímico é um dispositivo analítico auto-integrado capaz de fornecer informação específica usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que é retido de forma a ficar em contacto directo com um elemento de transdução electroquímica [63]. O elemento de reconhecimento pode ser um elemento biológico, derivado ou biomimético e tem a função de traduzir a informação do domínio bioquímico, geralmente a concentração de um analito, num sinal físico ou químico [64]. Ele deve possuir algumas características desejáveis como, por exemplo: boa selectividade, faixa de sensibilidade adequada, exactidão e precisão, um tempo de vida útil maior possível, frequência de amostragem também maior possível, reprodutibilidade, baixo custo e ser de pequenas dimensões [65].

Na construção de um biossensor são necessários três elementos: um receptor biológico, para o reconhecimento, o transdutor do sinal e um elemento para o processamento do sinal (Fig. 1.6).

O elemento receptor tem como função principal fornecer um altíssimo grau de selectividade ao sensor para a determinação do analito que se deseja identificar. As enzimas, anticorpos, DNA, entre outros, são bastante utilizadas na arquitectura de um biossensor uma vez que a sua especificidade faz com que os biossensores de eléctrodos modificados apresentem uma selectividade notável, sendo capaz de distinguir o analito alvo entre os compostos com estrutura semelhante.

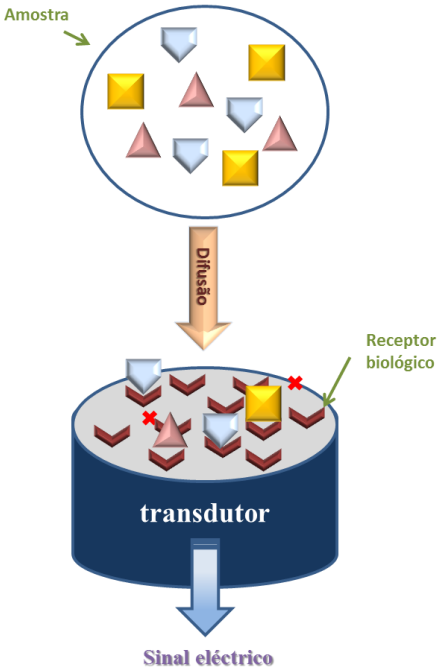


Figura 1.6 - Esquema de funcionamento de um biossensor (amperométrico).

Relativamente ao transdutor este pode ser um eléctrodo, fibra óptica, cristal de quartzo, resistência térmica ou eléctrica, entre outros. Desta forma, os biossensores vêm classificados de diferentes formas dependendo do tipo de transdutor que entra na sua arquitectura e o modo como se processa a detecção de transdução do sinal. Thévenot [63] classificou os biossensores de acordo com:

1) A especificidade do receptor biológico:

- afinidade do sensor: quando o biorreceptor usa interacções não covalentes, como reacções anticorpo-antigénio;
- sensor catalítico: quando o analito é o substrato de uma enzima, ou quando pode ser detectado através da medição do sinal produzido por um determinado substrato ou produto de uma reacção enzimática em que o analito está envolvido.

2) O modo como se processa a detecção da transdução do sinal para biossensores electroquímicos, tais como:

- Amperométrica, que tem por base a medição de corrente resultante da reacção redox das espécies electroactivas. A detecção do sinal é recolhida mantendo-se fixo o potencial no eléctrodo de trabalho em relação ao eléctrodo de referência. A corrente resultante está directamente relacionada com a concentração das espécies electroactivas ou com a taxa de produção/consumo dentro da camada biocatalítica adjacente [64].
- Potenciométrica, que envolve a medição da diferença de potencial entre dois eléctrodos nos quais não existe um fluxo de corrente significativo. Os mais usuais têm como transdutor eléctrodos de vidro selectivos de iões (ISE) ou eléctrodos selectivos de gases dissolvidos [66].
- Impedimétrica ou condutimétrica, que se baseia na aplicação de uma perturbação (pequena) do potencial aplicado, da corrente aplicada, etc. A resposta à perturbação aplicada, pode diferir em fase e amplitude à do sinal aplicado e a medição da diferença fase/amplitude permite analisar o processo que ocorre na superfície do eléctrodo [67].

3) A forma de monitorização de reacção:

- directa, em que é determinada a concentração de analito ou as reacções que produzem/consomem o analito.
- indirecta, que se baseia na determinação do inibidor ou activador do elemento biológico de reconhecimento

Os biossensores electroquímicos que deram origem ao número mais elevado de dispositivos para POCT (*point-of-care testing*), são baseados na monitorização de transferência de electrões, pertencentes à categoria dos sensores amperométricos.

Tem que ser tido em consideração que ao trabalhar com amostras reais somos confrontados com uma matriz analítica bastante complexa. Assim sendo, existe a grande possibilidade de haver mais de um composto a ser oxidado ou reduzido para o potencial de operação utilizado. Nestas circunstâncias, a enzima vai actuar como um catalisador ao mesmo tempo que reage selectivamente com o analito.

O acoplamento oxido-redutase e reacções enzimáticas desidrogenase nos eléctrodos têm sido uma abordagem atrativa para desenvolvimento de arquitecturas de biossensores e,

recentemente, tem havido um sucesso comercial considerável para sensores de glucose (especialmente para fins médicos, mas também na indústria de alimentos). Depois de glucose, o lactato é o analito mais estudado, mas ainda vem num longínquo segundo lugar. Apesar de milhares de publicações sobre diversos analitos (glutamato, piruvato, aminoácidos, colina, etc.), esta tecnologia ainda necessita de ser melhorada para alcançar uma maior eficiência e correspondente sucesso comercial [64]. A técnica electroquímica típica utilizada quando se trabalha com biossensores baseados em transferência de electrões é a cronoamperometria (ou amperometria a potencial fixo). A técnica é explicada em mais detalhe na secção 1.6.2.2.

Existem 3 configurações diferentes para biossensores amperométricos:

- sensor de utilização única
- sensor de uso intermitente
- sensor de uso contínuo

O biossensor de uso único representa 99% das aplicações comerciais, como por exemplo as fitas para a determinação de glucose no sangue disponíveis nas farmácias. As fitas são compostas por dois ou três eléctrodos, alguns são malha impressa e outras películas metálicas. Num tempo fixo após a reacção ter sido iniciada, é aplicado um potencial e a corrente devido à oxidação de glucose é medida sendo posteriormente convertida em unidades de concentração para serem observadas pelo utilizador.

Biossensores oferecem várias vantagens sobre a análise diagnóstica convencional. Eles incluem a especificidade para o analito alvo, a velocidade na obtenção de um resultado, a capacidade para monitorização contínua e multiplexagem, juntamente com a potencialidade de acoplamento para baixo custo, instrumentação portátil e a sua simplicidade de utilização, no ponto de vista do utilizador não qualificado.

1.4. Enzimas

Enzimas, como catalisadores de uma reacção, são um elemento chave na composição de um biossensor. Nesta secção é fornecida alguma informação geral sobre enzimas, o seu mecanismo e a sua cinética. A enzima glucose oxidase (GOx), que é usada como enzima modelo em diversos biossensores e utilizada neste trabalho vai ser sujeita a uma breve descrição. Os processos que envolvidos na inibição enzimática também vão ser explorados.

1.3.1. Conceitos gerais e funções

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reacções biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido à sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores produzidos pelo homem. Praticamente todas as reacções que caracterizam o metabolismo celular são catalisadas por enzimas e com a excepção de um pequeno grupo de moléculas catalíticas de RNA (ribozimas), todas as enzimas são proteínas.

As enzimas são biocatalizadores com uma estrutura tridimensional muito complexa que se formam dobrando uma cadeia linear de polipeptídeos. Uma molécula enzimática é constituída por duas partes, um revestimento proteico e um centro activo. A proteína contém sitios de ligação que são essenciais para a ligação do analito e, consequentemente, para a selectividade da enzima. A sua actividade catalítica está dependente da integridade da conformação da proteína nativa. Se a enzima está desnaturada ou dissociada em subunidades, a actividade catalítica vai ser perdida. Algumas enzimas, para apresentarem actividade, não necessitam da presença de nenhum grupo químico, para além dos seus resíduos de aminoácidos. Por outro lado outras precisam de um componente químico adicional denominado por cofactor (Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} e Zn^{2+}) [68]. Se o composto redox adicional é um complexo orgânico ou uma molécula metaloorgânica, é denominado por coenzima [69].

Alguns cofactores sofrem transformações químicas durante uma reacção, podendo ser oxidados ou reduzidos. De qualquer forma, como catalisador, o cofactor é regenerado,

voltando ao estado inicial no percurso de um ciclo catalítico. Ao contrário das coenzimas, eles não são consumidos [70].

A denominação de uma enzima é dada tendo em consideração as reacções que elas catalisam. A maioria designa-se pela adição do sufixo "-ase" ao nome do substrato ou a uma palavra ou frase descritiva da sua actividade [71]. Devido à necessidade da existência de uma normalização utiliza-se a classificação de enzimas e os nomes recomendados pelo Comité de Nomenclaturas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB) de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC).

Tabela 1.2 - Classificação de enzimas.

Nr.	Classe	Tipo de reacção que catalisa
1	Oxidorredutase	transferência de electrões (iões hidreto ou átomos de H)
2	Transferase	transferência de grupos químicos de um composto para outro
3	Hidrolase	reacções de hidrólise (transferência de um grupo funcional para a água)
4	Liase	adição de grupos para ligações duplas ou formação de ligações duplas através da remoção de grupos
5	Isomerase	transferência de grupos dentro das moléculas para manter formas isoméricas
6	Ligases	formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reacções de condensação (precisam de energia que é normalmente fornecia pela adenosina trifosfato (ATP))

1.4.2. Cinética e mecanismos enzimáticos

A cinética enzimática estuda as reacções químicas catalisadas pelas enzimas, em especial a velocidade de reacção [72]. O estudo da cinética de uma enzima permite elucidar os pormenores do seu mecanismo catalítico, o seu papel no metabolismo, como é controlada a sua actividade na célula e como pode ser inibida a sua actividade através de fármacos ou venenos, ou potenciada por outro tipo de moléculas.

Uma reacção enzimática ocorre no denominado centro-activo de uma enzima (Fig. 1.7), onde uma enzima (E) se liga a um substrato (S) para formar um complexo enzima substrato (ES). Normalmente o sítio activo envolve completamente a molécula substrato (S), "sequestrando-a" completamente da solução. O complexo ES forma-se quando os ligandos se ligam não covalentemente ao centro activo. Este complexo é fundamental na acção enzimática e o ponto de partida para tratamentos matemáticos e descrições teóricas que visam descrever a cinética das reacções catalisadas por enzimas bem como os mecanismos que as envolvem. Embora a maioria das reacções enzimáticas tenham dois ou mais substratos, os princípios gerais podem ser descritos assumindo o caso mais simples de um substrato e de um produto (P).

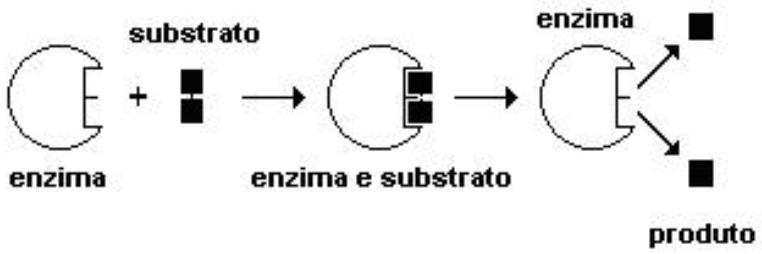


Figura. 1.7 - Esquema das mudanças conformacionais que ocorrem durante uma reacção enzimática.

Uma reacção enzimática é relativamente lenta e pode ser descrita da seguinte forma [73]:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \overset{k_2}{\rightarrow} E + P \tag{1.2}$$

a formação do complexo é reversível, enquanto a reacção do produto com a enzima para a formação de ES é praticamente impossível devido à baixa afinidade de ligação do produto com a enzima. No início da reacção, as concentrações de ES e P aumentam e a concentração de enzima livre vai diminuir. Decorrido algum tempo, [ES] e [E] são constantes enquanto a concentração de P aumenta e a concentração de S continua a diminuir. Numa reacção típica, a concentração de S pode ser de cinco ou seis ordens de grandeza maior que a concentração da enzima. A velocidade inicial da reacção, v_0, pode ser medida como função de [S]. O efeito da variação de [S] sobre v_0 quando a concentração da enzima é mantida constante pode ser observado na Fig. 1.8. Para concentrações relativamente baixas de S, observa-se que v_0 aumenta de uma maneira quase linear com o aumento de [S]. Para concentrações de S altas, v_0 apresenta incrementos cada vez mais pequenos com o aumento de [S], até chegar a um ponto em que não se observa qualquer aumento de v_0 com o aumento de [S]. A este ponto denomina-se velocidade máxima, v_{max}.

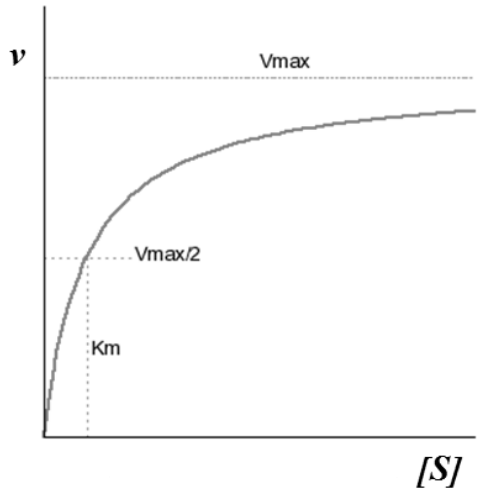


Figura 1.8 - Curva de resposta de tipo Michaelis-Menten.

Em 1913 Leonor Michaelis e Maud Menten postularam que primeiramente a enzima combina com o substrato de formando o complexo enzima substrato, num passo reversível e relativamente rápido:

$$S + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad (1.2)$$

que em seguida, se decompõe (cinética mais lenta) para se obter a enzima livre e o produto da reacção P:

$$\mathrm{ES} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} \mathrm{P} + \mathrm{E} \tag{1.3}$$

Uma vez que o segundo passo limita toda a reacção, a velocidade da reacção terá que ser proporcional à concentração das espécies que reagem no segundo passo, ou seja, o complexo ES.

A equação de Michaelis-Menten é derivada usando a suposição do estado estacionário. A partir de (1.2) e (1.3) vem:

$$\mathrm{S} + \mathrm{E} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathrm{ES} \xrightarrow{k_2} \mathrm{P} + \mathrm{E} \tag{1.4}$$

e v_0 é dada por:

$$v_0 = k_2[\mathrm{ES}] \tag{1.5}$$

As velocidades de formação e dissociação de [ES]:

$$\text{Formação de ES} = k_1([\mathrm{E_t}] - [\mathrm{ES}])[\mathrm{S}] \tag{1.6}$$

$$\text{Dissociação de ES} = k_{-1}[\mathrm{SE}] + k_2[\mathrm{ES}]] \tag{1.7}$$

são iguais no estado estacionário, logo:

$$k_1([\mathrm{E_t}] - [\mathrm{ES}])[\mathrm{S}] = k_{-1}[\mathrm{ES}] + k_2[\mathrm{ES}] \tag{1.8}$$

$$[\mathrm{ES}] = \frac{k_1[\mathrm{E_t}][\mathrm{S}]}{k_1[\mathrm{S}] + k_{-1} + k_2} \tag{1.9}$$

$$[\mathrm{ES}] = \frac{[\mathrm{E}_t][\mathrm{S}]}{[\mathrm{S}] + (k_{-1} + k_2)/k_1} \tag{1.10}$$

$(k_2 + k_{-1})/k_1$ é definido como a constante Michaelis – Menten, K_M, logo:

$$[\mathrm{ES}] = \frac{[\mathrm{E_t}][\mathrm{S}]}{[\mathrm{S}] + K_\mathrm{M}} \tag{1.11}$$

Tendo em consideração $v_{\max} = k_2[\mathrm{E_t}]$, e uma vez que a velocidade máxima ocorre quando a enzima se encontra saturada: $[\mathrm{ES}] = [\mathrm{E_t}]$, a velocidade inicia da reacção, v_0 é:

$$v_0 = \frac{v_{\max}[\mathrm{S}]}{[\mathrm{S}] + K_\mathrm{M}} \tag{1.12}$$

A equação de Michaelis-Menten é uma indicação da relação quantitativa entre a velocidade inicial, v_0, a velocidade máxima v_{max}, e a concentração inicial de substrato [S], todos relacionados através da constante de Michaelis (K_M). Uma importante relação numérica emerge a partir da equação de Michaelis-Menten, no caso especial, quando v_0 é exactamente igual a $v_{max}/2$ (Fig. 1.5). então:

$$\frac{v_{\max}}{2} = \frac{v_{\max}[\mathrm{S}]}{[\mathrm{S}] + K_\mathrm{M}} \Leftrightarrow \frac{1}{2} = \frac{[\mathrm{S}]}{[\mathrm{S}] + K_\mathrm{M}} \tag{1.13}$$

Logo, K_M = [S] quando $v_0 = v_{\max}/2$, é uma forma fácil de estimar a K_M a partir de gráficos da resposta *vs.* concentração do substrato.

A equação de Michaelis-Menten pode ser transformada algebricamente em versões que são úteis na determinação de K_M e $v_{\max}$. Uma transformação comum é alcançada tomando simplesmente em consideração o recíproco de ambos os lados da equação de Michaelis-Menten [74]:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_\mathrm{M}}{[\mathrm{S}]}\frac{1}{v_{\max}} \tag{1.14}$$

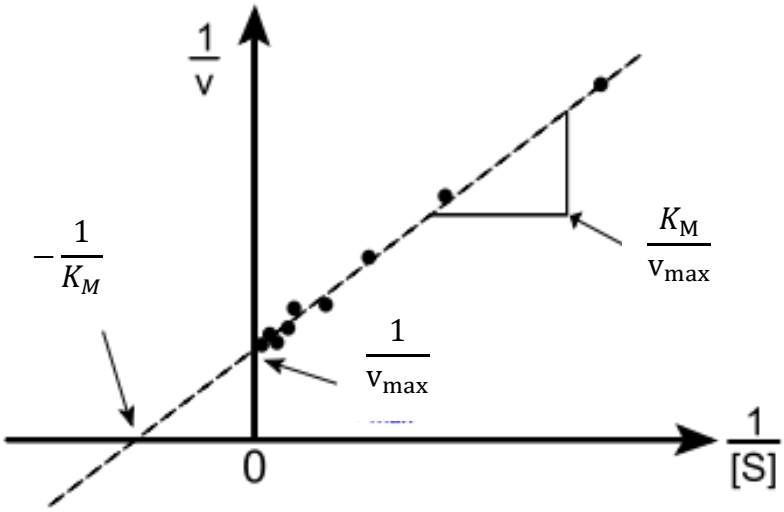


Figura 1.9 – Representação do tipo Lineweaver-Burk

A representação de Lineweaver-Burk é muito útil para a determinação de K_M e v_{max} no caso dos biossensores que apresentam um comportamento descrito pela equação de Michaelis-Menten.

1.4.4. Glucose Oxidase

A enzima glucose oxidase pertence a classe das oxidoredutases que actua sobre o grupo CH-OH e tem o oxigénio como aceitador de electrões [72]. Glucose oxidase é uma enzima pequena e estável que oxida a glucose em gluconolactona, convertendo oxigénio em peróxido de hidrogénio no processo (Fig. 1.9). A sua elevada estabilidade, relativamente a muitas outras enzimas oxidase faz com que seja utilizada como enzima-modelo para testar novas arquitecturas de biossensores enzimáticos. A sua função biológica normal parece ser centrada no peróxido que é formado: peróxido de hidrogénio é um composto tóxico que pode ser usado para destruir as bactérias. Por exemplo, a glucose oxidase é encontrada na superfície de fungos, onde ajuda a proteger contra a infecção bacteriana, e é também encontrada no mel, onde actua como um conservante natural. É uma proteína dimérica produzida predominantemente pelos fungos da espécie *Aspergillus* e *Penicillium* ee oxida a *β*-D-glucose usando outros substratos oxidantes para além de oxigénio molecular.

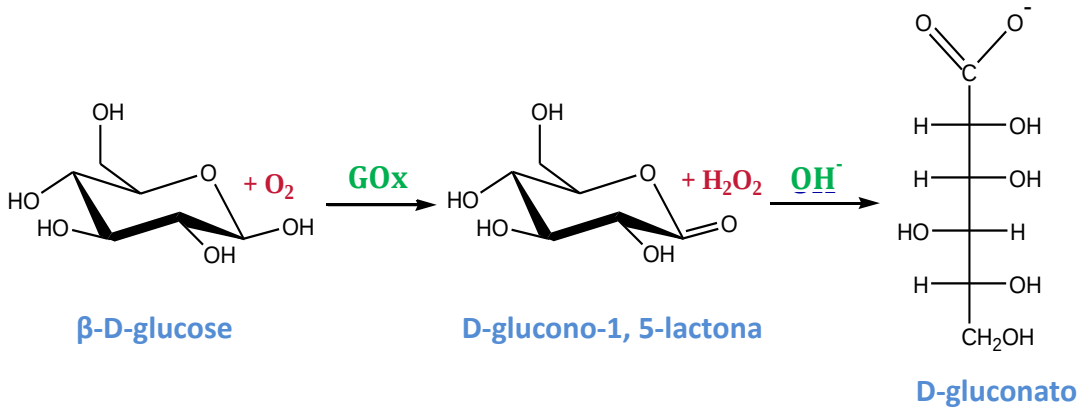


Figura 1.9 - Oxidação de glucose catalisada pela GOx;
o O_2 tem o papel de aceitador de electrões.

Cada monómero tem uma forma esférica compacta com as dimensões de aproximadamente 60Å x 52Å x 37Å e contém uma molécula de FAD e cerca de 74 % de proteínas e 2 0% de hidratos de carbono, dos quais 80 % são representados por manose.

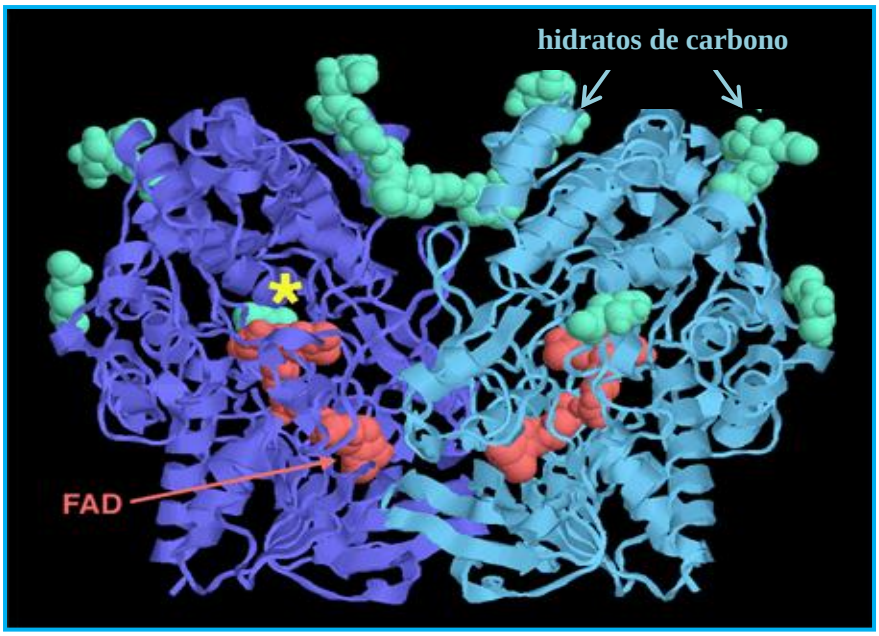


Figura 1.10 - Estrutura 3-D de glucose oxidase; adaptado de [75].

Os monómeros estão ligados não-covalentemente através de uma área de contacto estreita e longa, mas cada um deles são esferóides compactos com dimensões aproximadas [76]. Cada subunidade, ou monómero, dobra em dois domínios: um domínio liga-se ao substrato, β-D-glucose, enquanto o outro domínio liga-se não-covalentemente a um cofactor, flavina-adenina-dinucleótido (FAD), que utiliza como um poderoso agente oxidante. FAD é um componente comum em reacções biológicas redox e em glucose oxidase o FAD actua como um aceitador de electrões, que faz com que seja reduzida a $FADH_2$; a forma reduzida $FADH_2$ é então oxidada pelo aceitador de electrões final [76].

A glucose oxidase apresenta uma especificidade muito alta para o seu substrato, enquanto para o aceitador de electrões esta enzima apresenta uma certa flexibilidade. O oxigénio que é o aceitador natural pode ser substituído por outros aceitadores, chamados aceitadores artificiais ou mediadores.

1.4.4. Imobilização enzimática

No seu habitat natural, que é o interior da célula, e onde apresentam as suas maiores actividades catalíticas, as enzimas actuam como catalisadores heterogéneos, ou seja, na forma pouco solúvel. Baseados neste facto, pesquisadores resolveram mimetizar esta situação, através da ligação da enzima a um material inerte por meio de métodos físicos e/ou químicos. A técnica da imobilização, embora já tentada em 1916 por Nelson e Griffin [77] (imobilização da invertase em carvão activo), adquiriu impulso a partir dos anos 60. Evoluiu tanto que várias enzimas imobilizadas são encontradas no comércio actualmente. A glucose isomerase imobilizada (Sweetzyme R) – só para citar um exemplo - é usada na produção do xarope de frutose a partir de glucose oriunda da hidrólise do amido. Além das enzimas, imobilizam-se, também, células, organelos e fármacos. A imobilização eficaz de proteínas/enzimas sobre substratos sólidos, sem alterar a sua conformação original e bioactividades é altamente desejada tanto para o desenvolvimento de diversas bio-arquitecturas (por exemplo biossensores electroquímicos) como para uma melhor compreensão do seu mecanismo de actividade. A habilidade de estabilizar e voltar a usar um catalisador de enzima através da imobilização provou ser um dos principais passos para tornar um processo enzimático economicamente viável. Tendo em consideração a definição de biossensor, o seu ponto crítico é o contacto directo entre o receptor e o transdutor, e esta exigência vai influenciar muito o desenvolvimento de um biossensor. Assim sendo, na imobilização de uma enzima a uma superfície, tal como um eléctrodo, modificado ou não, é fundamental a escolha de um método de fixação que irá evitar a perda de actividade da enzima com especial cuidado para não mudar a natureza química ou grupos reactivos no local de ligação da enzima.

1.4.4.1. Adsorção física

A adsorção física é o método mais simples e o mais empregado para imobilização de enzimas. Nesse caso, o biocatalisador é estabilizado por interacções fracas com o suporte como forças de van der Waals (interacções hidrofóbicas), pontes de hidrogénio e ligações iónicas [78, 79]. Os factores principais que influenciam a adsorção são:

- a força iónica: aumentando a força iónica a enzima é libertada uma vez que os iões inorgânicos ligam-se com mais força ao suporte do que à enzima;
- o pH do meio: uma vez que controla o número e a natureza das cargas presentes na superfície da proteína e do sólido;
- a presença de iões: que podem actuar como cofactores da enzima, uma vez que podem aumentar a carga enzimática do derivado;
- o diâmetro dos poros: que devem ter um tamanho duas vezes maior do que o eixo principal da enzima.

As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo e, além disso, o facto da estrutura conformacional da enzima ser pouco alterada. A grande desvantagem é a desadsorção da enzima devido às variações de temperatura, pH e força iónica [80].

1.4.4.2. Reticulação

A imobilização de enzimas pode ser conseguida por ligação covalente intermolecular da proteína através de grupos funcionais dos agentes de ligação cruzada. Estes agentes contêm pelo menos dois grupos funcionais que são reactivos relativamente a outros grupos pertencentes enzima, tais como sulfidrilos e aminas, e desta forma vão formar ligações químicas covalentes entre ambos. Reticuladores podem ser classificados como homobifuncionais ou heterobifuncionais. Reticuladores homobifuncionais têm grupos reactivos idênticos em cada extremidade de um braço espaçador, e geralmente devem ser utilizados em procedimentos de polimerização, como é o caso neste trabalho do glutaraldeído [81]. Os grupos funcionais que podem ser orientados com agentes de reticulação são aminas primárias, carboxilos e sulfidrilos, hidratos de carbono e ácidos carboxílicos. As moléculas proteicas apresentam muitos grupos funcionais deste tipo e por conseguinte, as proteínas e os péptidos podem ser prontamente conjugados utilizando agentes de ligação cruzada. Aminas primárias ($-NH_2$) existem na extremidade N-terminal de cada cadeia polipeptídica (α-amina) e na cadeia lateral de resíduos de lisina (ε-amina). Devido à sua carga positiva em condições fisiológicas, as aminas primárias são geralmente virados para o exterior (isto é, na superfície exterior) de proteínas, assim, eles são

geralmente acessíveis para a conjugação sem desnaturação da estrutura da proteína. Geralmente os reticuladores induzem um ataque nucleofílico do grupo amino de lisina, de proteínas, e subsequente ligação covalente através da ligação cruzada, tal como descrito no esquema em baixo (Fig.1.11), onde o agente de reticulação é o glutaraldeído [82].

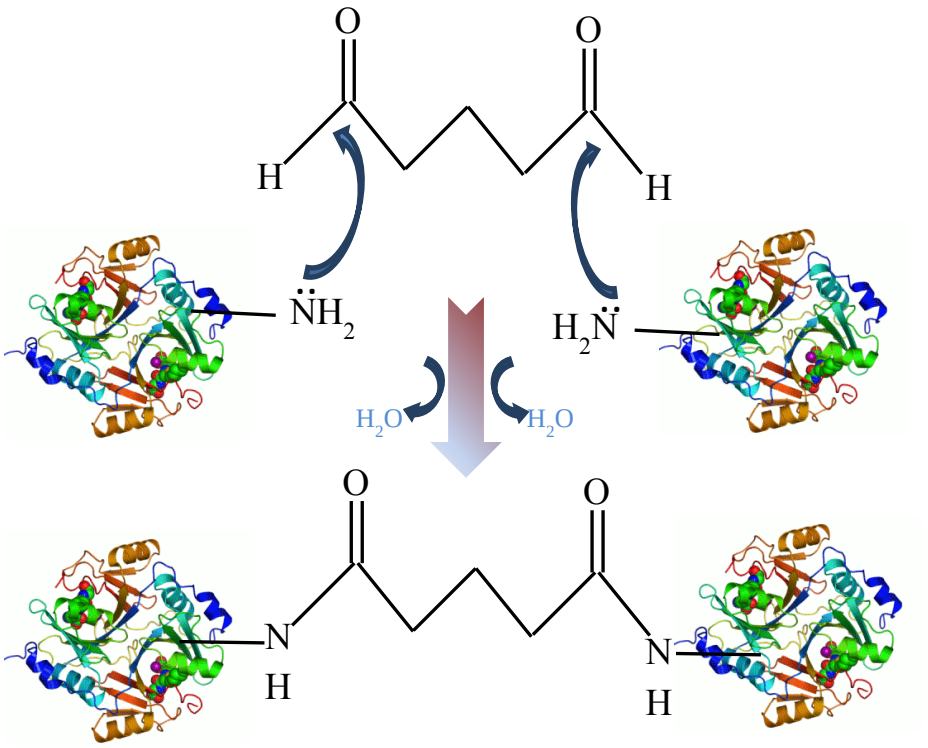


Figura 1.11 – Esquema de uma reacção de reticulação entre duas proteínas com GA.

O pH da solução pode influenciar a actividade global da enzima uma vez que as enzimas têm uma estrutura nativa terciária que é sensível ao pH (tal como as proteínas naturais), que faz com que seja possível que ocorra a desnaturação das mesmas a pH extremos. Desta forma, a fim de se tentar manter a estrutura nativa do complexo de proteína, é frequente proceder-se ao processo de reticulação em pH neutro e em condições de tampão. Além disso, razões estequiométricas optimizadas de reticulador-proteína devem ser determinadas, bem como o número de grupos funcionais na superfície da proteína.

1.4.5. Inibição enzimática

Um grande número de substâncias pode inibir a actividade enzimática. Algumas dessas substâncias são constituintes da célula e outras são estranhas, levando com a sua presença a alterações significativas do metabolismo. Quando o inibidor é produzido pela própria célula, a variação na sua concentração vai ser muito empregado pela própria célula como uma forma de controle da velocidade das reacções. Esse mecanismo vai possibilitar ao organismo responder a diferentes condições fisiológicas. Um inibidor (I) [72] é um composto que se liga à uma enzima e interfere na sua actividade impedindo quer a formação do complexo ES quer a sua passagem para E + P. Os inibidores são utilizados experimentalmente para investigar o mecanismo de actuação das enzimas e decifrar o seu trilho metabólico. Os inibidores naturais regulam o metabolismo, e muitas drogas são inibidoras enzimáticas.

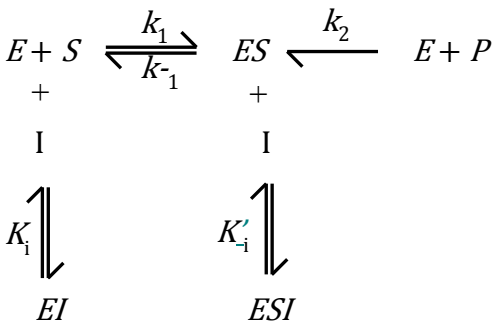
A inibição pode ser irreversível ou reversível:

- inibidores irreversíveis estão ligados à enzima através de ligações covalentes;
- inibidores reversíveis ligam-se às enzimas através do mesmo tipo de forças não-covalentes que se ligam os substratos e os produtos.

No caso da inibição reversível a actividade enzimática pode ser restabelecida removendo o inibidor, enquanto para uma inibição irreversível, a perda de actividade aumenta com o tempo e não pode ser recuperada num intervalo de tempo útil.

Se a enzima inibida fica totalmente inactiva, a inibição é irreversível e pode actuar causando a perda gradual da concentração enzimática (acontece a velocidade baixas v_{max}) ou em outros casos a inactivação é incompleta e com o tempo pode haver alterações do K_M e v_{max}.

A seguir serão apresentados em termos de extensão simples do esquema de reacção Michaelis-Menten o efeito dos inibidores reversíveis nos processos catalisados por enzimas:



(1.15)

onde I representa o inibidor reversível e as constantes de inibição K_i e K_i' são dadas por:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \tag{1.16}$$

$$K'_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \tag{1.17}$$

Partindo-se do pressuposto que EI e ESI não reagem para formar produtos, existe equilíbrio entre EI e ESI:

$$EI + S \rightleftharpoons E + S + I \rightleftharpoons ES + I \rightleftharpoons ESI \tag{1.18}$$

A forma de ligação dos inibidores com a enzima está dependente do pH da solução, o que vai resultar na variação independente de K_i e K_i´ com este mesmo pH, sendo assim, e de forma a simplificar este processo, supõe-se que a velocidade de formação do produto é mais lenta relativamente ao estabelecimento do equilíbrio entre as espécies.

Neste caso:

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1}\frac{[E][S]}{[ES]} \tag{1.19}$$

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{[ES]}{[E]_0} \tag{1.20}$$

onde:

$$[E]_0 = [E] + [EI] + [ES] + [ESI] \tag{1.21}$$

Reorganizando as equações, temos:

$$v = \frac{v_{max}\,[S]}{K_M\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \tag{1.22}$$

Se a concentração total de enzima for menor que a concentração total de inibidor ($[E]_o << [I]_o$) então:

$$v = \frac{v_{max}\,[S]}{K_M\left(1 + \frac{[I]_0}{K_i}\right) + [S]\left(1 + \frac{I_0}{k_i}\right)} \tag{1.23}$$

Esta equação é geralmente usada em situações de inibição mista envolvendo tanto EI como ESI. Existem ainda outros tipos simplificados para a inibição reversível: competitiva, anti competitiva e não-competitiva [72, 83]. A inibição mista é um caso especial de inibição não-competitiva. Os três tipos de inibição reversível podem ser distinguidos experimentalmente pelos seus efeitos na cinética enzimática, como vem resumido na Tabela 1.3:

Tabela 1.3 – Os efeitos da inibição reversível relativamente às constantes cinéticas

Tipo de inibição	**Efeito**
Competitiva (I liga-se só à E)	Aumenta K_M v_{max} fica inalterado
Anticompetitiva (I liga-se só à ES)	Diminui v_{max} e K_M A razão v_{max} / K_M fica inalterada
Não-competitiva (I liga-se quer a E quer a ES)	Diminui v_{max} K_M fica inalterado

Na inibição competitiva o inibidor só se pode ligar à molécula de enzima que ainda não se ligaram aos outros compostos. é importante salientar que estes inibidores são os mais frequentes. Quando um inibidor competitivo se liga à uma enzima, o substrato já não se pode ligar à esta enzima, a ligação do substrato à enzima impede a ligação do inibidor. Existem também inibidores que se ligam a outros sitios, embora exibam um tipo de inibição competitiva.

Quando o substrato e o inibidor estão presentes na solução a fracção de enzima que forma o complexo ES depende das afinidades relativas de enzima para o S e para o I e da concentração de cada um destes na solução.

A formação de EI pode ser invertida aumentando a concentração de S. Para concentrações suficientemente elevadas de S a saturação de E com S pode ser alcançada. Neste caso a velocidade máxima é a mesma na presença e na ausência do inibidor. Quanto mais inibidor estiver presente na solução, mais substrato é preciso para atingir meia-saturação. Como a concentração do substrato para atingir meia-saturação corresponde ao K_M então na presença do inibidor competitivo, K_M aumenta. O novo valor é normalmente referido como K_M^{app}.

Os inibidores anticompetitivos ligam-se somente ao ES e não à enzima livre. Na inibição anti competitiva ν_{max} diminui devido à conversão de algumas moléculas de E para a forma inactiva ESI. Uma vez que o complexo ES é o que se liga ao I, a diminuição de ν_{max} não pode ser invertida pela adição de mais substrato. Os inibidores anti competitivos também diminuem o K_M porque o equilíbrio para a formação de ES e ESI é deslocado para a formação dos complexos através da ligação com I.

Os inibidores não competitivos ligam-se tanto à E como à ES formando os complexos EI e ESI, respectivamente. Estes inibidores não são análogos do substrato e não se ligam ao mesmo sítio na enzima. O efeito desta inibição é, efectivamente, a titulação do E e ES com I, ou seja a remoção das moléculas enzimáticas activas da solução. A inibição não-competitiva é rara, mas existem alguns exemplos para as enzimas alostéricas. Nestes casos, o inibidor não-competitivo altera, muito provavelmente, a conformação de enzima atribuindo-lhe uma forma que ainda permite a ligação do substrato, mas fazendo com que a enzima não catalisa mais reacções e (este tipo de inibição não pode ser ultrapassada pela adição de substrato).

Existem diversas publicações sobre os efeitos biológicos causados por metais pesados [84-85], onde estes metais, usualmente na forma de catiões, têm uma contribuição importante na poluição ambiental devido ao envolvimento em muitos processos naturais e industriais. A determinação deste em materiais biológicos, águas naturais, solo e ar torna-

se muito importante uma vez que o meio ambiente é muito vulnerável a este tipo de poluente [85].

Os biossensores oferecem a possibilidade de medições rápidas sem perda de tempo com procedimentos de purificação e fragmentação dos compostos. Biossensores com diversas configurações foram desenvolvidos para a determinação de metais, nomeadamente biossensores enzimáticos [86].Estes biossensores baseados na inibição são muito sensíveis na determinação do inibidor em comparação com a determinação do substrato enzimático [87] e apresentam um limite de detecção muito mais baixo do que o valor máximo admissível em amostras ambientais ou clinicas, sendo ainda mais baixo do que os obtidos através dos métodos tradicionais como a cromatografia ou a espectrometria [88].

1.5. Mediadores redox e polímeros condutores

Polímeros condutores são uma classe relativamente nova e independente de materiais orgânicos. Quando expostos a determinadas soluções electrolíticas estes materiais exibem simultaneamente condutividade electrónica e iónica. A existência da condutividade electrónica foi provada para o caso do poliacetileno [86]. Contudo, o estudo intensivo de polímeros electroactivos, apenas começou depois da descoberta da electropolimerização do pirrol [90] e da anilina [91]. Desde então a electropolimerização tem mostrado ser uma ferramenta extremamente poderosa para o desenvolvimento e modificação de eléctrodos [92]. Normalmente materiais electropolimerizados possuem propriedades únicas que não são características dos monómeros correspondentes [93].

1.5.1. Fenazinas

A formação de polímeros redox a partir da redução ou oxidação de diferentes compostos orgânicos tornou-se um importante tópico de estudo após a descoberta dos polímeros condutores. Entre estes compostos, as azinas representam um grupo que já

demonstrou um uso diverso como indicador e mediador redox em diversos ramos da bioquímica e bioelectroquímica.

As fenazinas são corantes aromáticos definidos pela seguinte fórmula:

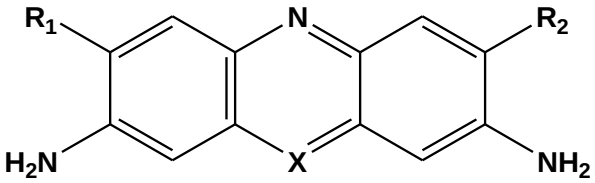


Figura 1.12 – Estrutura das fenazinas

onde o X=N, S, O para fenazinas, fenotiazinas e fenoxazinas respectivamente [94].

A fenazina vermelho neutro (NR - *neutral red*), Fig. 1.12, tem tido várias utilizações: marcador biológico [95], investigação de vírus [96], indicador de pH em sistemas bioquímicos [97], determinação de RNA através de métodos ópticos ou electroquímicos [98], mediador redox para a determinação de glucose, lactato e hipoxantina [99] entre outros.

Bartels observou que o comportamento electroquímico e fotoelectroquímico do vermelho neutro estavam fortemente dependentes do pH [100], e propôs quatro possíveis protonações. Estudando a dependência do pH do espectro de absorção ele afirmou que elas podem ocorrer por ordem de dificuldade no N_5, no N_{10} e também no grupo amina. Tendo em consideração este estudo, bem como outros, Halliday e Matthews concluíram que a protonação do NR e leuco-NR (NRH_2) depende do pH [101].

Devido à instabilidade dos radicais que se formam com a oxidação do leuco-vermelho neutro [102] estes levam à formação de oligómeros e polímeros [103].

$0,5 \leq pH \leq 4,4$ $\quad NRH^+ + 3H^+ + 2e^- \leftrightarrow NRH_4^{2+}$

$4,4 \leq pH \leq 6,3$ $\quad NRH^+ + 2H^+ + 2e^- \leftrightarrow NRH_3^{2+}$

$6,3 \leq pH \leq 6,7$ $\quad NRH^+ + H^+ + 2e^- \leftrightarrow NRH_2$

$6,7 \leq pH \leq 11,5$ $\quad NR + 2H^+ + 2e^- \leftrightarrow NRH_2$

As fenazinas mais utilizadas em aplicações electroquímicas na forma do polímero são: vermelho neutro (NR) [102], azul de metileno (MB) [104], verde de metileno (MG) [105], Azul de Nilo (RN) [106], azul de cresil brilhante (BCB) [107], safranina T (ST) [108], azul de toluidina (TB) [109] e tionina (Thi) [110].

Os monómeros fenazínicos que contêm grupos amino primário como substituintes do anel aromático são capazes de libertar um protão por oxidação, produzindo um catião radical (Fig. 1.13) que vai ser responsável pela directa electropolimerização do monómero, formando então o correspondente filme polimérico semicondutor [94].

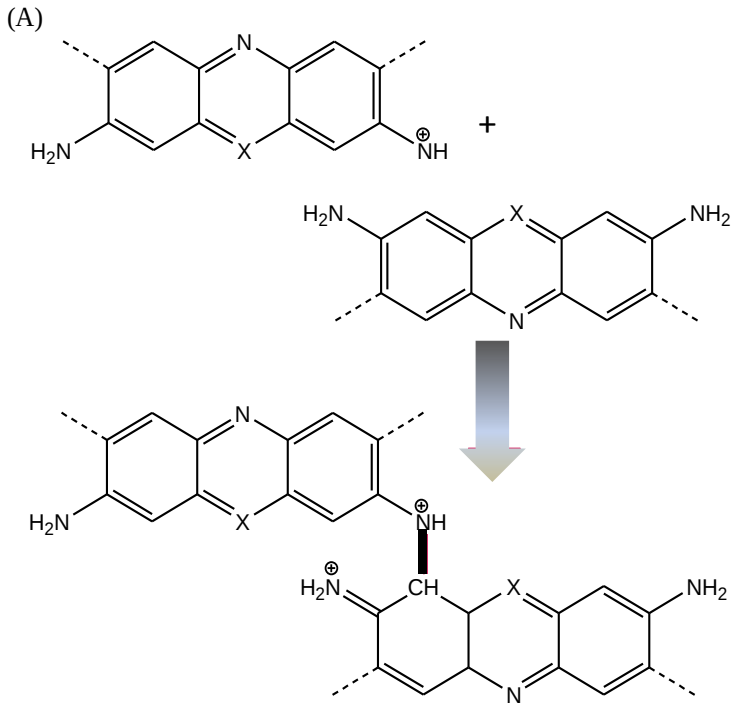


Figura 1.13 - Possível mecanismo para a polimerização do NR

A formação deste radical catião inicia o processo de polimerização levando à formação do polímero através da ligação C-N como se observa na Fig. 1.13. De salientar que o número de radicais formados, determina a estrutura do polímero: um grande número de radicais significa que se obterá um polímero ramificado.

Ao contrário do seu precursor (NR), o poli (vermelho neutro) apresenta uma grande resistência mecânica e é fortemente adsorvido na superfície do eléctrodo [111-113] tendo

por isso mesmo sido usado como mediador redox em sensores para a determinação de diversos analitos: glucose e piruvato [114], ácido ascórbico [115] e para catalisar a redução electroquímica de NAD^+ [116].

1.5.2 PEDOT

Poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) em semelhança com o PNR é um polímero conjugado, electricamente condutor que combina excelente condutividade [117] com biocompatibilidade [118]. O PEDOT é quimicamente estável na sua forma oxidada e relativamente insensível a mudanças de pH, podendo formar filmes relativamente finos quase transparentes [117]. Estas características únicas fazem do PEDOT um material muito desejável e nos últimos 25 anos tem sido estudado e aplicado numa diversa variedade de domínios, incluindo painéis solares [119], dispositivos orgânicos de emissão de luz [120], desenvolvimento de camadas protectoras contra a corrosão [121] e numa área mais relevante a este trabalho, sensores bioquímicos [122, 123].

Geralmente a electrossíntese do PEDOT é efectuada a partir da oxidação do monómero correspondente, seja química ou electroquimicamente. Deste modo filmes com diferentes morfologias que apresentam ligeiras diferenças nas propriedades físicas ou químicas têm sido desenvolvidos [124-126]. Quando comparado com o politiofeno não substituído, o PEDOT oferece diversas vantagens. De facto a introdução do substituinte etilenodioxi nas posições 3 e 4 do anel impede as ligações α-β durante o processo de polimerização e fazem com que o polímero resultante seja melhor definido regioquimicamente [127]. Para além do mais, a presença do substituinte baixa os potenciais de oxidação do monómero e do polímero em formação, estabilizando o seu estado oxidado [117].

O monómero EDOT é praticamente insolúvel em água [128] e as moléculas de água inibem a polimerização deste monómero devido à reacção das moléculas de água com os radicais catiónicos tienil, que é a espécie precursora durante a polimerização [129]. Apesar deste inconveniente, a água continua ser preferida como solvente em vez de solventes orgânicos [130, 131], por razões tanto económicas como ambientais e muitos

investigadores têm direccionado a sua investigação no sentido de tentar elucidar as diferentes etapas do processo de polimerização ou as propriedades físico-químicas do PEDOT em meio aquoso. Estes estudos incluem maioritariamente o uso de tensioactivos aniónicos [132], catiónicos [133] e não iónicos [134].

Resultados particularmente interessantes têm sido obtidos quando o polímero é sintetizado na presença do polielectrólito poli(estireno-4-sulfonato ($(PSS)_{n-}$) formando-se um compósito onde o (PSS)n− polianião é incorporado no polímero de forma a compensar a carga positiva do PEDOT. O sistema PEDOT-PSS (Fig. 1.14) provou produzir filmes e sistemas microestruturados com electroquímica de cinética rápida, alta condutividade iónica [135], boa estabilidade electroquímica [136] e uma capacitância adequada para uso prático em supercondensadores electroquímicos [137].

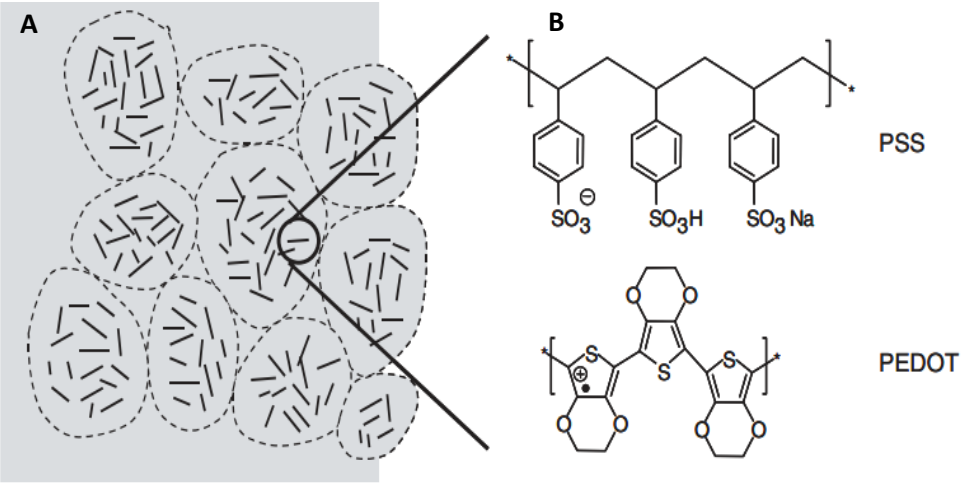


Figura 1.13 – A) Morfologia de um filme fino de partículas de PEDOT:PSS visto de cima, rodeado por uma camada fina rica em PSS. Cadeias de PEDOT estão representadas como pequenas barras; B) Estrutura química das espécies presentes no filme; adaptado de [140].

Além disso, PEDOT:PSS foi testado como eléctrodo compósito, demonstrando boa capacidade anti-envenenamento para a oxidação de fenóis e clorofenóis, melhorando também a sensibilidade [138] e selectividade do eléctrodo [139]. Como foi mencionado anteriormente, a selecção do contra-ião para a deposição de PEDOT é de extrema importância, e esta escolha afecta tanto as propriedades eléctricas como morfológicas do filme.

1.5.3 Hexacianoferratos metálicos

A história dos hexacianoferratos apesar de marcante e de se estender por três séculos, como tantos grandes avanços da química, aconteceu fortuitamente quando o fabricante de tintas alemão Diesbach descobriu acidentalmente o azul de Prússia (PB – "*Prussian Blue*") em 1704.

O pigmento PB foi obtido na reacção entre o complexo aniónico $Fe(CN)_6^{4-}$ e o catião Fe^{3+} e é o primeiro composto de coordenação a ser mencionado em literatura de carácter científico [141].

Apesar da aplicação contínua de PB e de outros hexacionoferratos (MHCF), somente recentemente tem havido um maior conhecimento das características electroquímicas dos MHCF, especialmente daqueles em que os filmes são "insolúveis" em solução [142]. Desde o primeiro trabalho versando sobre o PB (hexacianoferrato) modificando superfícies de eléctrodos [143] tem havido um maior interesse na preparação electroquímica, bem como as propriedades electrocrómicas, electrocatalíticas ou caracterização espectroscópica do PB e seus análogos [144-146]. De maneira geral, pode-se apresentar a fórmula de um filme de hexacianometalato como:

$$(M_1^A)k[M_2^B(CN)_m]_p.xH_2O \qquad (1.15)$$

onde M_1 e M_2 referem-se aos metais (idênticos ou diferentes) com valências A e B; k, m, e p indicam a estequiometria do complexo [40], os quais são formados pela mistura de soluções de $M_2^B(CN)_{6n}$- com um sal apropriado de M_1^A. Se M_1 e M_2 são metais de transição, existe a formação de inúmeros componentes com variações tanto dos iões metálicos quanto de suas valências [147, 149].

Os hexacianoferratos possuem núcleos metálicos de ferro (II) e ferro (III) alternadamente sendo ligados por ligantes ciano (CN) em ponte, de modo que cada centro atómico do ferro está coordenado a seis grupos CN [150, 151].

Esta representação octaédrica de face centrada sugere várias proporções estruturais, sendo que as principais sugerem por um lado, a existência de ferro (III) ou a presença de um catião álcali como por exemplo o K^+ nas posições intersticiais da célula unitária (sitio A), Fig. 1.14. Por outro lado também é possível a presença de moléculas de água nas

regiões intersticiais sem no entanto, a existência de qualquer espécie iónica nesta região, mas apenas nas suas posições reticulares [152, 153].

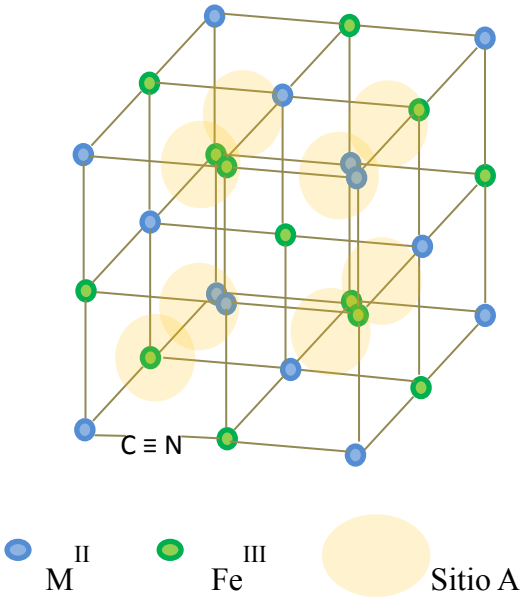


Figura 1.14 - Representação esquemática da estrutura cristalina de uma célula unitária de hexacianoferrato.

A partir do trabalho inicialmente desenvolvido por Neff [143] com PB, muitos outros grupos de pesquisa ao longo dos anos têm efectuado diversos estudos com filmes finos destes complexos inorgânicos (hexacianoferratos). Estes complexos apresentam características importantes tanto em química inorgânica, quanto em electroquímica, uma vez que possuem propriedades singulares e diferentes estados de oxidação possíveis. Isto deve-se à alta reversibilidade electroquímica, à selectividade do transporte de iões e à estabilidade que estes compostos apresentam [143].

É possível encontrar diversos trabalhos na literatura onde se usam filmes de hexacianoferratos para a modificação de eléctrodos. Vários métodos de preparação podem ser utilizados: deposição química autocatalítica [154], encapsulamento em matrizes poliméricas [155], camadas auto-montadas [156] e métodos electroquímicos [157].

Neste trabalho utilizou-se hexacianoferrato de cobre e de cobalto. No caso dos filmes de CuHCF estes têm sido depositados em diferentes substratos como ouro [158] e

platina [159] e em eléctrodos de carbono de diferentes tipos, tais como: pasta de carbono [160], grafite [161], carbono vítreo [162] e em resistências de filmes de carbono [163].

No caso do CoHCF, também apresenta o carácter redox reversível, sendo então também utilizado para a modificação de eléctrodos [164]. Este complexo atrai particular interesse devido à sua propriedade electrocrómica que depende dos estados de oxidação dos iões Co e Fe, bem como da natureza do ião de metal alcalino nele incorporado durante a electrodeposição. O CoHCF apresenta boa actividade electrocatalítica para uma variedade de moléculas em diversas aplicações electroquímicas. Eléctrodos de GC foram modificados com CoHCF e mostrou a sua eficácia na determinação de dopamina [165]; a superfície de micro eléctrodos de ouro foram modificados com este complexo para a avaliação da oxidação catalítica de NADH [166]. Florescu e Brett caracterizaram a modificação de GC com CoHCF e as suas propriedades electroquímicas em diferentes soluções electróliticas, visando a determinação de H_2O_2 produzido através de uma reacção enzimática [167].

Foram usados muitos outros biossensores que empregam MHCF para a determinação de diferentes analitos, tais como, etanol [168], oxalato [169] e D-alanina [170].

1.6. Métodos de Caracterização Electroquímica e Morfológica

Nesta secção vêm descritas as técnicas electroquimicas que foram utilizadas neste trabalho, nomeadamente a voltametria cíclica (CV), cronoamperometria (CA), voltametria de onda quadrada SWV e espectroscopia de impedância electroquímica (EIS). Para a análise morfológica da superfície dos eléctrodos recorreu-se ao microscópio de varrimento electrónico.

1.6.1 Reacções de eléctrodo: cinética e difusão

As reacções de transferência de carga heterogéneas que ocorrem na superficie de um eléctrodo [2] são separadas no espaço em eléctrodos diferentes imersos em solução

numa célula electroquímica, de modo a assegurar a electroneutralidade. Ocorrem duas ou várias reacções de transferência de carga em direcções opostas.

A maioria dos processos de transferência de carga envolve a transferência de electrões. No caso das espécies oxidadas O, e reduzidas R, reacção vem:

$$O + ne^- \rightarrow R \tag{1.12}$$

onde a espécie O, recebe *n* electrões para se transformar em R. O par O/R tem uma energia associada, energia redox, E_{redox}, que pode ser relacionada com o potencial de eléctrodo. Os electrões num eléctrodo (que é um condutor) têm um máximo de energia distribuída em torno do nível de Fermi, E_F, e é só neste circuito que os electrões podem ser fornecidos ou recebidos. Considera-se, em todas as experiências electroquímicas que durante a reacção de oxidação, o eléctrodo de trabalho funciona como um receptor de electrões transferidos e a corrente tem um valor positivo, a corrente anódica I_a. Ao contrário, durante uma reacção de redução o eléctrodo de trabalho funciona como dador de electrões e a corrente registada tem um valor negativo, a corrente catódica I_c.

O movimento das espécies para um electrodo, designado por transporte de massa, pode ser devido a efeitos de difusão (transporte de espécies devido ao gradiente de concentração), de convecção (movimento mecânico do fluido) e de migração (movimento das espécies carregadas devido à sua interacção com um campo eléctrico). Normalmente são criadas condições especiais na solução através da adição do electrólito de suporte para que a migração possa ser negligenciada. Se existir convecção, normalmente controlada do exterior, é feita a aproximação de que apenas ocorre a uma distância da superfície do eléctrodo conhecida por espessura da camada de difusão. Na proximidade da superfície do eléctrodo (dentro da camada de difusão) as espécies só são transportadas através da difusão (Fig. 1.15). Neste esquema podem distinguir-se alguns parâmetros de elevada importância:

1) k_d – o coeficiente de transferência de massa que descreve o processo de difusão da solução, de fora da camada de difusão, para junto à superfície do eléctrodo;

2) k_a e k_c – as constantes de velocidade de transferência de carga anódica e catódica, que descrevem a cinética da reacção do eléctrodo, descritas pelas equações de Butler – Volmer [164, 165].

$$k_a = k_0 \exp\,[\alpha_a nF(E-E^{\Theta'})/RT \tag{1.13}$$

$$k_c = k_0 \exp\,[\alpha_c nF(E-E^{\Theta'})/RT \tag{1.14}$$

- onde k_0 é a constante de velocidade padrão da reacção electroquímica; α_a e α_c são os coeficientes de transferência de carga e E^{Θ} é o potencial formal do sistema. Temos então, que os valores de k_a e k_c estão dependentes do potencial e da constante de velovidade padrão, $k_{0,}$ podendo considerar-se duas situações extremas:$k_d << k_o$ – para qualquer potencial, há sempre equilíbrio na superfície do eléctrodo. A corrente é determinada apenas pelas diferenças de energia electrónica entre o eléctrodo, as espécies em solução e a sua velocidade para alcançar a superfície do eléctrodo. Neste caso estamos perante uma reacção reversível.
- $k_o << k_d$ – quando são atingidos potenciais bastante elevados para que a reacção ocorra, o transporte de massa não influencia a constante de transferência de carga e então o processo é controlado pela cinética lenta da reacção. Neste caso estamos perante uma reacção irreversível.

3) A formação da dupla camada electrolítica, que afecta a cinética das reacções de eléctrodo [173]. A dupla camada electrolítica é a região interfacial entre o eléctrodo e a solução onde ocorrem as reacções de eléctrodo, e apresenta a maior diferença de potencial no circuito eléctrico [174]. Há um ordenamento de cargas positivas ou negativas na superfície do eléctrodo e num ordenamento em quantidade igual de carga e de carga oposta na solução, de modo a neutralizar a carga do eléctrodo. A constante de proporcionalidade entre o potencial aplicado ao eléctrodo e carga devida às espécies ordenadas na região interfacial é a capacidade de dupla camada.

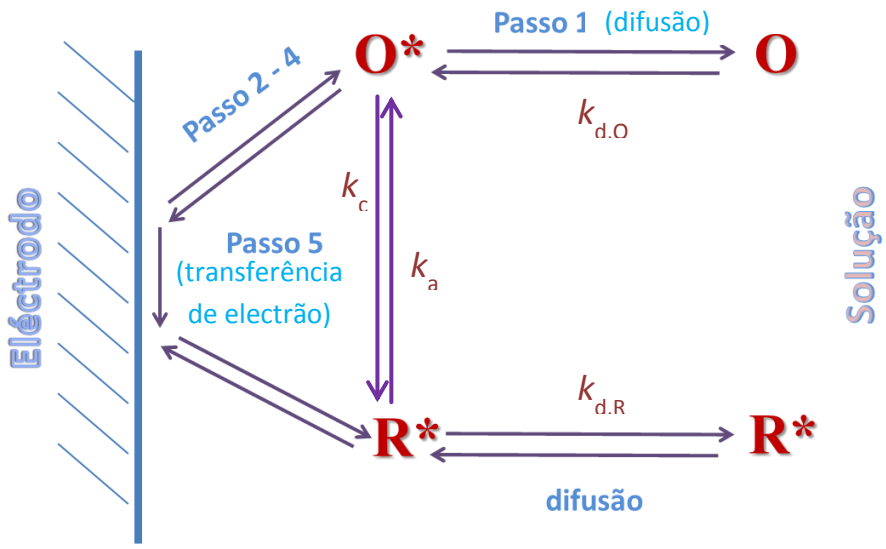


Figura 1.15 - Esquema de transferência de electrões num eléctrodo [2].

Os passos 2-5 estão incluídos na constante de velocidade de transferência de carga, k_a ou k_c, e incluem adsorção do reagente na superficie do eléctrodo. Os passos 2-4 podem ser considerados como um tipo de pré-equilibrio antes da transferência do electrão [2].

1.6.2 Técnicas electroquímicas

Nesta secção vem uma breve discrição das diferentes técnicas electroquímicas utilizadas. O nível de detalhe está intimamente ligado à relevância que cada uma das técnicas teve durante os diferentes trabalhos.

1.6.2.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (*Cyclic Voltammetry* - CV) é uma técnica muito utilizada em electroquímica, como técnica exploratória do comportamento de compostos electroactivos e do mecanismo redox. Permite inferir sobre a reversibilidade do sistema em estudo, assim como detectar a presença de passos químicos associados à transferência de carga e verificar a ocorrência ou não, de adsorção de espécies na superfície do eléctrodo [2, 174].

Foi relatada pela primeira vez em 1938 e descrita teoricamente por Randles em 1948 [175]. É um método de varrimento de potencial, que se baseia na medição da corrente que flui através do eléctrodo de trabalho em função de um potencial aplicado (Fig. 1.16).

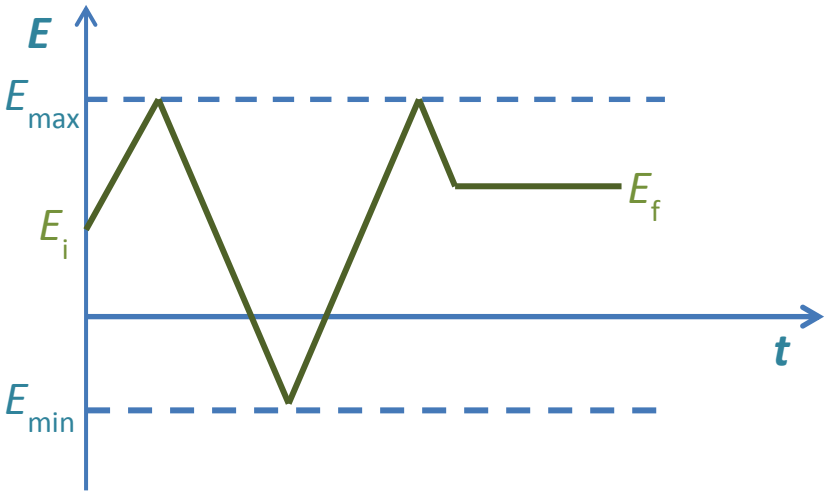


Figura 1.16 - Representação esquemática da aplicação de potencial com o tempo em CV; E_i – potencial inicial, E_f – potencial final máximo, E_{max}, e E_{min} – potencial mínimo. Adaptado de [2].

Em cada experiência voltamétrica, o potencial aplicado e a corrente medida variam com o tempo. A curva de corrente em função do potencial $I = I(E)$ é designada por voltamograma. A aplicação de um potencial ao eléctrodo origina uma corrente farádica, I_f, que está directamente relacionada à transferência de carga e uma corrente capacitiva, I_C necessária para organizar as moléculas e iões presentes na dupla camada do eléctrodo; esta contribuição aumenta com o aumento da velocidade de varrimento. A corrente total registada vem:

$$I = I_c + I_f = C_d \frac{dE}{dt} + I_f = vC_d + I_f \tag{1.15}$$

A fim de deduzir a expressão para a corrente, I (Eq. 1.15) é tido em consideração uma transferência simples de um electrão: $R \rightarrow O + ne^-$, em que inicialmente em solução apenas está presente a espécie reduzida, R. A corrente farádica observada vai ser dependente da cinética e do transporte difusional das espécies electroactivas, sendo desta forma necessário resolver as equações inerentes à difusão (segunda lei de Fick) com as

condições fronteira no domínio de Laplace. A primeira descrição teórica deste problema foi feita por Randles [175] e Sevčik [176]. O resultado final é:

$$I_p = nFA[R]_\infty(\pi D_0\sigma)^{1/2}\chi(\sigma t) \tag{1.16}$$

onde os valores $\{\pi^{1/2}\chi(\sigma t)\}$ são tabulados e:

- n = número de electrões transferidos
- F = constante de Faraday,
- A = área do eléctrodo, cm^2
- D_o= coeficiente de difusão, $cm^2\ s^{-1}$
- $[R]_\infty$ = concentração *bulk* das espécies reduzidas, mol cm^{-3}

$$\sigma = \frac{nF}{RT}v \tag{1.17}$$

$$\sigma t = \frac{nF}{RT}(E_i - E) \tag{1.18}$$

Deste modo, a corrente vem em ampéres e é dependente da raiz quadrada da velocidade de varrimento. Temos então:

$$I_{p,a} = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A D_0^{1/2}[R]_\infty v^{1/2} \tag{1.19}$$

onde v = velocidade de varrimento, V s^{-1};

A Fig. 1.17 mostra um voltamograma cíclico para um sistema electroquímico reversível. As correntes de pico (largura e altura) têm uma relação de proporcionalidade com a velocidade de varrimento, com a concentração da espécie electroactiva em solução e com o material de eléctrodo utilizado [177, 178]. É possível investigar o papel da adsorção e da difusão, bem como dos mecanismos das reacções químicas homogéneas, através da análise da amplitude e largura dos picos presentes num voltamograma [178, 179], tornando possível a elucidação da cinética das reacções electroquímicas que ocorrem na superfície dos eléctrodos [180].

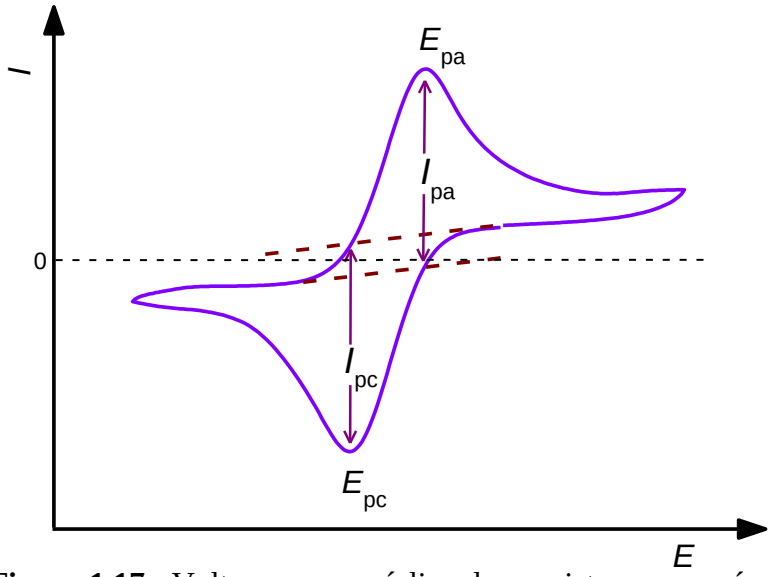


Figura 1.17 - Voltamograma cíclico de um sistema reversível.

Se um sistema redox permanece em equilíbrio ao longo do varrimento do potencial considera-se que estamos presente uma reacção electroquímica reversível. Em outras palavras, o equilíbrio requer que as concentrações de superfície de O e R sejam mantidas nos valores requeridos pela Equação de Nernst. Sob estas condições, os seguintes parâmetros caracterizam o voltamograma cíclico de um processo redox reversível a 25ºC.

- $I_p \propto v^{1/2}$
- E_p independente de v
- $|E_p - E_{p/2}| = 56{,}6/n$ mV
- $E_{p,a} - E_{p,c} = 57{,}0/n$ mV
- $|I_{pa}/I_{pc}| = 1$

A aplicação dos critérios de reversibilidade permite calcular o número de electrões envolvidos na reacção de transferência de carga. Se a reacção for reversível, o potencial formal pode ser estimado através de:

$$E' = \frac{E_{pc} + E_{pa}}{2} \tag{1.28}$$

De salientar que estas condições de reversibilidade têm que ser verificadas em simultâneo, não é possível avaliar-se se um sistema é reversível se apenas uma das condições for satisfeita. Quando estas condições não são satisfeitas, o sistema pode ser considerado como *quasi*-reversível ou irreversível, dependendo da extensão da mesma.

A extensão da irreversibilidade de um sistema intensifica-se com o aumento da velocidade de varrimento, e em comparação com o caso reversível observa-se uma diminuição das correntes de pico e uma separação crescente entre picos anódicos e catódicos:

$$E_p = E^o - \frac{RT}{\alpha_a n' F}\left[0.78 - \ln\frac{k_0}{D^{1/2}}\right] + \ln\left(\frac{\alpha_a n' F n}{RT}\right)^{1/2} \tag{1.29}$$

onde:

- n' -número de electrões transferidos na etapa determinante
- α_a -coeficiente de transferência de carga electroquímico para o processo anódico

Assim sendo, E_p ocorre a um potencial mais alto que E^o, onde o sobrepotencial está relacionado com k_0 e α_a.

A oxidação electroquímica que ocorre na interface é o passo determinante da reacção, e neste caso a corrente de picos é dada por:

$$I_p = 2.99 \times 10^5 n(\alpha_a n')^{1/2} A D_o^{1/2} [O]_\infty v^{1/2} \tag{1.30}$$

A corrente de pico continua a ser proporcional à concentração *bulk*, mas vai apresentar uma menor altura (que está dependente do α_a). Assumindo que $\alpha_a = 0{,}5$, a razão da corrente de pico reversível para irreversível é de 1,27.

Outros critérios de diagnóstico para reacções totalmente irreversíveis são [2]:

- $|E_p - E_{p/2}| = 47{,}7/(\alpha n')$ mV
- $|dE_p/d\lg v| = 29{,}6/(\alpha n')$ mV
- E_p dependente de v

para sistemas *quasi*-reversíveis (com $10^{-1} > k_0 > 10^{-5}$ cm s^{-1}) a corrente é controlada tanto pela transferência de carga como pelo transporte de massa. E o perfil do voltamograma

cíclico vem em função da $k_0(\pi vnFD/\mathrm{RT})^{1/2}$. À medida que este valor aumenta, o processo vai-se aproximar a um comportamento reversível. No caso de termos valores mais pequenos, o sistema electroquímico vai exibir um comportamento irreversível. Geralmente, os voltamogramas para um sistema *quasi*-reversível são mais prolongados e apresentam uma maior separação dos potenciais de pico em comparação com um sistema reversível. A forma do pico no voltamogramas e os parâmetros associados podem ser expressos por um parâmetro Λ que representa a razão cinética/transporte e é uma medida quantitativa de reversibilidade:

$$\Lambda = k_0 D^{-1/2} \sigma^{-1/2} \tag{1.31}$$

A variação das diferenças entre os potenciais de pico anódico e catódico com o grau de reversibilidade é expresso por Ψ, que por sua vez pode ser correlacionado com Λ [181]:

$$\Psi = \Lambda \pi^{1/2} \tag{1.32}$$

Uma vez que os valores de Ψ vêm tabulados como função da separação de pico, a constante de velocidade de transferência de electrões padrão k_0 pode ser deduzida usando as equações Eq. 1.31 e Eq. 1.32.

$$\Psi = k_0 D^{-1/2} \sigma^{-1/2} \pi^{1/2} \tag{1.33}$$

Um factor que influencia substancialmente a resposta voltamétrica de um sistema electroquímico é a adsorção do reagente ou algum dos seus produtos redox na superfície do eléctrodo de trabalho. Se o reagente ou produto de uma reacção electroquímica é adsorvido no eléctrodo, seja fraca ou fortemente, a forma da curva voltamétrica obtida é modificada (Fig. 1.18). Neste caso particular podem ocorrer duas situações distintas.

- A velocidade de reacção das espécies adsorvidas é muito maior do que a das espécies em solução, então considera-se apenas a reacção das espécies adsorvidas;
- é necessário considerar as reacções de ambas as espécies adsorvidas e das que se encontram em solução.

A curva corrente-potencial para estas situações está descrita em baixo e o voltamograma típico representado na Fig 1.18 [182],

$$I_p = \frac{nF\sigma A\Gamma_{R,i}(b_O/b_R)\theta}{[1 + (b_O/b_R)\theta]^2} \tag{1.34}$$

onde:

- $\Gamma_{R,i}$ é a concentração na superfície da espécie adsorvida R na área superficial *A* do eléctrodo, antes da experiência se iniciar

b_O e b_R expressa a energia de adsorção de O e R

$$\sigma = nF/RT\ v \tag{1.35}$$

$$\theta = exp\left[\left(\frac{nF}{RT}\right)(E - E^{0\prime})\right] \tag{1.36}$$

A corrente de pico para a redução, I_p, é obtida quando $(b_R/b_O)\theta = 1$, e vem descrita na seguinte equação:

$$I_p = \frac{n^2F^2vA\Gamma_{R,i}}{4RT} \tag{1.37}$$

O potencial de pico é dado por:

$$E_p = E^\theta - \frac{RT}{nF}\ln\left(\frac{b_O}{b_R}\right) \tag{1.38}$$

o valor do E_p é o mesmo para uma oxidação e para uma redução.

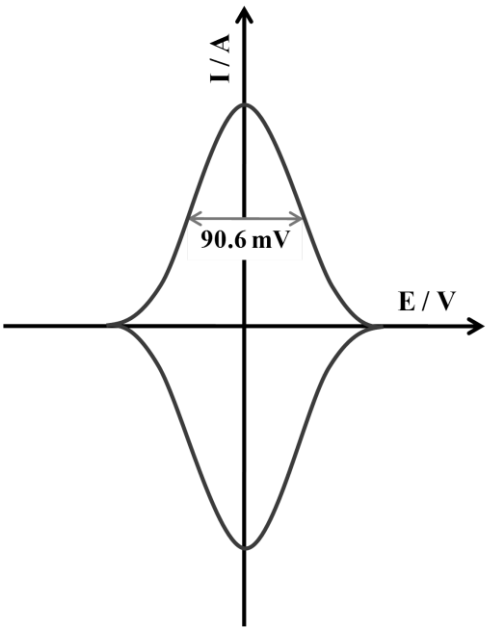


Figura 1.20 - Voltamograma cíclico para P_{glivec} adsorvido na superfície do GC em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2. Velocidade de varrimento 25 mV s^{-1}; adaptado de [182].

Se a isotérmica for do tipo Langmuir e $(b_R/b_O)\theta = 1$, então o perfil voltamétrico é descrito pela função $\Theta(1+\Theta)^2$ e podendo-se então calcular que a largura a meia altura do pico é $W_{1/2} = 90{,}6/n$, sendo desta forma possível determinar o número de electrões transferidos.

1.6.2.2. Cronoamperometria

A cronoamperometria (CA - *Chronoamperometry*) é uma técnica em que se aplica um degrau de potencial ao eléctrodo de trabalho, registando-se de seguida a resposta de corrente em função do tempo [2]. O sinal de excitação em cronoamperometria é um degrau de potencial [6], tal como vem demonstrado na Fig. 1.21A e a resposta em função do tempo (I - t) é composta por dois componentes, Fig. 1.21B:

- a corrente devido ao carregamento da dupla camada;
- a corrente devido à transferência de electrões das espécies electroactivas na interface do eléctrodo.

A influência que cada um dos componentes pode ter está dependente do potencial inicial aplicado, E_i, e do valor final do potencial, E_f. Os resultados são mais facilmente interpretados quando um eléctrodo planar é usado numa solução que não está sujeita a agitação, e o potencial aplicado é suficiente para oxidar ou reduzir as espécies electroactivas tão rápido quanto este atinge a superfície do eléctrodo, ou seja, a uma taxa de difusão controlada.

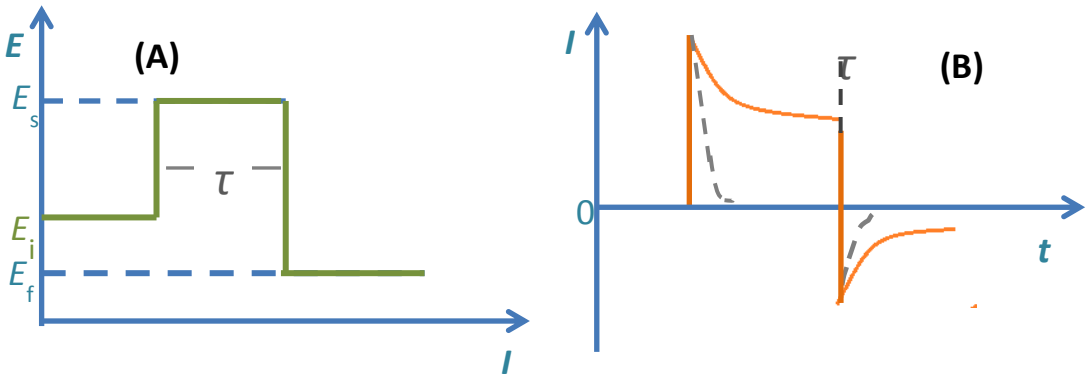


Figura 1.21 - (A) Representação esquemática do duplo degrau de potencial e (B) evolução da corrente com o tempo. Adaptado de [6].

O potencial do eléctrodo de trabalho é variado em degraus a partir de um valor do potencial onde não ocorre nenhuma corrente farádica, E_i, até um valor de potencial E_s, onde a concentração de espécies electroactivas na superfície é praticamente nula. O potencial pode ser mantido no valor E_s até ao final da experiência, ou pode ser variado pela aplicação de um novo degrau até um valor E_f depois de um determinado tempo τ. Este último caso denomina-se de cronoamperometria de degrau duplo.

O degrau de potencial aplicado origina uma corrente instantânea como resultado da redução R→O + ne$^-$ onde se considera que estamos perante um sistema simples onde apenas R está presente. Nestas condições a variação da corrente com o tempo pode ser dada pela equação de Cottrell [183], que por sua vez foi calculada através da resolução da 2ª Lei de Fick com condições fronteira apropriadas [178].

$$I_t = -nFAD_R \left(\frac{\delta C_R}{\partial x}\right)_{x=0,t} \tag{1.39}$$

onde:

- I_t = corrente no momento t, (A)
- n = numero de electrões, (eq mol^{-1})
- F = constante Faraday, (96,485 C eq^{-1})
- A = área do eléctrodo, (cm^2)
- D_R = coeficiente de difusão de R, (cm^2 s^{-1})
- C_R = concentração de R, (mol cm^{-3})
- x = distância do eléctrodo, (cm)
- t = tempo, (s)

O termo $D_R \left(\frac{\partial C_R}{\partial x}\right)_{x=0,t}$ representa o fluxo ou o número de moles de R a difundir por unidade de tempo e pela unidade de área do eléctrodo e mede-se em mol cm^{-2}s^{-1}. Uma vez que $\left(\frac{\partial C_R}{\partial x}\right)_{x=0,t}$ representa o declive da curva concentração-distância para as espécies R na superfície do eléctrodo no momento t, então o comportamento da corrente durante um ensaio cronoamperométrico pode ser determinado através deste declive. A corrente decresce suavemente de um valor previsto ∞ a t = 0 e vai-se aproximando de zero com o aumento do tempo, como vem descrito pela equação de Cottrell para um eléctrodo plano:

$$I_t(t) = \frac{nFAD^{1/2}c_\infty}{(\pi t)^{1/2}} = kt^{-1/2} \tag{1.40}$$

Uma resposta típica de corrente em função do tempo a um potencial fixo é apresentada na Fig. 1.22. O aumento da corrente é devido ao processo de oxidação que ocorrem na superfície do eléctrodo após a injecção do analito.

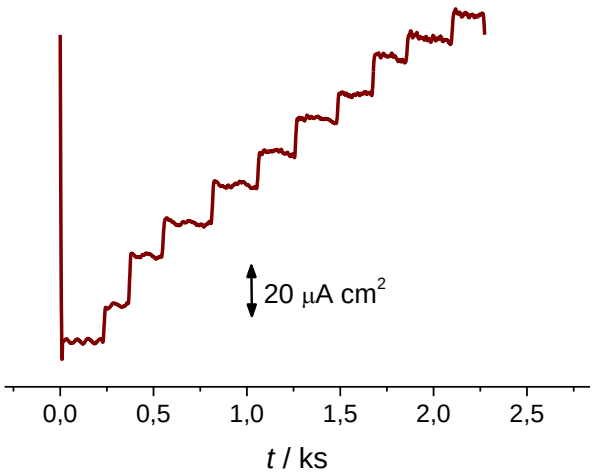


Figura 1.22 - Determinação de potencial por amperometria a potencial fixo de + 0,05 V *vs* SCE PNR/MWCNT$_{Nan}$/GC, para adições sucessivas de 100 μM de ascorbato em KPBS pH 5,5 [115].

A equação de Cottrell enuncia que o produto $It^{1/2}$ tem que ser constante para o caso em que se tem uma reacção controlada por difusão num eléctrodo plano. Desvios desta constância podem ser causados por uma série de situações:

- difusão não-planar;
- convecção na célula;
- o eléctrodo demora a ser carregado durante o degrau de potencial;
- reacções químicas acopladas.

A resposta da corrente a um degrau de potencial reflecte sempre o mecanismo da reacção de eléctrodo, e poderá ser usado para elucidar os mecanismos de reacção. Eléctrodos não-planares podem exibir um aumento em $I \times t^{1/2}$ com o aumento de tempo [2,6].

1.6.2.3. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV – *Square Wave Voltametry*) surgiu nos anos 1950 com os trabalhos de Bakker e dos seus colaboradores [184, 185], mas uma vez que a SWV é uma técnica rápida e que exige um rigoroso controlo electrónico, foi pouco utilizada devido a sérias limitações instrumentais. Anos mais tarde acompanhando o progresso tecnológico esta técnica ganhou lugar de destaque em electroanálise.

Em SWV a forma de onda é resultado da adição de uma onda quadrada de amplitude de impulso ΔE_p a uma escala de potencial com degraus de amplitude ΔE_s e com um período τ. Devido à construção da onda, durante cada ciclo de frequência $f = \tau^{-1}$, um impulso de potencial positivo é aplicado ao eléctrodo durante a primeira metade do ciclo seguindo-se a aplicação de um impulso de potencial negativo na restante metade. O tipo de onda de potencial e a resposta típica de um sistema reversível vêm representados na Fig. 1.23 [186, 187].

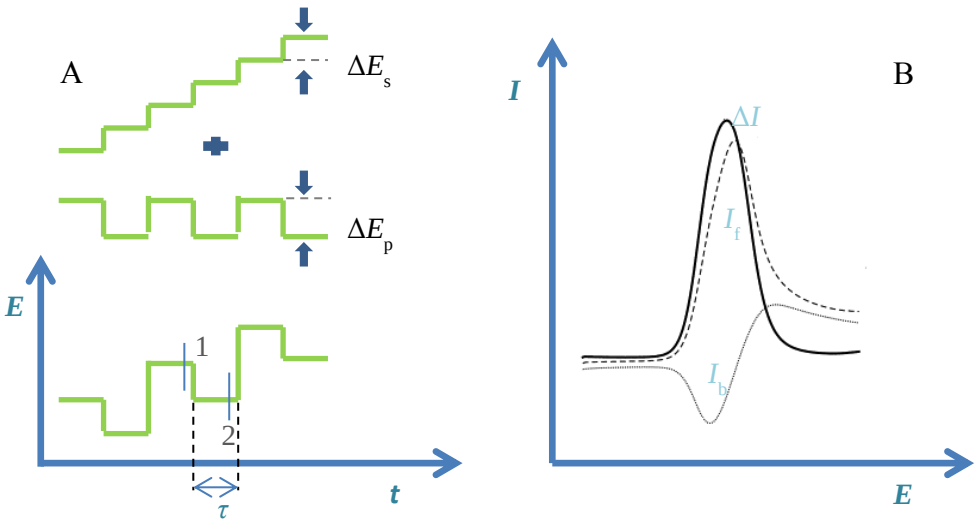


Figura 1.23 - (A) Esquema de aplicação de potenciais; (B) voltamogramas típicos obtidos por SWV.

A amostragem da corrente é efectuada no momento imediatamente antes do final de ambos os impulsos, (positivo e negativo), em cada ciclo (pontos 1 e 2 na Fig. 1.23). A corrente total, ΔI ou I_t registada corresponde à diferença entre a corrente $I(1)$ registada no final do impulso do potencial directo – corrente directa (I_f – *forward current*), e a corrente

$I(2)$ registada no final do impulso potencial inverso – corrente inversa (I_b – *backward current*). Daqui resulta que, quando $\Delta I = I(1) - I(2)$ é maior que $I(1)$ estamos perante um sistema reversível (Fig. 1.23B).

Em SWV, como há um regime de pequenos impulsos simétricos o tipo de amostragem de corrente faz com que a diferença de corrente ΔI seja zero para uma espécie electroactiva que se encontre em condições de corrente limitada por difusão. Isto vai facilitar a remoção da corrente existente devido à redução do oxigénio dissolvido, possibilitando desta forma a realização de determinações eletroanalíticas sem haver necessidade de se efectuar a desoxigenação da amostra, tornando desta forma a análise menos morosa e menos dispendiosa.

Este tipo de amostragem e tratamento da corrente é responsável pela maior sensibilidade apresentada pela SWV relativamente, por exemplo, à voltametria de impulso diferencial. Esta técnica permite também uma maior velocidade de análise, uma vez que é possível utilizar velocidades de varrimento na ordem de 1,0 V s^{-1}, o que vai permitir que ocorra uma diminuição do consumo das espécies a analisar e elimina praticamente o bloqueamento do eléctrodo.

1.6.2.4. Espectroscopia de Impedância Electroquímica

Os primeiros trabalhos publicados sobre espectroscopia de impedância electroquímica (EIS - *electrochemical impedance spectroscopy*) remontam ao início da década de 1970 [188]. Inicialmente, a EIS foi aplicada na determinação da capacitância da dupla camada eléctrica e em análise polarográfica.

A espectroscopia de impedância electroquímica é um excelente método de identificação e determinação de parâmetros de um modelo elaborado com base na resposta de frequência do sistema electroquímico em estudo, permitindo a possibilidade de estudo dos processos electroquímicos que ocorrem na interface eléctrodo/solução electrolítica [189, 190].

O princípio fundamental por detrás desta técnica é a aplicação de uma pequena perturbação de potencial ou corrente no sistema em estudo. Esta perturbação é feita mediante a aplicação de um potencial contínuo sobre o qual é superimposta uma variação sinusoidal de potencial de pequena amplitude [191]. O facto de ser uma perturbação relativamente pequena traz vantagens para a resolução das equações matemáticas que descrevem os fenómenos envolvidos na aplicação da EIS, dado que é possível utilizar formas-limites destas equações, que são normalmente lineares.

Considerando a aplicação de um sinal de potencial sinusoidal à interface eléctrodo/solução:

$$E(t) = E_0 \sin(\omega t) \tag{1.41}$$

onde $E(t)$ é o potencial no tempo t, E_0 é a amplitude do sinal e ω é a frequência angular da perturbação e onde f é a frequência da perturbação:

$$\omega = 2\pi f \tag{1.42}$$

A resposta gerada pela interface, $I(t)$, é desfasada de um ângulo φ relativamente à perturbação, e apresenta uma amplitude diferente, I_0:

$$I(t) = I_0 \sin(\omega t + \varphi) \tag{1.43}$$

A impedância, Z, é o factor de proporcionalidade entre E e I e atendendo à equação generalizada da lei de Ohm para um sistema, vem:

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \varphi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \varphi)} \tag{1.44}$$

A impedância pode ser expressa em termos de sua magnitude Z_0, e de um desfasamento de angulo (ângulo de fase), φ [192, 178] ou como uma função complexa:

$$Z = Z' + \mathrm{j}Z'' = |Z|\cos\varphi + \mathrm{j}|Z|\sin\varphi \tag{1.45}$$

e a representação no plano complexo é uma representação da parte imaginária (Z'') da impedância em função da parte real (Z'), Fig. 1.24.

Em princípio, qualquer célula electroquímica pode ser representada por um modelo eléctrico equivalente. Desta forma, uma interface eléctrodo/electrólito na qual ocorra uma determinada reacção electroquímica será análoga a um circuito eléctrico formado por

resistências, condensadores e indutores. É nesta analogia que reside uma das grandes vantagens desta técnica.

Tendo em consideração os diferentes elementos eléctricos temos que a resistência eléctrica vem então correlacionada com a resistência da célula R_Ω (resistência associada à resistência do líquido e à resistência dos contactos eléctricos) e com a resistência à transferência de carga R_{ct}, através da interface, ou resistência de um filme modificado. Os capacitores por sua vez podem ser correlacionados com a capacitância resultante da acumulação da carga na dupla camada, C_{dl}, ou com a separação de cargas através da superfície do filme. Indutores representam a separação da carga induzida que ocorre para frequências muito altas ou para um processo de relaxamento a baixas frequências.

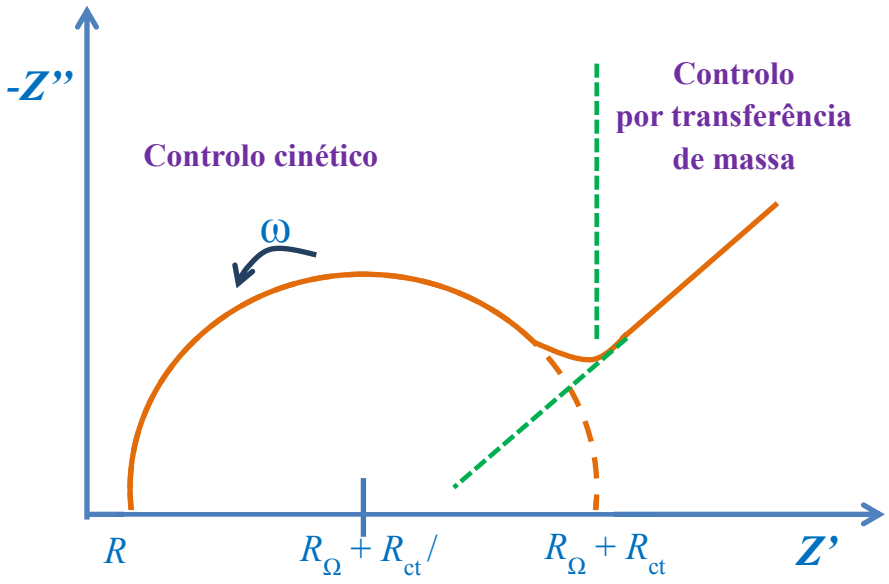


Figura 1.24 - Gráfico de impedância no plano complexo para um sistema electroquímico simples R + $ne^- \rightarrow$ O.

Muitas vezes, como é o caso deste trabalho, os condensadores presentes nos circuitos eléctricos equivalentes não apresentam um comportamento ideal devido à existência de rugosidade e porosidade na superfície dos eléctrodos. Esta não uniformidade da superfície dos eléctrodos faz com que um condensador ideal actue como um elemento de fase constante (CPE), com um valor de α entre 0,5 e 1 [193, 194]:

$$\text{CPE} = \{(C\,\mathrm{i}\omega)^{\alpha}\}^{-1} \tag{1.46}$$

A Tabela 1.4 em baixo, lista os elementos do circuito equivalente mais comuns, a equação para a sua relação corrente versus tensão, e sua impedância.

Tabela 1.4 - Lista dos elementos, relação corrente *vs* potencial, e impedância.

Elemento eléctrico	*I vs. E*	*Z*
resistência	$E = I \times R$	$Z = R$
condensador	$I = C\dfrac{dE}{dt}$	$Z = (\mathrm{j}\omega C)^{-1}$
indutor	$E = L\dfrac{di}{dt}$	$Z = \mathrm{j}\omega L$

O circuito eléctrico equivalente mais simples para ajustar um sistema electroquímico é designado por circuito de Randles [195] e vem representado na Fig.1.25. É constituído por uma resistência que corresponde à resistência da célula, R_{Ω}, um condensador que representa a dupla camada eléctrica, C_{dl}, uma resistência de carga ou de polarização, R_{ct} ou R_p e ainda um elemento Warburg que é usado para modelar a difusão linear semi-infinita. Numa situação mais simples, o elemento de Warburg manifesta-se em espectros de EIS, como uma linha com um ângulo de 45 graus na região de baixas frequências.

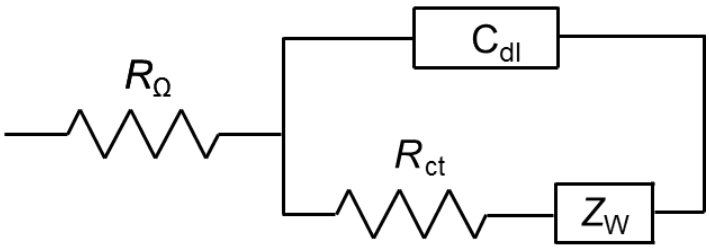


Figura 1.25 - Circuito equivalente de Randles.

Para além de ser extremamente útil por si só, o circuito de Randles equivalente é usado inúmeras vezes como o ponto de partida para outros modelos mais complexos [195].

1.6.3. Microscopia electrónica de varrimento

Um microscópio electrónico de varrimento (SEM - *scanning electron microscopy*) é um tipo particular de microscópio com o qual é possível obter imagens de alta resolução da superfície de uma amostra.

Num SEM típico, os electrões são emitidos termoionicamente a partir de um cátodo (normalmente um filamento de tungsténio ou hexaboreto de lantânio) e acelerados através de um ânodo, sendo também possível obter electrões por efeito de emissão de campo (Fig. 1.26). O tungsténio é usado normalmente por ser o metal que apresenta o ponto de fusão e pressão de vapor mais elevada. O filamento de tungsténio (eléctrodo negativo) vai ser aquecido, mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 kV a 30 kV [196].

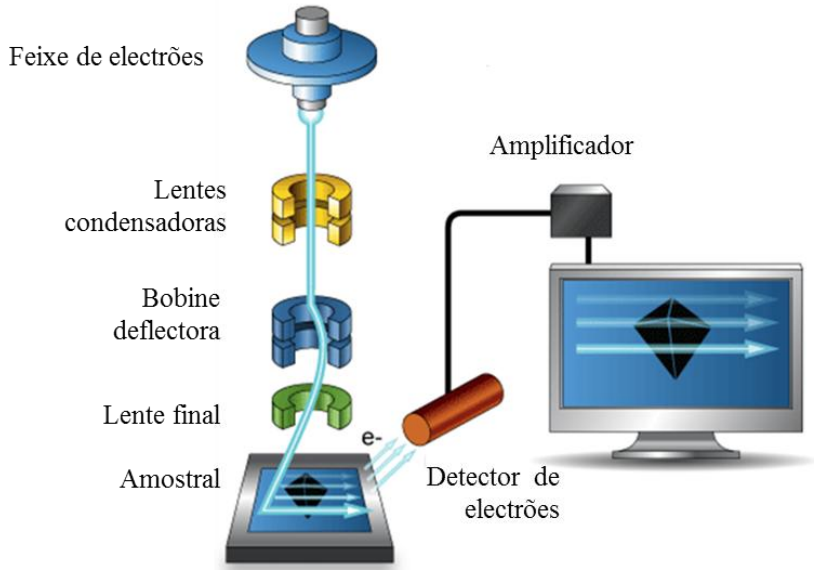


Figura 1.26 – Esquema básico de um instrumento para SEM.

Os feixes gerados vão ser filtrados de forma a serem seleccionados apenas os feixes paralelos. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio atrai fortemente os electrões gerados, resultando numa aceleração em direcção ao eléctrodo positivo. A correcção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes electromagnéticas, que têm como função alinhar os feixes em direcção à abertura da objectiva. Os electrões vão fluir, mas mantendo uma trajectória definida sem se dispersarem para outras direcções.

Ao incidir sobre uma superfície condutora o feixe de electrões vai interagir com esta libertando electrões secundários, que por sua vez, são captados por um receptor e o sinal amplificado e convertido em imagem.

Esta imagem quando processada num computador gera uma micrografia e pode chegar a ter uma resolução máxima de 10 nm, com uma ampliação da ordem de magnitude de dezenas de milhares de vezes [197].

O sistema trabalha em vácuo e com exclusão de humidade e em casos especiais, quando a amostra apresenta baixa condutividade, é necessário proceder à metalização da superfície por deposição de uma fina camada de um metal, a fim de se evitar acumulação de cargas eléctricas que iriam resultar na destruição da amostra.

Capítulo 2

Experimental

2. Experimental

Neste capítulo apresenta-se a descrição geral dos materiais e reagentes utilizados, bem como os métodos de investigação, condições experimentais e tratamentos de dados utilizados ao longo deste trabalho.

2.1. Reagentes e soluções tampão

Todos os compostos utilizados foram de qualidade analítica e utilizados sem purificação adicional. Estes reagentes bem como a companhia que os fornece estão descritos na Tabela 2.1.

Todas as soluções de electrólito de suporte e as soluções padrão de cada um dos compostos foram preparadas em água ultrapura de resistividade ≥18MΩ obtida através de um sistema Milipore Milli-Q System, Millipore S.A., Molsheim, França.

Tabela 2.1 - Reagentes usados.

Composto	**Abreviatura**	**Proveniência**
2,3-dihidrotieno [3,4-b]-1,4-dioxina	EDOT	Sigma-Aldrich
L(-)-Tirosina	Tyr	Merck
Ácido L-Ascórbico	AA	Sigma-Aldrich
Ácido estireno sulfonónico de sódio	NaPSS	Sigma-Aldrich
Acetonitrilo		Merck
Ácido nítrico	HNO_3	Riedel-de-Haën
Albumina sérica bovina	BSA	Sigma-Aldrich
Cloreto de cobalto	$CoCl_2$	Merck
Cloreto de cobre	$CuCl_2$	Merck
Cloreto de níquel	$NiCl_2$	Merck
Cloreto de potássio	KCl	Fluka

Cloreto de sódio	NaCl	Riedel-de-Haën
Di-hidrogenofosfato de potássio	KH_2PO_4	Riedel-de-Haën
Di-hidrogenofosfato de Sódio	NaH_2PO_4	Fluka
Glucose		Sigma-Aldrich
Glucose oxidase	GOx	Fluka
Glutaraldeído (25%)	GA	Sigma-Aldrich
Hexacianoferrato(II) de potássio	$C_6FeK_4N_6$	Fluka
Hidrogenofosfato de potássio	K_2HPO_4	Panreac
Hidrogenofosfato disódico	Na_2HPO_4	Fluka
L(-)-Cisteína	Cys	Merck
L-Triptofano	Trp	Merck
MWCNT com ~95% de pureza	CNT_{Nan}	NanoLab
MWCNT com > 90% de pureza	CNT_{Sig}	Sigma-Aldrich
MWCNT com >90% de pureza	CNT_{She}	Shenzhen Nanotech
N,N-dimetilformamida	DMF	Fluka
Nafion (5%)		Sigma-Aldrich
Negro de carbono N220 (120 m^2 g^{-1})	CB	Cabot Corporation
Nitrato de potássio	KNO_3	Fluka
Pó de grafite (nº. 38)		Fisher Scientific Corporation
Sulfato de cádmio	Cd_2SO_4	Merck
Sulfato de cobre	$CuSO_4$	Panreac
Sulfato de sódio	Na_2SO_4	Panreac
Vermelho neutro (65 % de teor de corante)	NR	Sigma-Aldrich
α-D(+)-glucose		Sigma-Aldrich

As soluções de electrólito de suporte de diferentes valores de pH estão discriminadas na Tabela 2.2, e como foi referido anteriormente, preparadas a partir de reagentes de pureza analítica. O valor exacto de pH foi ajustado para cada uma das soluções tampão.

Tabela 2.2 - Composição das soluções tampão.

Solução tampão	Composição	pH
0,0025 M Acetato de sódio	(CH_3COONa + CH_3COOH) 0,0025 M + KCl 0,05 M como electrólito de suporte	4,6
0,025 M fosfato de potássio salino (KPBS)	($K_2HPO_4.3H_20$ + KH_2PO_4) 0,025 M + KNO_3 0,1 M como electrólito de suporte	5,5
0,1 M fosfato de sódio salino (NaPBS)	(NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4) 0,1 M + NaCl 0,05 M como electrólito de suporte	7,0

As soluções padrão utilizadas foram preparadas em soluções tampão e armazenadas no frigorífico a 4ºC. Excepto aquelas que foram preparadas no dia das experiências (vão ser mencionadas posteriormente).

No caso do estudo de glucose, uma solução padrão 0,1 M deste analíto teve que ser preparada no máximo um dia antes a ser utilizada, para permitir que os anómeros α e β da D-glucose cheguem ao equilíbrio.

2.2. Instrumentação

As técnicas voltamétricas, tais como, voltametria cíclica, amperometria e voltametria de onda quadrada foram efectuadas utilizando maioritariamente um potencióstato/galvanostato μ-Autolab tipo II (Ecochemie, Holanda), Fig. 2.1A), controlado

pelo *software* GPES (General purpose Electrochemical System) versão 4.9. Por vezes foi também utilizado um potencióstato PalmSens, (Palmsens BV, Houten, Holanda) Fig.2.1B, com o *software* PS-Lite, versão 3.7 .

A) B)

Figura 2.1 - Imagem de (A) Potencióstato/galvanostato µ-Autolab tipo II e B) potenciostato Palmsens.

As medidas de impedância electroquímica foram realizadas utilizando um analisador de resposta de frequência Solartron 1250 com interface electroquímica Solartron 1286 (Solartron Analytical, UK), Fig. 2.2 . O controlo dos parâmetros utilizados durante os ensaios de espectroscopia de impedância, a aquisição e o tratamento dos dados obtidos foram efectuados por *software* ZPlot 2.4 (Scribner Associates, USA).

Figura 2.2 - Analisador de resposta de frequência Solartron 1250 com interface electroquímica Solartron 1286

As imagens de microscópio de varrimento foram adquiridas em diversos substratos tais como eléctrodos de ITO, em tecido de carbono e em SPE. As imagens captadas pelo microscópio de varrimento electrónico foram obtidas através de um instrumento Jeol JSM-5310 (Jeol, Tokyo, Japan), Fig 2.3, equipado com um sistema iónico campo SEM com um canhão de electrões controlado electronicamente.

Figura 2.3 – Microscópio de varrimento electrónico Jeol JSM-5310

No decorrer das experiências, os ensaios foram efectuados numa célula electroquímica cuja capacidade volumétrica e eléctrodos de referência foram diferentes de acordo com as necessidades exigidas, mas mantendo o esquema de três eléctrodos apresentado (Fig 2.4), com excepção feitas às experiências efectuadas com os eléctrodos impressos (Fig. 1.4). Assim sendo, a descrição dos diferentes eléctrodos vai ser feita para cada uma das experiências desenvolvidas.

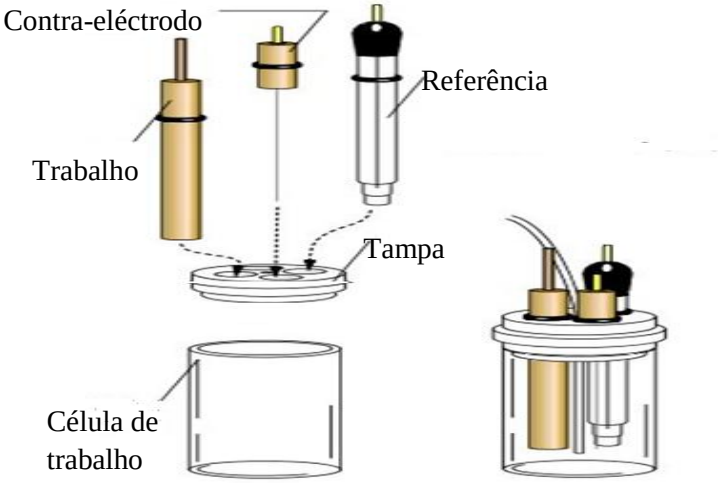


Figura 2.4 - Representação esquemática de uma célula electroquímica com três eléctrodos.

As medidas de pH foram realizadas utilizando um medidor de pH Crison micropH 2001, Barcelona, Espanha. Todas as medidas foram efectuadas à temperatura ambiente de 25 ± 1 ºC. Os gráficos e figuras de voltamogramas e espectros de impedância electroquímica foram executados usando o *software* ORIGIN versão 8 da Microcal Software Inc., EUA. Os algoritmos *Savitsky-Golay*, *adjacent averaging* e *FFT Filter* foram utilizados sempre que houve necessidade de eliminar o ruído de fundo sobreposto ao sinal voltamétrico.

Capítulo 3

Estudo comparativo de diferentes marcas de nanotubos de carbono

Neste capítulo é descrito um estudo comparativo da influência de três diferentes marcas de nanotubos de carbono com diferentes concentrações no revestimento de eléctrodos de carbono vítreo, bem como a influência electroquímica de um mediador redox com vista ao desenvolvimento de um sensor electroquímico. Alguns destes resultados já foram publicados em [115].

3.1. Introdução

Desde a descoberta de nanotubos de carbono em 1991 por Iijima [16], que as perspectivas para a aplicação deste compostos têm ido desde o desenvolvimento de compósitos reforçados até aparelhos electrónicos à escala molecular. Devido às suas características únicas, tais como, alta condutividade, alta estabilidade química e capacidades mecânicas extremamente elevadas [25, 198], os CNT podem ser usados como materiais de eléctrodos com propriedades muito úteis para aplicações electroquímicas e bio electroquímicas [199, 200].

Como foi mencionado na secção 1.1.3, o método de fabrico dos CNT está directamente ligado com a reactividade electroquímica, em que os nanotubos produzidos a partir do processo de deposição química em fase de vapor demonstram ter uma actividade electrocatalítica superior [201].

A estrutura especial dos CNTs permite-lhe possuírem mais locais electroquimicamente activos, em comparação com outros tipos de carbono, nomeadamente carbono vítreo e grafite, tornando assim os CNTs muito atrativos para determinações electroquímicas a potenciais mais baixos.

Nos últimos anos possíveis modificações de eléctrodos com nanotubos de carbono e polímeros condutores têm sido alvo de intenso estudo por parte da comunidade electroquímica. Este crescente interesse está relacionado com o facto da incorporação de CNTs nos polímeros condutores levar à formação de novos materiais compósitos com efeitos sinergéticos [202]. A estrutura π-conjugada dos nanotubos permite que eles

interajam com compostos orgânicos aromáticos através de relações electrónicas π-π e interacções hidrofóbicas [203, 204].

Polímeros azínicos electroactivos têm demonstrado ter boas características condutoras, para além disso conservam o comportamento redox do monómero percursor. Essa característica mostrou ser particularmente útil em aplicações em sensores e biossensores [94, 116, 205]. A fenazina natural vermelho neutro, como outras azinas, tem sido usado como marcador biológico [206], indicador de pH em sistemas bioquímicos, substrato enzimático artificial [207] e como mediador redox na determinação de lactato, glutamato, glucose [208, 209]. Uma vez que o vermelho neutro tem azoto como segundo heteroátomo no anel fenazínico, apresenta um potencial redox muito mais baixo que outras fenotiazinas ou fenoxazinas [207], e a funcionalidade amino torna o NR passível a electropolimerização.

A electropolimerização para a obtenção do poli(vermelho neutro) (PNR) com o objectivo de se obter estabilidade a longo termo e conservação da resposta dos sítios activos redox do NR, foi feito em diferentes substratos de eléctrodos, tais como filme de carbono [205, 208]. O filme de PNR juntamente com os CNTs poderá conduzir a uma melhoria sinergética nas propriedades electroquímicas do sensor. Essa interacção sinergética bem como as diferentes propriedades de diferentes nanotubos de carbono foram avaliadas.

3.2. Pré-tratamento dos eléctrodos

3.2.1. Funcionalização e preparação do MWCNT e pó de grafite

Utilizou-se diferentes tipos de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT), provenientes de diferentes fontes: $MWCNT_{Sig}$ com >90% de pureza, 110-170 nm de diâmetro e 5-9 µm de comprimento, $MWCNT_{Nan}$ com ~95% de pureza, 30±10 nm diâmetro e 1-5 µm de comprimento e $MWCNT_{Shen}$ com >90% de pureza, 40-60 nm de diâmetro e 5-15 µm de comprimento. Os diferentes nanotubos foram funcionalizados quimicamente, deixando 120 mg de cada um dos MWCNT em agitação constante durante 24h em 10 ml de uma solução 3 M de ácido nítrico. O produto sólido obtido foi então

recolhido sobre um papel de filtro e lavado várias vezes com água ultra-pura até que a solução proveniente da filtração apresentasse um pH aproximadamente neutro. Os MWCNTs funcionalizados foram deixados a secar numa estufa a 80 º C durante 24 h.

A funcionalização química dos MWCNT com ácido vai introduzir novos grupos funcionais na superfície dos nanotubos, fazendo com que estes percam o carácter hidrofóbico. Apesar da funcionalização, os MWCNT secos necessitam ser dispersos numa solução de dimetilformamida (solvente orgânico) uma vez que ainda apresentam baixa hidrofilicidade. Esta dispersão em DMF (0,2 e 1% (m/v)) foi sonicada durante 4 h com a finalidade de se obter uma mistura homogénea.

O revestimento do eléctrodo GC com os diferentes MWCNT foi preparado por injecção de 10 µl da dispersão CNT/DMF sobre a superfície do eléctrodo com o auxílio de uma micropipeta, deixando-se posteriormente o solvente evaporar à temperatura ambiente; este procedimento foi realizado por duas vezes, levando à formação de um filme de nanotubos com ~ 0,14 mg cm^{-2} ou ~ 0,70 cm^{-2} mg.

Utilizou-se o mesmo solvente orgânico (DMF) para fazer uma dispersão de pó de grafite de 1% (m/v). Posteriormente deixou-se a sonicar durante 1h e a mistura homogénea obtida foi utilizada para revestimento do eléctrodo de GC recorrendo-se ao procedimento de deposição mencionado anteriormente para os nanotubos de carbono.

3.2.2. Deposição de poli(vermelho neutro)

A preparação do filme de poli(vermelho neutro) foi realizada através de voltametria cíclica. Para este procedimento utilizou-se uma solução de 1,0 mM de NR em 0,025 M KPBS + 0,1 M KNO_3, pH 5,5. A deposição fez-se por varrimento de potencial entre -1,0 e + 1,0 V *vs* SCE com uma velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1}, tal como foi efectuado anteriormente para outros substratos de carbono [114]. Antes da polimerização, efectuou-se a todos os eléctrodos (modificados e não modificados) um pré-tratamento electroquímico por voltametria cíclica utilizando a mesma solução tampão que se utiliza para depositar o polímero, entre 0,0 V e +1,0 V *vs* SCE com uma velocidade de varrimento até se obter um voltamograma estável.

3.3. Caracterização electroquímica dos eléctrodos MWCNT

Os eléctrodos de carbono vítreo revestidos com MWCNT de diferentes proveniências, foram caracterizados por voltametria cíclica (CV), com velocidades de varrimento desde 10 até 100 mV s^{-1}, numa solução de electrólito suporte de KCl 0,1 M contendo 1,0 mM ferrocianeto de potássio.

Na presença dos MWCNTs os valores das capacidades, determinados a partir das correntes capacitivas de fundo em voltametria ciclica, foram significativamente mais altas do que aquelas obtidas para o eléctrodo nu, mostrando que a modificação com nanotubos leva a um aumento da área de superfície de carbono disponível e que este aumento está relacionado com a quantidade de nanotubo adicionada (Tabela 3.1). Observa-se também que os valores da capacidade para além de variarem com a quantidade de CNT aplicado, também são diferentes de acordo com a marca de nanotubo utilizado. Esta observação pode estar relacionada com o facto que os MWCNT apresentam diferentes quantidades de defeitos para cada marca de nanotubo. Observando a Tabela 3.1, observa-se que os valores obtidos para os CNT provenientes da NanoLab são claramente superiores.

Para a voltametria cíclica na presença de hexacianoferrato(II) obtiveram-se picos redox bem definidos com o potencial de meia onda a ca. 0,165 V *vs* SCE sobreposta na corrente de fundo. Os voltamogramas com as correntes de base subtraídas estão representados na Fig. 3.1. Como esperado, as formas dos voltamogramas foram apenas afectadas ligeiramente pelas diferentes velocidades de varrimento e as correntes de pico anódico e catódico apresentam uma dependência linear com a raiz quadrada da velocidade de varrimento para todas as velocidades estudadas (Tabela 3.2), reflectindo o facto de que o processo electroquímico presente ser controlado por difusão.

Tabela 3.1 - Características dos eléctrodos MWCNT/GC: área electroactiva, A_{ele}, relativamente à área geométrica, A_{geo}, capacidade, C, e a constante de velocidade de transferência de electrões padrão, k_0, a partir dos CVs com a velocidade de varrimento desde 10 até 100 mV s^{-1}, na solução electrolítica 1 mM $K_4Fe(CN)_6$/0,1 M KCl e a concentração de sítios redox na superfície do eléctrodo para os eléctrodos PNR/MWCNT/GC a partir do pico (i).

Quantidade de MWCNT (% m/v)		0,2 %			1,0 %		
	GC	$MWCNT_{Sig}$	$MWCNT_{Shu}$	$MWCNT_{Nan}$	$MWCNT_{Sig}$	$MWCNT_{Shu}$	$MWCNT_{Nan}$
A_{ele} / cm^2	0,21±0,004	0,31±0,015	0,31±0,008	0,33±0,007	0,75±0,010	0,72±0,010	0,91±0,010
(A_{ele}/A_{geo}) / %	75	111	111	118	268	257	325
C / mF cm^{-2}	0,090±0,003	0,81±0,02	0,24±0,01	1,64±0,01	5,62±0,08	1,81±0,01	9,41±0,04
k_0 x 10^{-3} / cm s^{-1}	2,7	6,7	4,7	7,1	17,9	16,4	19,5
PNR/MWCNT: sitios redox na superfície / nmol cm^{-2}	4,9	7,1	6,7	9,7	14	19	22

Comparando as diferentes marcas de nanotubos, Fig. 3.1, a concentração mais elevada, Fig. 3.1.b conduz à formação de picos mais acentuados e com uma separação de picos mais pequena (≈ 63 mV), sugerindo o aumento da reversibilidade electroquímica. Ao mesmo tempo as correntes de base aumentam, o que indica que a área de superfície não electroactiva também é aumentada pelos CNTs.

Tabela 3.2 - Equações da corrente de pico *vs*. $v^{1/2}$ (v in mV s^{-1}).

MWCNT (1%))	I_{pa} / µA	I_{pc} / µA
GC	$-3{,}1 + 140{,}2\ v^{1/2}$	$2{,}1 - 140{,}1\ v^{1/2}$
$MWCNT_{Sig}$	$-19{,}3 + 487{,}2\ v^{1/2}$	$11{,}4 - 489{,}1\ v^{1/2}$
$MWCNT_{Shu}$	$-7{,}5 + 502{,}5\ v^{1/2}$	$7{,}4 - 502{,}8\ v^{1/2}$
$MWCNT_{Nan}$	$-3{,}1 + 530{,}1\ v^{1/2}$	$1{,}58 - 610{,}2\ v^{1/2}$

O cálculo da área electroactiva foi efectuado recorrendo à equação Randles-Sevcik

$$I_p = 2.69\times10^5 A D^{1/2} n^{3/2} v^{1/2} C \qquad (3.1)$$

onde I_p é o pico de corrente de oxidação (A), A é a área electroactiva A (cm^2), D é o coeficiente de difusão das especies electroactivas ($cm^2\ s^{-1}$), n o numero de electrões transferidos, v a velocidade de varrimento ($V\ s^{-1}$), e C a concentração da especie redox na solução ($mol\ cm^{-3}$) [2]. O coeficiente de difusão para o hexacianoferrato (II) numa solução de KCl 0,1 M para o eléctrodo de carbono vítreo não modificado foi calculado a partir da técnica de amperometria a potencial constante como está descrito em [2]. O valor da constante de difusão obtido foi de $6{,}20\times10^{-6}\ cm^2\ s^{-1}$.

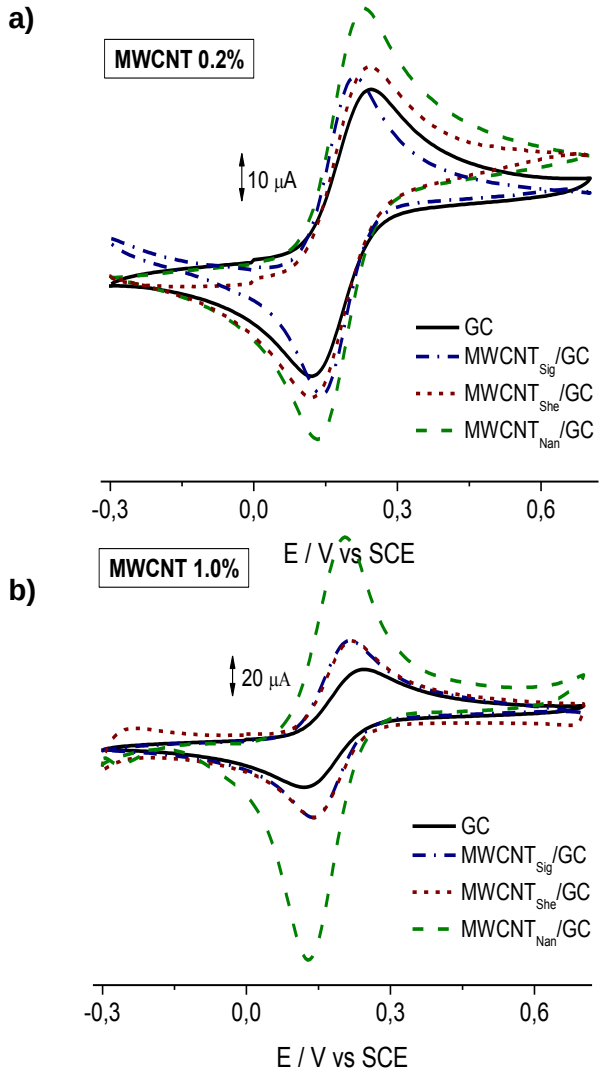


Figura 3.1 - Voltamogramas cíclicos com as correntes de base subtraídas, obtidos a 50 mV s^{-1} em eléctrodos de GC modificados com MWCNT (a) 0,2% (m/v) e (b) 1% (m/v) numa solução 0,1 M de KCl com 1 mM de $K_4Fe(CN_6)$.

Na Tabela 3.1 estão representados os valores para as áreas electroactivas calculadas (A_{ele}) e a razão entre as áreas electroactivas e geométricas. Verifica-se imediatamente que nem toda a área geométrica do eléctrodo de GC responde electroquimicamente, e que a presença dos nanotubos de carbono leva a um aumento da área electroactiva. Esse aumento está relacionado com a concentração utilizada bem como com a marca dos nanotubos usados. Estas experiências foram efectuadas três vezes a fim de se testar a reprodutibilidade e os resultados obtidos foram concordantes.

Relativamente aos voltamogramas cíclicos obtidos (Fig.3.1), a diferença entre os valores de potencial para os picos de oxidação e redução foram mais largos do que o valor ideal, para cinéticas rápidas de eléctrodo que deveria ser de 57 mV (secção 1.6.2.1). Este afastamento do valor teórico é de certa forma comum em superfícies de eléctrodo de carbono [210], e observa-se também que aumenta ligeiramente com o aumento da velocidade de varrimento. Recorrendo aos valores obtidos para a área electroactiva, foi possível calcular a constante de transferência de carga, k_0, como vem descrito em [2]. Eléctrodos com uma maior quantidade de nanotubos depositados apresentam um comportamento mais reversível, indicando que a modificação do eléctrodo de GC com estas nanopartículas vai facilitar o transporte de carga e desta forma melhorar o comportamento do eléctrodo.

3.4. Electropolimerização do vermelho neutro

Tal como está mencionado anteriormente (secção 3.2) para deposição em filmes de carbono, o melhor procedimento encontrado para a electropolimerização do NR foi o aquele usado para a electropolimerização NR em CF, KPBS 0,025 M + KNO_3 0,1 M. Estudos prévios demonstraram que a protonação do Leuco-NR e NR é dependente do pH [94]. O estudo de pH foi efectuado e assim sendo, verificou-se que ao variar o pH da solução de tampão de fosfato entre 5 e 8, os melhores resultados para a electropolimerização ocorriam para pH 5,5.

A electropolimerização foi efectuada por voltametria cíclica varrendo o potencial durante quinze ciclos entre -1,0 e + 1,0 V *vs* SCE utilizando uma velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1}, correspondente aproximadamente a 20 minutos. Observou-se que os voltamogramas obtidos (Fig. 3.2.), ou seja, correntes capacitivas e valores de correntes de pico obtidas para GC são muito semelhantes aquelas observadas em trabalhos anteriores em filmes de carbono e previamente publicados [207], o que evidencia a grande robustez e reprodutibilidade deste monómero em relação à sua electropolimerização em diferentes substratos de carbono.

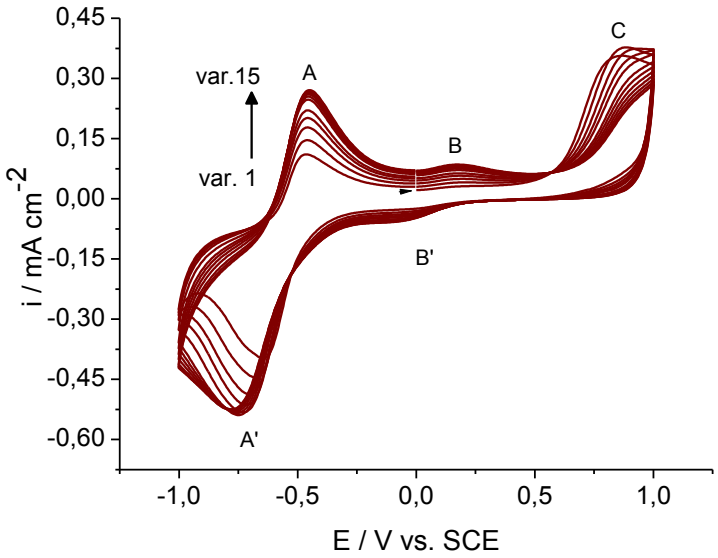


Figura. 3.2 - Electropolimerização do NR no eléctrodo de carbono vítreo. Solução NR 1,0 mM em KPBS 0,025 M + KNO_3 0,1 M pH 5,5. Velocidade de varrimento 50 mV s^{-1}.

Foi observado em estudos anteriores que os aniões NO_3^- apresentam um efeito catalítico na electropolimerização de corantes fenazínicos [94, 211] influenciando a forma dos voltamogramas bem como a intensidade dos picos, não tendo, no entanto, nenhuma influência no potencial formal. Assim sendo, as restantes polimerizações foram feitas na presença de NO_3^-, uma vez que os filmes resultantes nesta solução electrolítica mostravam ser mais espessos e os picos voltamétricos mais bem definidos.

3.4.1 Mecanismo de reacção

A electropolimerização inicia-se com a adsorção do monómero na superfície do eléctrodo, seguida da sua oxidação a potenciais mais positivos. A oxidação resulta na formação de um radical catiónico e nucleação na superfície que por sua vez inicia a polimerização, com o natural crescimento da cadeia polimérica. Uma vez que o monómero vermelho neutro tem um grupo amina primário como substituinte de anel, o radical catião vai ser formado a ≈ +0,85 V *vs.* SCE e vai atacar o anel aromático numa posição *ortho* livre de um grupo $–NH_2$. Esta oxidação irreversível do monómero pode ser observada na Fig. 3.2 (pico C). Desta forma o polímero PNR vai ser provavelmente composto de

unidades fenazínicas ligadas através de uma função orgânica amino secundária, como se observa na Fig. 3.3.Observa-se também que esta oxidação irreversível do monómero se desloca com o aumento do número de ciclos para potenciais mais positivos, possivelmente devido a modificações causadas pela formação do filme de PNR e alterações de pH na superfície do eléctrodo.

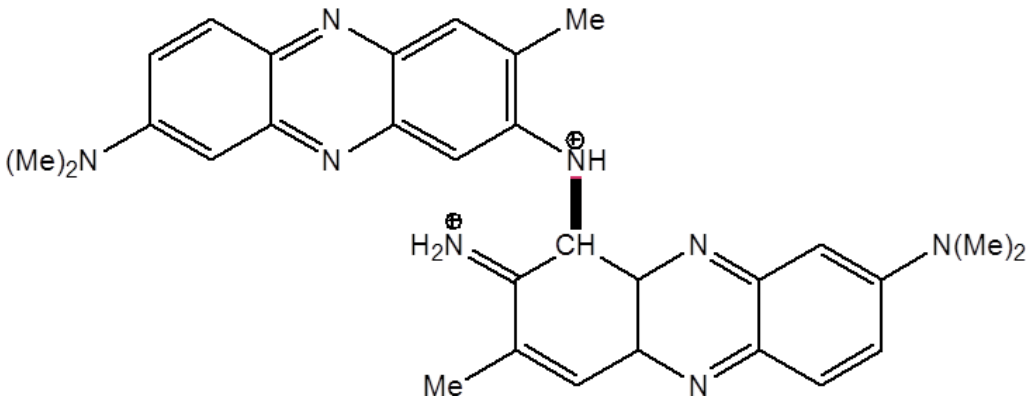


Figura 3.3 - Formação possível para um dímero de vermelho neutro [207].

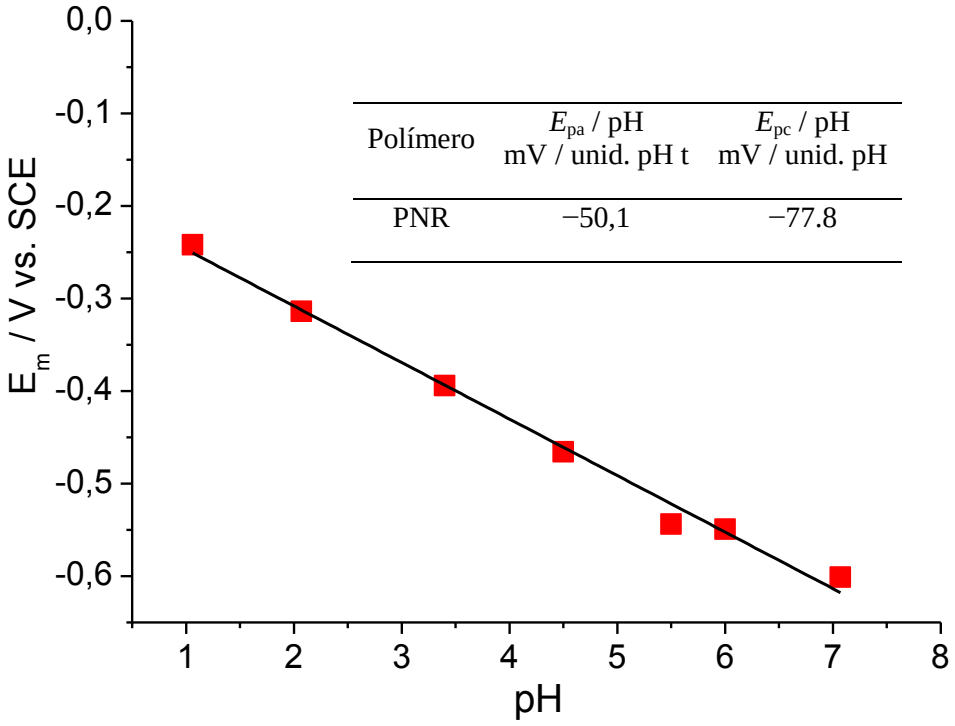
Por volta de -0,43/-0,65 V observa-se o par redox relativo à oxidação/redução do polímero (Fig. 3.2.), que ao mesmo tempo se sobrepõe com os picos correspondentes à transformação reversível de NR para leuco-NR (picos A e A'). O aumento da intensidade destes picos é indicativo do crescimento do filme polimérico, onde se verifica que o pico catódico A' se desloca para potenciais mais negativos com o aumento dos varrimentos tornando-se mais largo. Este efeito está provavelmente relacionado com a ramificação de cadeias poliméricas e a consequente modificação da superfície do eléctrodo [212].

3.4.2 Efeito do pH

Uma das maiores desvantagens de um mediador poliaromático com dois electrões-protões aceitadores/dadores [213], como é o caso do PNR é a dependência de pH do seu potencial de meia-onda (E_m) [214, 215]. De forma a ultrapassar este obstáculo, diversos investigadores procuraram desenvolver novos materiais de eléctrodo e novas formas de imobilizar estes corantes orgânicos, de forma que os potenciais formais não variem com as mudanças de pH [216-218].

É então necessário investigar a variação do potencial de meia onda com o pH para o PNR, uma vez que esta variação vai influenciar o potencial onde o biossensor mediado por este polímero poderá ser usado.

De forma a determinar o potencial de meia onda, recorreu-se à técnica de voltametria cíclica para analisar o eléctrodo modificado PNR/GC com a velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} em diferentes soluções tampão, com pH que vão desde 1 até 7. E_m foi calculado como sendo a média dos potencias de pico anódico e catódico ($E_m = (E_{pa} + E_{pc})/2$) e usado como uma aproximação ao valor do potencial $E^{o\prime}$. Na Fig. 3.4, vem representado o potencial de meia onda do PNR versus o pH.



Polímero	E_{pa} / pH mV / unid. pH t	E_{pc} / pH mV / unid. pH
PNR	−50,1	−77.8

Figura 3.4 - Valores de E_m *vs.* pH em diferentes tampões, velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1}.

Observando a Fig. 3.4, verifica-se que os valores de $E^{o\prime}$ diminuem linearmente com o aumento do pH da solução tampão, e o valor das curvas para E_{pa} e E_{pc} *versus* os gráficos de pH (ver *inset*) mostram que neste processo redox estão envolvidos o mesmo número de electrões e de protões.

3.4.3 Influência do CNT na electropolimerização do vermelho neutro

Como se observou anteriormente, a electropolimerização do vermelho neutro inicia-se com a adsorção do monómero e a formação do radical catião a potenciais positivos, seguida pelo crescimento da cadeia polimérica. A partir da Fig. 3.5, é facilmente observável que o NR electropolimeriza mais facilmente em eléctrodos de carbono vítreo revestidos com MWCNT do que em eléctrodos sem qualquer revestimento. Os picos NR/Leuco-NR (par A) aparecem menos bem definidos na presença dos nanotubos de carbono (Fig. 3.5) mas por sua vez o par redox B observa-se muito melhor que no caso em que temos só o eléctrodo de carbono vítreo. Verifica-se também o aparecimento de uma onda redox entre estes 2 pares, provavelmente devido a uma oxidação em dois-passos do NR para leuco-NR [111, 219].

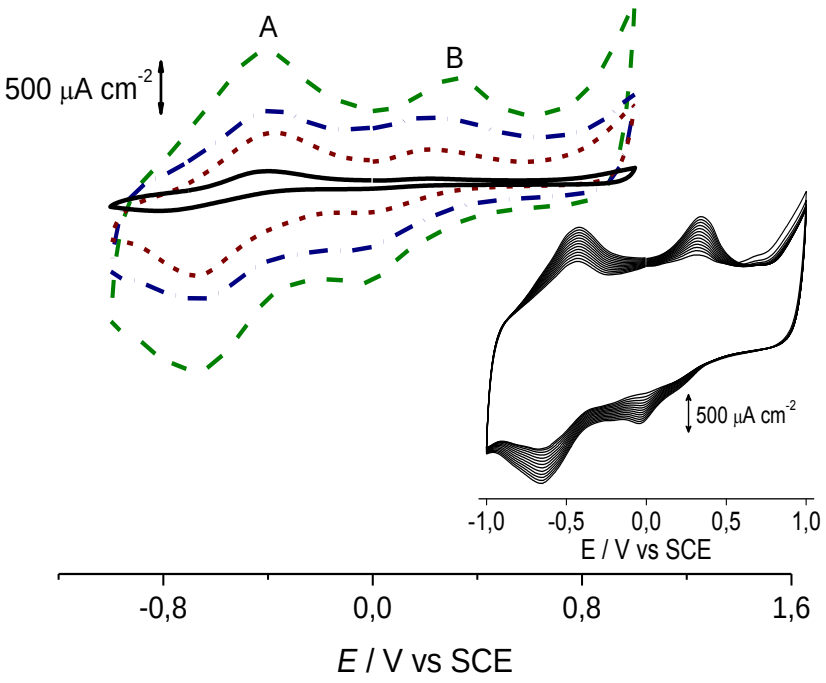


Figura 3.5 - Voltamogramas cíclicos em GC (—) e GC modificado com MWCNT proveniente de (– • –) Sigma, (- -) Shenzhen e (– –) NanoLab em KPBS à velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1}. Picos (A) e (B) representam os dois pares redox do PNR. *Inste* mostra a electropolimerização de NR no eléctrodo modificado $MWCNT_{Nan(1\%)}$/GC.

A reacção redox do monómero e do oligómero que se forma durante a electropolimerização para eléctrodos modificados com MWCNT ocorre no potencial $E^{o\prime} \approx$ -0,41 V *vs* SCE, enquanto a $E^{o\prime} \approx$ +0,31 V *vs* SCE ocorre a reacção redox do polímero

e oligómero. Além disso, foi observado um aumento maior nas correntes de pico do PNR para ambos os pares redox (A e B), na presença de concentrações mais altas de nanotubos. Este aumento poderá ser devido ao facto de que os MWCNT podem ser capaz de fornecer uma via mais fácil de transferência de electrões e desta forma melhorar o processo de polimerização.

Na Fig. 3.6 é comparada a influência da marca e da concentração dos MWCNT em termos da capacidade de carga de cada eléctrodo modificado. Anteriormente verificou-se que o aumento da espessura do filme de polímero é proporcional à capacidade de carga e está directamente ligado à quantidade de nanotubos presentes na superfície do eléctrodo. É possível verificar claramente esse comportamento electroquímico e também a influência que a proveniência dos nanotubos tem neste processo redox. Observa-se que os CNT provenientes da NanoLab demonstram uma maior capacidade de carga (≈25%) para todos os tipos de modificação (diferentes cargas de CNT, com ou sem PNR).

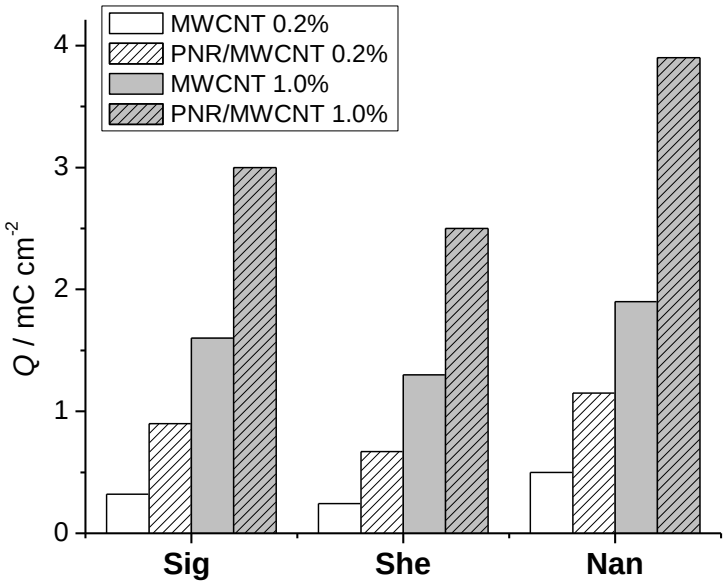


Figura 3.6 -Valores da carga correspondente à oxidação do polímero para os eléctrodos de GC modificados com diferentes marcas e concentrações de MWCNT.

A influência da presença de MWCNT foi quantificada através do cálculo da concentração de PNR adsorvido à superfície (Γ), para cada eléctrodo modificado. Os voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} foram utilizados para obter as cargas (*Q*) envolvidas em cada um dos processos (A) e (B). Os valores

obtidos foram substituídos na equação $\Gamma = Q / (nFA)$ onde n é o número de electrões, A é a área de eléctrodo (cm^2) e F é a constante de Faraday. Como foi referido anteriormente a actividade redox do PNR em GC / MWCNT é um processo electroquímico que envolve dois electrões e dois protões [213], assim $n = 2$. Na Tabela 3.1 vêm os respectivos valores calculados para cada uma das modificações de eléctrodo.

Em relação ao tipo e concentração de nanotubos, os resultados obtidos a partir de voltametria cíclica são coerentes com as quantidades relativas de PNR presente sobre os diferentes eléctrodos. A partir da Tabela 3.1, observa-se que os MWCNT da NanoLab são os mais adequados para a electropolimerização de NR, devido aos valores de Γ obtidos que foram mais elevados para este fornecedor, e que a concentração mais elevada de CNT conduz a um aumento da quantidade de PNR polimerizada, observação que também foi efectuada anteriormente através da obtenção de correntes de pico maiores para estas mesmas concentrações.

Diferentes grupos de pesquisa, em trabalhos anteriores observaram que o passo determinante no processo de electropolimerização de PNR é bastante complicado, porque os picos anódico e catódico do PNR apresentavam um comportamento diferente dependendo do processo de compensação de carga no filme [220]. A difusão através dos filmes PNR foi considerado o passo determinante para o eléctrodo de ITO [213], ou para ouro [210] em baixos valores de pH e também em eléctrodos de filme de carbono [207].

Posteriormente, estudou-se a resposta dos voltamogramas cíclicos para o eléctrodo de GC modificado com PNR para diferentes velocidades de varrimento. Os CVs foram então registados em KCl 0,1 M para diferentes velocidades compreendidas entre 10 mV s^{-1} até 200 mV s^{-1} (Fig. 3.7). As correntes de pico, tanto anódicas e catódicas, obtidas são linearmente dependentes da raiz quadrada da velocidade de varrimento, característica de estarmos presentes perante um processo controlado por difusão (*inset* Fig. 3.7).

Um comportamento semelhante foi observado por Hong [221] e Liu [222]. Neste caso particular, a difusão do contra-ião do electrólito para dentro e para fora do polímero de modo a manter a electro-neutralidade, controla o processo electroquímico. De salientar

que para os PNR/MWCNT$_{0,2\%}$/GC, o processo apresenta o mesmo comportamento electroquímico.

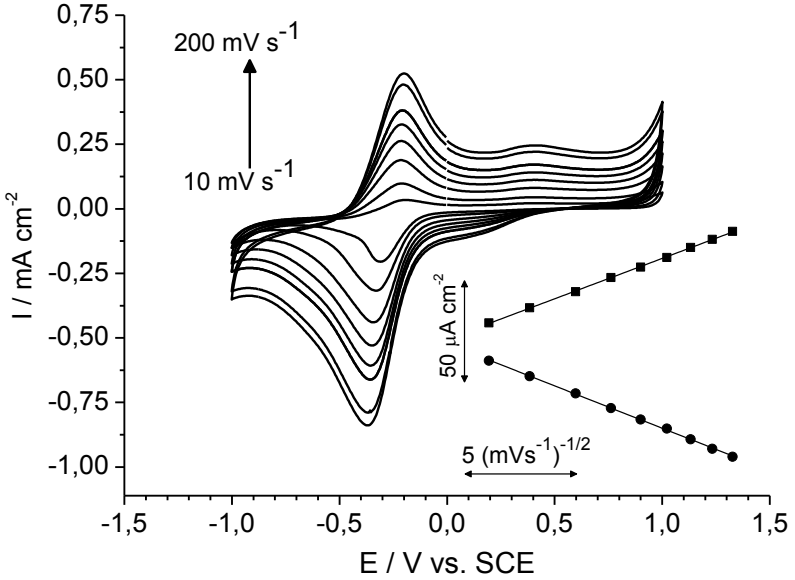


Figura 3.7 - CVs de PNR/GC a diferentes velocidades de varrimento em 0,1 M KCl; o *inset* corresponde à variação das intensidades de pico anódica e catódica *versus* a raiz quadrada da velocidade de varrimento.

No entanto, para uma concentração mais elevada de MWCNT, a Fig. 3.8 mostra que I_p depende linearmente de velocidade de varrimento, até 200 mV s^{-1} para ambos os picos anódicos A e B, (ver *inset* Fig. 3.7), indicando um processo controlado poe espécies imobilizadas ou adsorvidas na superfície, e de acordo com vários artigos [223-225], na presença da transição para o comportamento de camada-fina (*thin-layer behaviour*).

Deve-se salientar, que a dependência linear da intensidade dos picos com a velocidade de varrimento observado para os eléctrodos PNR/MWCT$_{1\%}$/GC também seria obtido se houvesse adsorção de alguma espécie na camada superficial, demonstrando que a distinção entre estes dois processos não é fácil de fazer [226].

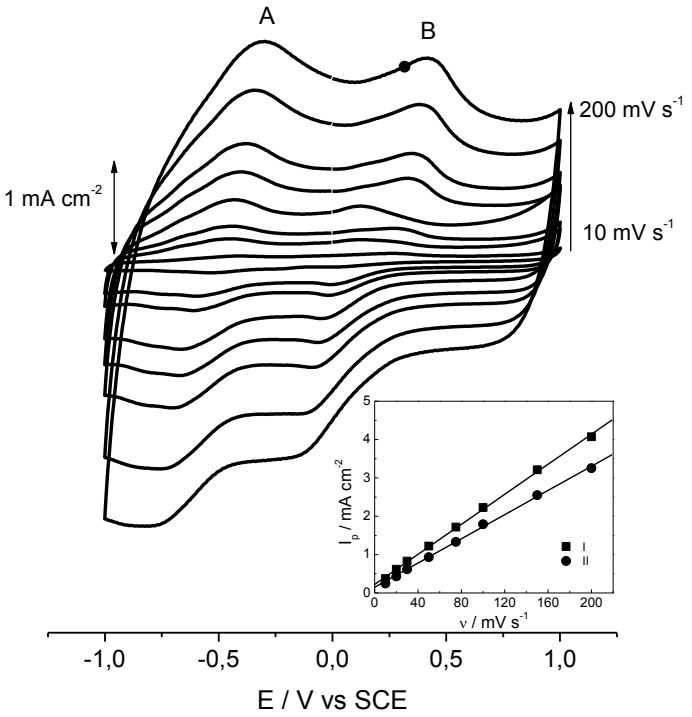


Figura. 3.8 - Voltamogramas cíclicos de PNR/MWCNT$_{Nan\ (1\%)}$/GC em KPBS para diferentes velocidades de varrimento desde 10 até 200 mV s^{-1}; o *inset* corresponde à variação das intensidades de pico anódica (A e B) *vs* a velocidade de varrimento.

3.5 Microscopia de varrimento electrónico

Como foi referido anteriormente (1.8.3) a técnica de SEM pode fornecer informações sobre a morfologia da superfície do eléctrodo. Para este efeito, PNR, MWCNT$_{Nan}$ e MWCNT$_{Nan}$ / PNR filmes compósitos foram preparados num substrato de óxido de índio e estanho (ITO) sob condições semelhantes às utilizadas para preparar os mesmos filmes em GC (experiências de voltametria cíclica mostraram comportamento semelhante no substrato de GC). A Fig. 3.9A mostra o PNR sobre a superfície do eléctrodo ITO. Observa-se que o PNR por si só, organiza-se em pequenos aglomerados que se distribuem de forma aleatória pelo substrato; a superfície ITO nua é mostrada na caixa pontilhada.

Na Fig. 3.9B, a presença de MWCNTs é facilmente observada – os nanotubos de carbono de paredes múltiplas formam feixes (*bundles*) quando grandes quantidades dos

mesmos são imobilizadas sobre uma superfície do eléctrodo [210]. O aumento da área electroactiva em comparação com a Fig. 3.9A é facilmente deduzida.

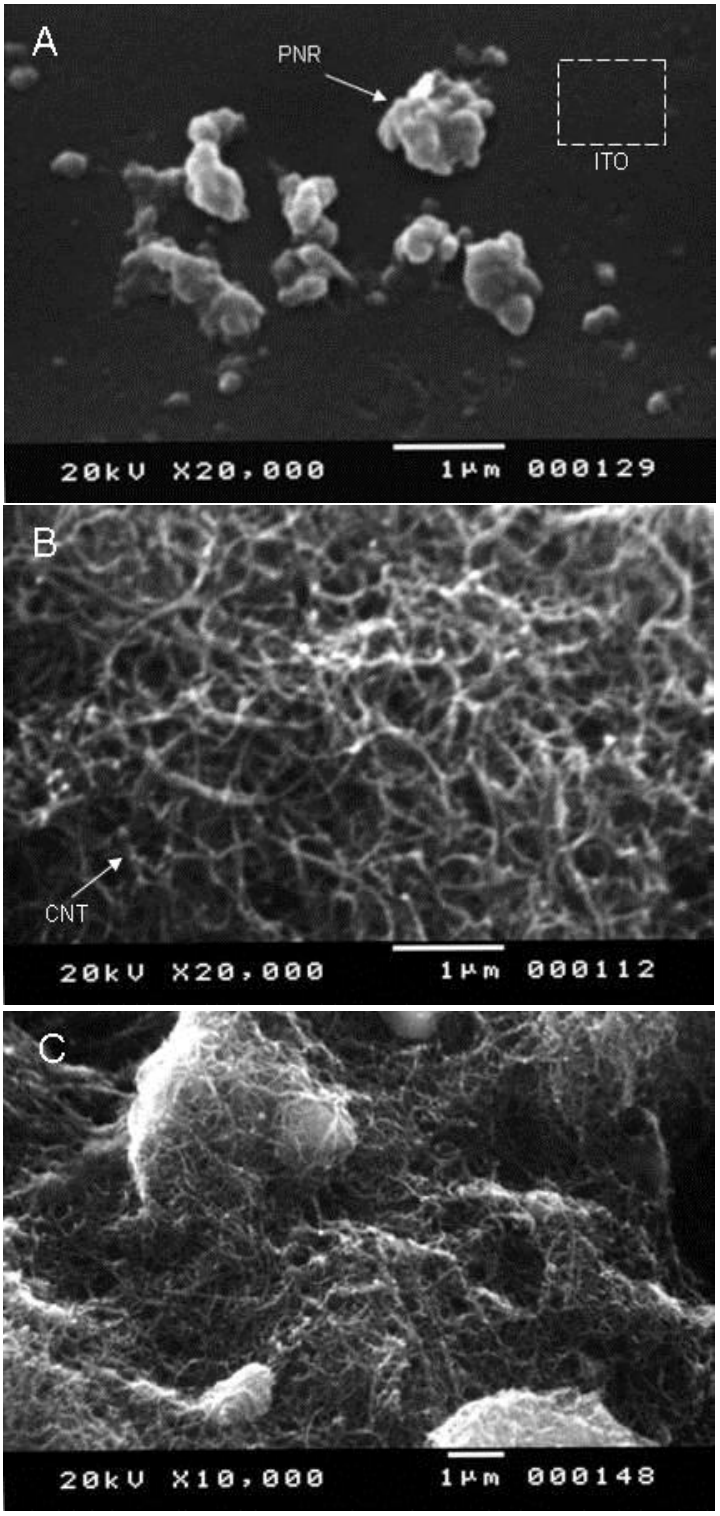


Figura. 3.9 - Microscopia de varrimento electrónico em eléctrodos de ITO modificados (A) PNR, (B) $MWCNT_{Nan\ (1\%)}$, (C) $PNR/MWCNT_{Nan\ (1\%)}$.

Devido à carga, as dimensões laterais dos MWCNTs nestas imagens SEM aparecem sempre ser significativamente maiores do que realmente são, resultando numa falsa noção da cobertura superficial. A imagem na Fig. 3.9C está de acordo com as observações nas secções anteriores, isto é, que a quantidade de PNR na superfície aumenta quando NR é polimerizado sobre um eléctrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT.

3.6. Oxidação electroquímica do ascorbato

O ácido ascórbico (vitamina C) desempenha um papel importante nos processos bioquímicos de organismos vivos. Está presente em muitos fluidos biológicos, produtos farmacêuticos, refrigerantes e sumos. A detecção directa e selectiva de ascorbato em eléctrodos convencionais ou de metal é difícil devido ao seu grande sobrepotencial e envenenamento do eléctrodo por produtos de oxidação [227]. Muitas tentativas têm sido relatadas para reduzir o sobrepotencial usando mediadores activos para a electro-oxidação catalítica de ascorbato, por exemplo Hexacianoferrato de cobre [163], fosfato de cobre (II) [228], polianilina / poli (N-metilanilina) [229, 230], Azul da Prússia [231], e até mesmo usando ascorbato oxidase [232]. O polímero de acetato de celulose também tem sido utilizado para a construção de sensores de ascorbato, como uma membrana fundida para compostos redox, tais como azul-de-metileno [233] ou 2,6-diclorofenolindofenol [234, 235].

A aplicação destes eléctrodos GC-modificados como sensores para ascorbato através de oxidação electrocatalítica foi estudada em KPBS pH 5,5.

3.6.1 Voltametria cíclica

Exemplos típicos de voltamogramas cíclicos são apresentados na Fig. 3.10. Como é observável a partir da Fig. 3.10a. a oxidação de 1 mM de ascorbato no eléctrodo $MWCNT_{She\ (0,2\%)}$ / GC ocorreu de forma irreversível por volta de + 0,20 V *vs* SCE, enquanto para uma concentração mais elevada (1% (m/v)), a oxidação sucedeu a um

potencial mais baixo + 0,08 V *vs* SCE (Fig. 3.10c). De salientar que para o eléctrodo de carbono vítreo sem qualquer modificação e sob as mesmas condições, o pico de oxidação para o ascorbato aparece por volta de + 0,45 V *vs* SCE (dados não mostrados). Portanto, os MWCNT mostram ter um efeito eletrocatalítico sobre a oxidação de ascorbato promovido por grupos funcionais que contêm oxigénio. O mesmo comportamento foi também referenciado por Kuznetsova [236].

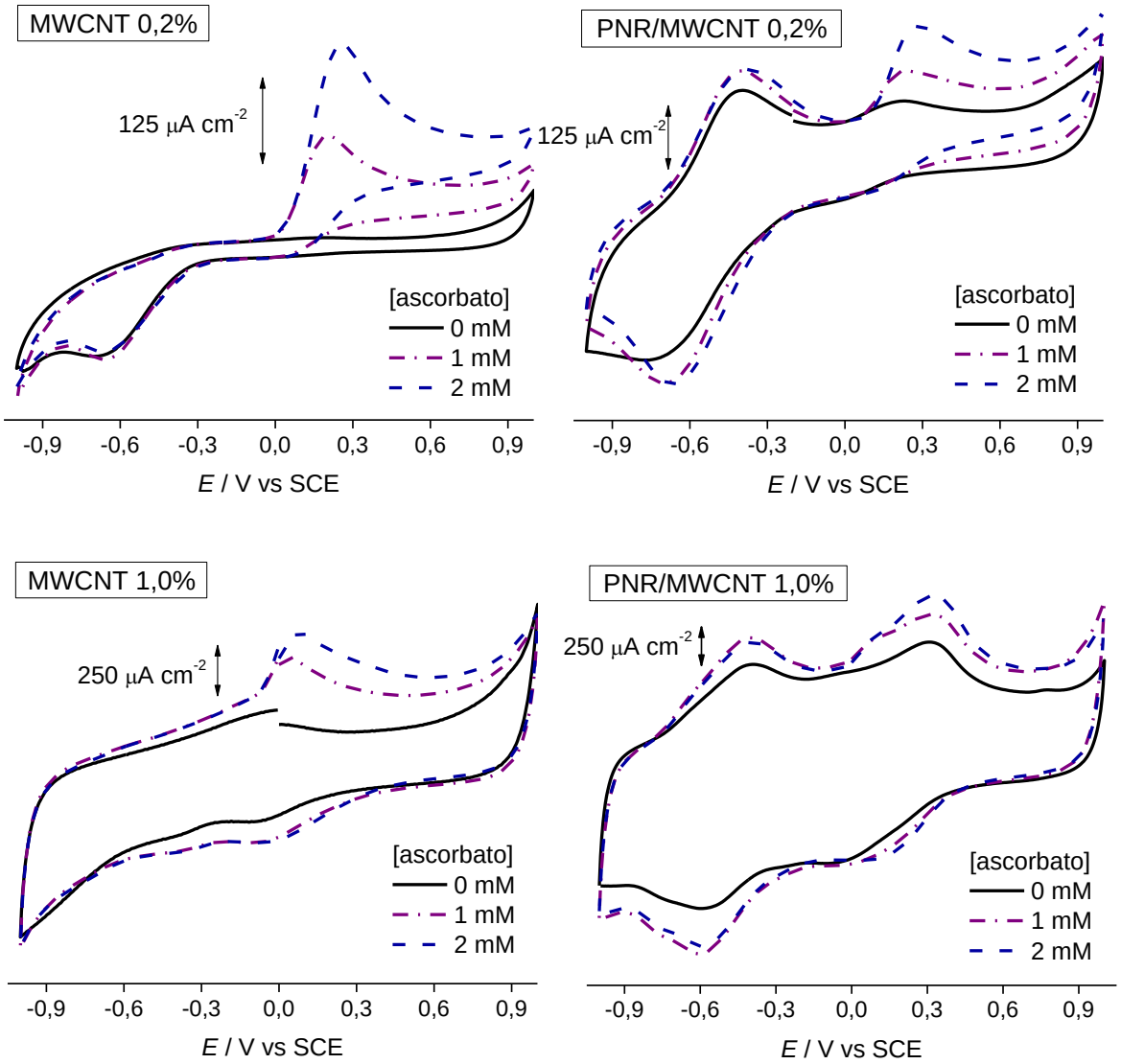


Figura. 3.10 - Voltamogramas cíclicos de eléctrodos de GC modificados $MWCNT_{She}$ e $PNR/MWCNT_{She}$ na presença de diferentes concentrações de ascorbato em KPBS pH 5.5. Velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1}. (a) $MWCNT_{She}$ (0,2% m/v) (b) $MWCNT_{She}$ (1.0% m/v).

A Tabela 3.3 mostra os potenciais de pico das três marcas de nanotubos para as diferentes concentrações. Observa-se que que o maior efeito eletrocatalítico é verificado com a modificação $MWCNT_{Nan(1\%)}$/GC em +0,07 V *vs* SCE. Com o aumento da concentração de nanotubo, verificou-se um aumento na corrente de fundo e na corrente de pico relativa à oxidação do ascorbato de aproximadamente 70% para o eléctrodo $MWCNT_{Nan}$/GC. Os benefícios do decréscimo do sobrepotencial e aumento de corrente do pico de oxidação são visíveis comprovam que os eléctrodos modificados com nanotubos proporcionam maior sensibilidade e selectividade em relação ao eléctrodo de GC, mesmo para a concentração de nanotubo mais baixa.

Os valores correspondentes às correntes de pico redox dos eléctrodos modificados com PNR relativamente à oxidação do ascorbato são também apresentados na Tabela 3.3. Voltamogramas cíclicos da Fig. 3.10a e 3.10b mostram que o eléctrodo $MWCNT_{She}$/PNR/GC apresenta resposta electroquímica para a presença de ácido ascórbico.

Tabela 3.3 - Potencial de pico e corrente de pico para 2 mM ascorbato, a partir de voltametria cíclica nos eléctrodos MWCNT/GC e PNR/MWCNT/GC.

	CNT 0,2%		CNT 1,0%	
Eléctrodos	E_p / V	I_p / µA	E_p / V	I_p / µA
$MWCNT_{Sig}$/GC	0,229	315	0,047	1063
$MWCNT_{She}$/GC	0,257	298	0,033	719
$MWCNT_{Nan}$/GC	0,225	420	0,071	1116
PNR/$MWCNT_{Sig}$/GC	0,271	356	0,129[a] 0,324[b]	1298[a]
PNR/$MWCNT_{She}$/GC	0,282	286	0,328[b]	1126
PNR/$MWCNT_{Nan}$/GC	0,251	480	0,129[a] 0,332[b]	1404[a]

a) pico de oxidação do ascorbato, b) Pico de oxidação de PNR na presença de ascorbato.

Ao contrário, sem PNR, o ascorbato é oxidado aproximadamente ao mesmo potencial que o do oligómero e do polímero, resultando numa sobreposição da resposta voltamétrica. Assim, embora os eléctrodos modificados com PNR respondam a diferentes concentrações de ascorbato, o aumento da corrente de pico de oxidação é devido não só à presença do analito, como também à reorganização do polímero na superfície do eléctrodo. Além disso, os eléctrodos modificados com nanotubos de carbono a 1% *(*m/v*)* de Sigma e NanoLab apresentaram comportamentos diferentes daqueles provenientes de Shenzhen. Uma divisão nos picos para as oxidações de PNR e ascorbato é observada, com a oxidação de ascorbato a ocorrer a potenciais inferiores (Tabela 3.3). Isto é extremamente importante para aplicações analíticas, e mostra que a proveniência dos nanotubos utilizados para a modificação da superfície PNR/GC pode aumentar e separar as respostas de oxidação, devido ao melhoramento da actividade electrocatalítica [237] providenciada por cada marca de nanotubo.

Alguns autores aconselham cautela aquando a atribuição de propriedades electrocatalíticas únicas somente a nanotubos de carbono [236]. Quando os nanotubos de carbono são purificados por solubilização ou quimicamente tratados, é importante considerar também os possíveis efeitos do processo de funcionalização química dos nanotubos de carbono. Os métodos de solubilização podem resultar num processo de revestimento da superfície CNT, ou atacar a estrutura CNT (no caso de sonicação), e estes factores podem afectar o desempenho dos mesmos. Portanto, a compreensão da influência desses tratamentos é um passo indispensável aquando a avaliação das propriedades electroquímicas dos nanotubos de carbono [236].

3.6.2 Amperometria a potencial fixo

A determinação eletroanalítica de ascorbato por amperometria a potencial fixo foi realizada a 0,0 V, + 0,05 V e + 0,1 V *vs* SCE, a fim de optimizar o valor de potencial aplicado (dados não mostrados). A 0,0 V *vs* SCE apenas os eléctrodos modificados com a concentração mais elevada de MWCNT reagiu e assim + 0,05 V *vs* SCE foi o potencial escolhido para experiências adicionais, uma vez que neste potencial todos os conjuntos de

eléctrodos tiveram uma resposta suficientemente boa para permitir a determinação de ascorbato na gama micromolar Fig. 3.11.

Parâmetros analíticos calculados a partir de curvas de calibração em 0,05 V *vs* SCE são dados na Tabela 3.4. Como esperado, a + 0,05 V *vs* SCE a sensibilidade obtida foi menor para o eléctrodo de carbono vítreo não modificado (1,2 ± 0,07 µA mM^{-1} cm^{-2}) e o limite de detecção foi mais elevado 13,9 µA. Nos eléctrodos revestidos com MWCNT 0,2% (m/v) um aumento de 100 vezes na sensibilidade para o ascorbato foi encontrado em relação com carbono vítreo sem modificação. Para os eléctrodos com a concentração mais alta de MWCNT, o aumento da sensibilidade foi maior, com valores de cerca de 300 µA mM^{-1} cm^{-2}. Estes valores mais altos eram esperados uma vez que para estes eléctrodos temos um aumento da área electroactiva. Em comparação com alguns resultados publicados, os resultados obtidos mostraram uma grande melhoria nos parâmetros analíticos referidos [138, 163, 223]. A modificação com $MWCNT_{Nan}$ levou à melhor resposta electroquímica, obtendo-se maior sensibilidade e menores limites de detecção. Mesmo sem o mediador redox PNR, o limite de detecção obtido foi de 4 µM. Este limite de detecção é menor do que para outros sensores de ascorbato descritos na literatura tais como referido por Jurevičiūtė [229] que apresentava um LOD de 50 µM ou aqueles relatados em [228, 233, 235] que apresentavam valores na gama de 10 até 15 µM, e comparável com outros sensores amperométricos para a detecção de ascorbato com limites de detecção entre 1.5 e 5 µM [163, 230, 232, 238, 239].

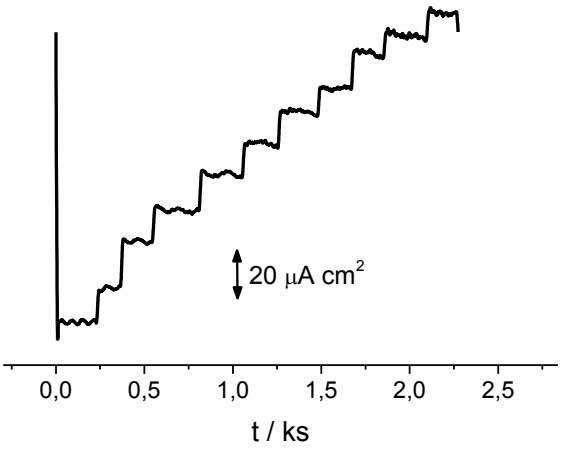
A resposta linear ($R^2 \approx 0,999$) obtida foi até 800 µM, resultado esse que foi igual para todos os eléctrodos modificados, em comparação com 80 µM de GC e 140 µM nos eléctrodos de PNR/GC.

Em relação à influência de PNR, um aumento de 15% na sensibilidade foi observado para os eléctrodos modificados com $PNR/MWCNT_{(0,2\%)}$ (Tabela 3.4) em comparação com os valores obtidos na ausência de polímero. No entanto, para os eléctrodos $MWCNT_{(1\%)}$, a presença do filme de polímero não providencia qualquer aumento adicional na sensibilidade para a oxidação de ascorbato (Fig. 3.11b), ao contrário do que foi observado por voltametria cíclica.

Tabela 3.4 - Parâmetros analíticos obtidos a partir das curvas de calibração para o eléctrodo de GC e para os eléctrodos de GC MWCNT e PNR/MWCNT +0,05V *vs* SCE, em KPBS pH 5,5.

MWCNT (% m/v)		0,2%			1%		
	GC	$MWCNT_{Sig}$	$MWCNT_{She}$	$MWCNT_{Nan}$	$MWCNT_{Sig}$	$MWCNT_{She}$	$MWCNT_{Nan}$
Sensib. (µA cm^{-2} mM^{-1})	1,2±0,1	169,4±1,1	147,0±0,9	201,5±0,7	357,8±0,6	334,9±0,5	383,7±0,6
LOD (µM)	13,9±0,2	8,5±0,1	9,2±0,3	7,6±0,3	5,3±0,2	5,9±0,1	4,3±0,1
Coef. de correlação (R^2)	0,9987	0,9992	0,9993	0,9996	0,9985	0,9991	0,9991
	PNR/GC	$PNR/MWCNT_{Sig}$	$PNR/MWCNT_{She}$	$PNR/MWCNT_{Nan}$	$PNR/MWCNT_{Sig}$	$PNR/MWCNT_{She}$	$PNR/MWCNT_{Nan}$
Sensib. (µA cm^{-2} $µM^{-1}$)	4,3±0,3	200,2±1,2	187,6±0,9	219,8±0,4	331,1±0,8	303,5±1,1	375,2±0,8
LOD (µM)	12,1±0,3	8,8±0,1	8,7±0,2	7,3±0,3	5,3,±0,1	6,1±0,3	4,7±0,3
Coef. de correlação (R^2)	0,9989	0,9992	0,9992	0,9992	0,9997	0,9992	0,9993

a)



b)

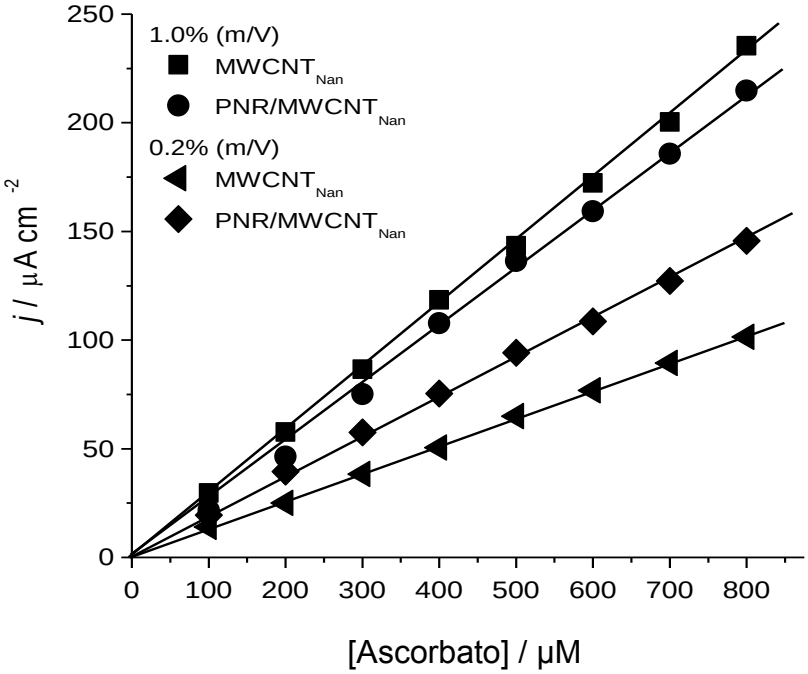


Figura. 3.11 Determinação de potencial por amperometria a potencial fixo de + 0,05 V *vs* SCE nos eléctrodos modificados $MWCNT_{Nan}$ e $PNR/MWCNT_{Nan}$.
(a) Resposta amperométrica típica para $PNR/MWCNT_{Nan}$/GC, para adições sucessivas de 100 µM de ascorbato em KPBS pH 5,5.
(b) Curvas de calibração para diferentes eléctrodos.

3.7 Estabilidade dos eléctrodos GC modificados

A estabilidade dos eléctrodos é também um factor muito importante a ter em consideração aquando o estudo e desenvolvimento de um sensor. Com esse objectivo, foi medida nos diferentes eléctrodos modificados, a amplitude da corrente de pico de oxidação para uma concentração de 2 mM de ascorbato após serem sujeitos a 200 ciclos a uma velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} numa solução tampão de KPBS pH 5,5. Posteriormente os eléctrodos foram imersos nessa mesma solução de electrólito tampão durante o período de 3 dias e seguidamente durante 4 semanas efectuando-se a mesma determinação de ascorbato nas mesmas condições após o término de cada um desses períodos de imersão. A primeira observação efectuada é que não houve diferença substancial para as diferentes marcas de nanotubos, tendo todos os MWCNT/GC apresentado o mesmo comportamento em termo de perda de resposta de sinal. Os resultados correspondentes a este estudo de estabilidade vêm apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Variação da corrente de pico de oxidação (%) para as diferentes modificações de eléctrodo, a medida foi efectuada por CV a 50 mV s^{-1}, para a adição de 2 mM de ascorbato.

Eléctrodo modificado	200 cl.	3 dias	4 sem.
MWCNT 0,2%	-4	-1	-32
PNR/MWCNT 0,2%/	-5	+2	-27
MWCNT 1,0%	-2	-5	-46
PNR/MWCNT 1,0%	-2.5	+3	-25

Verificou-se que a perda de resposta é pequena após 200 ciclos. Após 3 dias de armazenamento observa-se uma pequena diminuição de resposta quando temos o eléctrodo de GC revestido com a concentração mais pequena de nanotubos, e um pequeno aumento quando o polímero está presente. Este comportamento estará provavelmente ligado ao facto de poderem ocorrer algumas alterações conformacionais na superfície do eléctrodo. Após 4 semanas, observa-se a existência de uma diminuição significativa na resposta electroquímica, com a maior queda (46%) a suceder para o eléctrodo modificado

$MWCNT_{(1\%)}$/GC. Este comportamento pode ser explicado devido ao facto de haver uma fraca adesão dos nanotubos na superfície do eléctrodo quando se trabalha com concentrações elevadas. Este problema de adesão só se observa para tempos de imersão mais longos e não se verificou para a concentração de nanotubos mais baixa, nem para os eléctrodos polimerizados. Assim sendo, embora o filme de PNR não apresente melhorias relativamente ao aumento da sensibilidade da resposta dos eléctrodos modificados com 1% (m/v) de MWCNT, a presença do mesmo estabiliza a estrutura da superfície do eléctrodo, uma vez que actua como um aderente permitindo assim uma melhor aderência dos nanotubos de carbono ao substrato. Esta propriedade adesiva do PNR mostra ter uma maior importância, quanto mais alta for a concentração de nanotubos a ser utilizada.

3.8. Avaliação da influência da estrutura e pureza dos CNT sobre o comportamento do sensor

As diferenças na actividade electroquímica entre os eléctrodos CNT-modificados e os eléctrodos de carbono vítreo não modificados podem ser atribuídas à química de superfície (aos defeitos principalmente) dos CNT provenientes de marcas diferentes. De salientar que apesar de a origem ser diferente, a mesma metodologia de produção (CVD) foi utilizada para as três marcas de MWCNTs testadas uma vez que trabalhos anteriores [240, 241] têm afirmado que as diferenças nas actividades electrocatalíticas de eléctrodos modificados com nanotubos de carbono estão dependentes do método de fabricação. Existe por exemplo, uma diferença dramática no efeito do pré-tratamento utilizado na técnica de produção de CNTs em Arco e CVD, no comportamento electroquímico de sistemas modelo redox, tais como ácido ascórbico, NADH e hidrazina. Neste trabalho, os nanotubos utilizados foram todos produzidos pelo método de CVD, com a finalidade de se minimizar as variáveis estruturais.

Como foi mencionado anteriormente, o carbono amorfo é a forma mais reactiva de carbono presente nos CNT [242] e assim sendo, a quantidade de carbono amorfo deve ser tomado em consideração no comportamento catalítico dos CNT. Compton *et al* usando pó de grafite como electrocatalisador em vez de nanotubos, conseguiu demonstrar que este pó apresenta um comportamento catalítico similar aos CNTs [241].

Desta forma, a resposta voltamétrica (CV) de eléctrodos de GC modificados com pó de grafite (GP) foi explorada com uma solução aquosa 1 mM de ferrocianeto de potássio em 0,1 M de KCl, no intervalo de varrimento 0,01, 0,15 V s^{-1}. Os resultados obtidos mostram separação de pico um pouco maior daquela obtida na presença de nanotubos (99 mV *vs* SCE a uma velocidade varrimento de 50 mV s^{-1}) e um aumento da separação dos picos com velocidade de varrimento crescente (Fig. 3.12) sugerindo um comportamento mais afastado da reversibilidade em comparação com o obtido na presença de nanotubos.

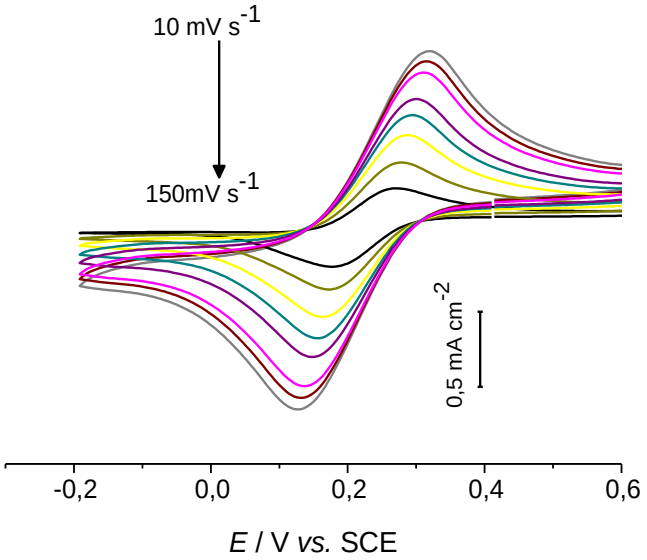


Figura 3.12 - Voltamogramas cíclicos com as correntes de base subtraídas, obtidos para diferentes velocidades de varrimento em eléctrodos de GC modificados com pó de grafite numa solução de KCl 0,1 M com $K_4Fe(CN_6)$ 1 mM.

Na Figura 3.13 são comparados os resultados obtidos para o eléctrodo de GC não modificado e os eléctrodos MWCNT/GC e GP/GC obtidos por voltametria cíclica (50 mV s^{-1}) na presença de 1 mM de ascorbato. Para o eléctrodo modificado com grafite, observa-se um pico de oxidação por volta de + 0,01V *vs* SCE. Este valor é quase idêntico àquele obtido para a oxidação do ascorbato no eléctrodo MWCNT/GC. Comparados então os voltamogramas obtidos para os eléctrodos modificados GP/GC e MWCNT/GC, verifica-se que, tal como era esperado, este último apresenta uma maior sensibilidade electroquímica para a determinação do ascorbato. No entanto o eléctrodo modificado com

pó de grafite não deixa de apresentar comportamento eletrocatalítico, tal como tinha sido mencionado anteriormente por Moore [243].

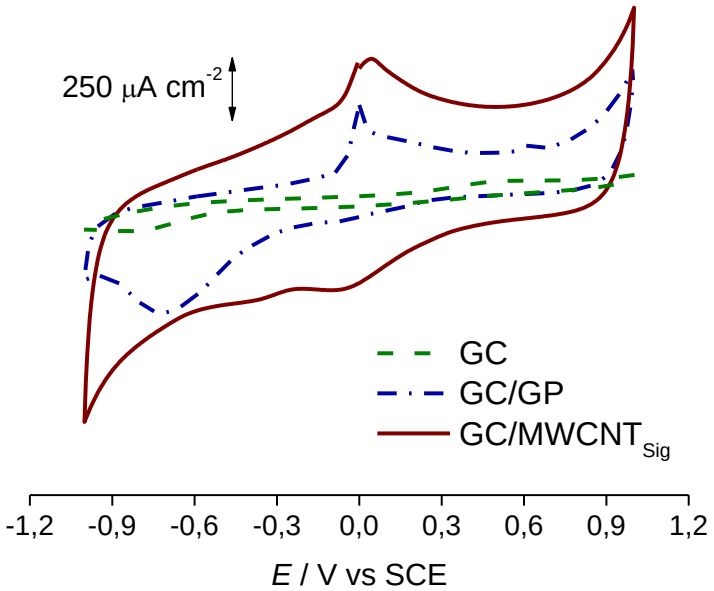


Figura 3.13 - Voltamogramas cíclicos dos eléctrodos GC, GC/GP e $GC/MWCNT_{Sig\ (1.0\%)}$ na presença de 1 mM ascorbato em KPBS pH 5.5, velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1}.

Embora estes resultados sugiram que a presença de carbono amorfo nos MWCNT poderá levar a um aumento do comportamento electrocalítico dos nanotubos, o trabalho de Shao [242] mostra que a funcionalização dos nanotubos de carbono, usando o tratamento com ácido nítrico concentrado pode ser optimizada removendo primeiro o carbono amorfo presente na amostra. Neste tratamento químico, detritos provenientes da oxidação química ((fragmentos carbonáceos carboxilados) (CCFS)) são formados devido à funcionalização do carbono amorfo. De seguida, os CCFS criam uma camada contínua nas paredes de nanotubos de carbono, bloqueando os defeitos presentes nos nanotubos e, desta forma, diminuindo as suas propriedades electroquímicas.

Apesar do facto de que o comportamento eletrocatalítico não poder ser apontado apenas à presença dos nanotubos de carbono, mas também à presença do carbono amorfo presente neles (Fig. 3.13), a remoção destes deverá ser considerada antes de se fazer qualquer tratamento químico, uma vez que a sua presença vai influenciar as medidas realizadas sobre os CNT, diminuindo a funcionalização dos defeitos laterais presentes nos nanotubos de carbono [242].

Inicialmente pensava-se que a origem da cinética de transferência de carga heterogénea dos CNT era devida exclusivamente aos defeitos presentes nas extremidades dos mesmos, mas trabalhos mais recentes [244, 245] vêm demonstrar que as impurezas metálicas foram também responsáveis por reacções redox em CNT purificados em ácido que continham nanopartículas residuais (NPs) [246-248]. Utilizando a técnica de espectroscopia de fotoelectrões de raios-x foi demonstrado que os MWCNT estudados (antes de qualquer lavagem ou pré-tratamento) contêm 1,0 % de oxigénio, 0,1% de ferro e traços (<0,1 %) de cobre e enxofre. A presença destas impurezas metálicas não é afectada pela funcionalização com ácido [246]. A presença destas NPs acontece provavelmente devido ao facto delas ficarem presas em várias camadas de grafite ou contidos nos nanotubos de carbono [241]. Os componentes metálicos, tais como ferro ou o cobre, apesar de existirem em concentrações muito pequenas, participam em processos de oxidação electroquímica em conjunto com os MWCNT, por exemplo no caso da hidrazina [247] e halotano [248], e foi demonstrado que apenas uma pequena percentagem de nanopartículas catalisadoras são necessárias para dominar a resposta electroquímica. Portanto, essas contribuições para a resposta electroquímica de CNT não podem ser ignoradas e, embora existam vários métodos que podem ser aplicados para determinar as impurezas metálicas presentes nos CNT [249], a maioria delas pode dar de forma incorrecta a resposta "sem impureza" [247]. Além disso, não é apenas a quantidade das impurezas que é importante, mas também o local onde elas se encontram posicionados no nanotubo [242].

No nosso trabalho observou-se que a melhor resposta electroquímica (polimerização de vermelho neutro e a determinação de ascorbato) foi obtida utilizando os MWCNT com o grau de pureza mais elevado (~ 95%), mas a fim de se avaliar se as NPs metálicas dominam ou não a resposta electroquímica seria necessário efectuar-se experiências de controlo, utilizando nanotubos de carbono produzidos sem catalisador metálico [250] de forma a obter uma avaliação absoluta das contribuições relativas das nanopartículas.

De acordo com trabalhos anteriores, verificou-se que a área de superfície electroactiva dos nanotubos é inversamente proporcional ao seu diâmetro. Por exemplo, as investigações de Zhan por microscopia electrónica de transmissão e adsorção de azoto [251] demonstraram que a área superficial específica BET dos eléctrodos com CNT

diminuiu com o aumento do diâmetro do nanotubo. Os MWCNT provenientes da NanoLab, que apresentavam o menor diâmetro (30 ± 10 nm), apresentaram a maior área electroactiva por concentração de massa, o maior valor para a constante de velocidade de transferência de carga obtida para o par redox $Fe(CN_6)^{3-/4-}$, permitiram que se formasse uma maior quantidade de PNR à superfície do eléctrodo (Tabela 3.1) e apresentaram melhores características para serem utilizados na modificação de um sensor para a determinação do ácido ascórbico.

Relativamente ao tamanho dos CNT, apesar dos comprimentos dos nanotubos fornecidos serem diferentes, 1-5 µm (NanoLab), 5-9 µm (Sigma), e 5-15 µm (Shenzhen), esta característica apresentou pouca relevância para a resposta electroquímica dos eléctrodos modificados em comparação com o diâmetro, uma vez que a maior parte dos sítios activos dos nanotubos estão na superfície cilíndrica exterior, em vez de nas extremidades dos nanotubos individuais. A funcionalização, protonação em meio ácido (neste trabalho foi utilizado HNO_3) e sonificação é fundamental para a promoção da actividade dos CNT, mas muitas vezes leva ao corte dos nanotubos de carbono em partes mais pequenas, perdendo assim parte da alta relação comprimento/espessura [202] e reduz as diferenças no comprimento de cada marca de nanotubos. Todos os estudos realizados sugerem que os MWCNT provenientes da NanoLab dão uma melhor resposta em termos de comportamento electroquímico e resposta electrocatalítica.

3.9. Conclusões

As propriedades electrocatalíticas dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados provenientes de 3 diferentes fornecedores depositados sobre eléctrodos de carbono vítreo foram comparadas, e os efeitos do poli(vermelho neutro) electrodepositado avaliados. Os eléctrodos modificados com MWCNT deram respostas voltamétricas bem definidas na presença de hexacianoferrato(II) e observou-se que tanto a área electroactiva, como a constante de transferência de carga estão dependentes da concentração e da proveniência dos nanotubos. A técnica de microscopia de varrimento electrónico confirmou a existência de diferenças entre PNR e PNR/MWCNT e que a presença de MWCNT aumenta a quantidade de sítios redox de PNR à superfície do eléctrodo.

Os eléctrodos de MWCNT/GC e PNR/MWCNT/GC mostraram ter excelentes propriedades funcionais e boa actividade electrocatalítica para o ascorbato, com limites de detecção menores que 4 µM em + 0,05 V *vs* SCE. Foram feitas comparações com eléctrodos modificados com grafite, onde também foram observadas propriedades eletrocatalíticas. Os eléctrodos mostraram boa sensibilidade para a determinação de ácido ascórbico, estando estes valores dependentes da concentração do nanotubo e da sua proveniência.

Das três marcas testadas, os MWCNT provenientes da NanoLab exibiram as melhores propriedades analíticas e observou-se que a presença de PNR fornece uma resposta eletroanalítica melhor para a concentração mais baixa de nanotubos, e em todos os casos serve como estabilizador da estrutura de eléctrodo providenciando um caminho condutor eficiente até ao eléctrodo-substrato.

Capítulo 4

Eléctrodos de tecido de carbono modificado por nanotubos de carbono

No trabalho descrito neste capítulo, foi estudado pela primeira vez como material de eléctrodo, o tecido de carbono revestido com nanotubos de carbono (CNT/CCl e avaliado o efeito da dopagem com azoto nos nanotubos de carbono (CNx / CCl) na resposta electroquímica. A aplicabilidade de um mediador redox (PEDOT) foi estudada, com a finalidade de melhorar as características físicas do tecido de carbono de forma a optimiza-lo para ser usado como biossensor electroquímico, publicados em [81].

4.1. Introdução

Fibras de carbono de alto desempenho foram sintetizadas pela primeira vez por Bacon em 1958 [252], por carbonização de *Rayon* e o seu teor de carbono foi aumentado até 55% quando Shindo os produziu a partir de poliacrilonitrilo (PAN) [253]. Papel carbono e tecido de carbono (CCl), ambos materiais porosos com base em fibra de carbono, são ainda hoje produzidos a partir de PAN ou resina de petróleo e tornaram-se o substrato do eléctrodo mais eficaz para células combustíveis de membrana de electrólito de polímero (PEMFC), devido à sua boa condutividade eléctrica, permeabilidade a gases e resistência à corrosão [254]. Juntamente com nanotubos de carbono, eles têm sido utilizados para melhorar a actividade electrocatalítica e reduzir a quantidade mínima necessária de catalisador de platina [255-259].

Os nanotubos de carbono (CNTs) depositados no CCl podem aumentar substancialmente a performance de CCl como substrato para nanopartículas de Pt, devido à sua razão comprimento/largura e boa condutividade electrónica. Métodos convencionais para modificar o CCl com CNTs que consistem normalmente em humedecer o substrato com uma mistura de pó de CNT e solvente [260], introduzem impurezas que vão diminuir a performance electroquímica do dispositivo, assim sendo foram substituídos pelo crescimento directo de CNTs no CCl por CVD [261, 262].

A baixa reactividade do tecido de carbono significa que é fundamental proceder-se à funcionalização da superfície a fim de se assegurar uma reactividade eficaz e a possível fixação de nanopartículas ou biomoléculas na superfície dos mesmos. Funcionalização por oxidação química (tratamento com ácido) reduz o desempenho mecânico e electrónico, e

introduz defeitos na superfície o que por sua vez torna a adsorção não-uniforme [263]. A dopagem é uma outra maneira de funcionalizar os nanotubos de carbono, através da introdução de sítios azotados (oxigénio substitucional e piridínico), formados durante a incorporação de azoto na estrutura dos CNT. A dopagem faz com que os nanotubos com azoto apresentem uma aparência semelhante ao bambu [264, 265].

Além das vantagens de usar tecido de carbono (CCl) modificado com nanotubos de carbono e CNx em células de combustível de troca de protões, ambas as modificações dão para substratos potencialmente interessantes no estudo de adsorção de biomoléculas em aplicação de aplicações em biodispositivos electroquimicos. As proteínas podem adsorver fortemente por ligação não-covalente, ao longo do comprimento dos CNT, por exemplo estreptavidina [266], a ferritina [267], o citocromo c [268] ou anticorpos [269]. O carácter estrutural dos MWCNT permite-lhes promover transferência de electrões a potenciais mais perto de zero volts, e daí, juntamente com a sua área de superficial elevada, torná-los excelentes para aplicação em sistemas de sensores bioquímicos, por exemplo biossensores amperométricos de glucose [270]. Os CNx apresentam algumas vantagens sobre CNT sem dopagem, tais como uma maior condutividade, menor toxicidade, e a presença de sítios com azoto [271], que têm demonstrado facilitar a transferência de electrões entre metaloproteínas e eléctrodos de Au [272].

Este estudo relata, pela primeira vez, a utilização de tecidos de carbono revestidos por CNT e CNT dopado com azoto (CNT_CCl, CNx_CCl), como substratos para a construção de um biossensor para a determinação de glucose. Tecidos de carbono têm sido relatados como substratos para o crescimento directo de nanofios de PANI (PANI-NWS), e a enzima glucose oxidase foi imobilizada por meio de interacção electrostática entre a superfície de NW carregada positivamente (oxidada) e as moléculas de GOx com carga negativa [273]. Uma outra aplicação de CCl foi a preparação de um ânodo de glucose desidrogenase FAD-dependente e um cátodo de bilirrubina oxidase para células de biocombustível, em que as enzimas foram depositadas em conjunto com uma tinta de carbono [274].

O comportamento electroquímico do tecido de carbono modificado por CNT e CNx foi caracterizado por voltametria cíclica, utilizando a espécie electroactiva modelo, $K_4Fe(CN)_6$. A área electroactiva também foi estimada.

Devido à elevada porosidade do tecido de carbono e à sua elevada capacidade de absorção de líquido por capilaridade, é necessário modificar os eléctrodos com polímero inerte, com o objectivo principal de reduzir o diâmetro de poro. Para este efeito o poli (3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) é extremamente atraente, uma vez que os filmes deste polímero podem ser facilmente depositados por electropolimerização do monómero [116], têm elevada condutividade [135, 136], secção 1.5.2. Estes eléctrodos modificados PEDOT(- CNT_CCl ou CNx_CCl) foram utilizados como biossensores de glucose, (GOx), designado GOx_PEDOT_CNT / CNx_CCl, por amperometria a potencial fixo, a sobrepotencial baixo. A espectroscopia de impedância electroquímica foi também utilizada para avaliar as características interfaciais e de *bulk* dos CNT / CNx_CCl, PEDOT_CNT / CNx_CCl e GOx_PEDOT_CNT / eléctrodos CNx_CCl.

4.2. Preparação e modificação dos eléctrodos

4.2.1. Fabricação das fibras de carbono

O CNT e CNx foram sintetizados pelo método de CVD em um tubo de quartzo montado num forno de parede [275]. Tecidos de carbono foram utilizados como substratos e colocado no centro do tubo. Os substratos foram pré-tratados por deposição de uma película muito fina de Fe com 5 nm de espessura que actuou como catalisador. Um fluxo de Ar (300 sccm) foi utilizado como gás portador e o tubo foi purgado durante 15 min antes da reacção. Para a síntese de CNT, quando o sistema foi aquecido até à temperatura necessária (760 ° C), é necessário introduzir-se C_2H_4 (50 sccm) na zona de reacção, e o crescimento de CNTs ocorre na superfície dos substratos durante 15 minutos. Após finalizada a reacção, o sistema foi arrefecido até à temperatura ambiente. Para a síntese de CNx, a melamina foi o único precursor do carbono e do azoto, e colocada perto da entrada do forno. À temperatura de síntese requerida (800ºC), a melamina é evaporada e transportada para a zona de reacção para o crescimento inicial de CNx sobre o substrato. A reacção foi realizada durante 15 min e terminada. Em seguida, o sistema foi arrefecido até à temperatura ambiente. Os tecidos de carbono modificados com CNT e CNx, foram preparados pelo Prof. X. Sun da Universidade de Western Ontario, Canadá.

Na Fig. 4.1 vêm representadas micrografias dos CCl revestidos com nanotubos de carbono, e com nanotubos de carbono dopados com azoto. A técnica de SEM fornece informações sobre a morfologia da superfície do eléctrodo, permitindo visualizar a sua superficie em detalhe, onde se pode observar algumas diferenças na superficie de ambos os eléctrodos. As diferenças provenientes da dopagem dos nanotubos vão ser avaliadas mais em detalhe com o auxílio de diversas técnicas de análise electroquímica.

CNT **CNx**

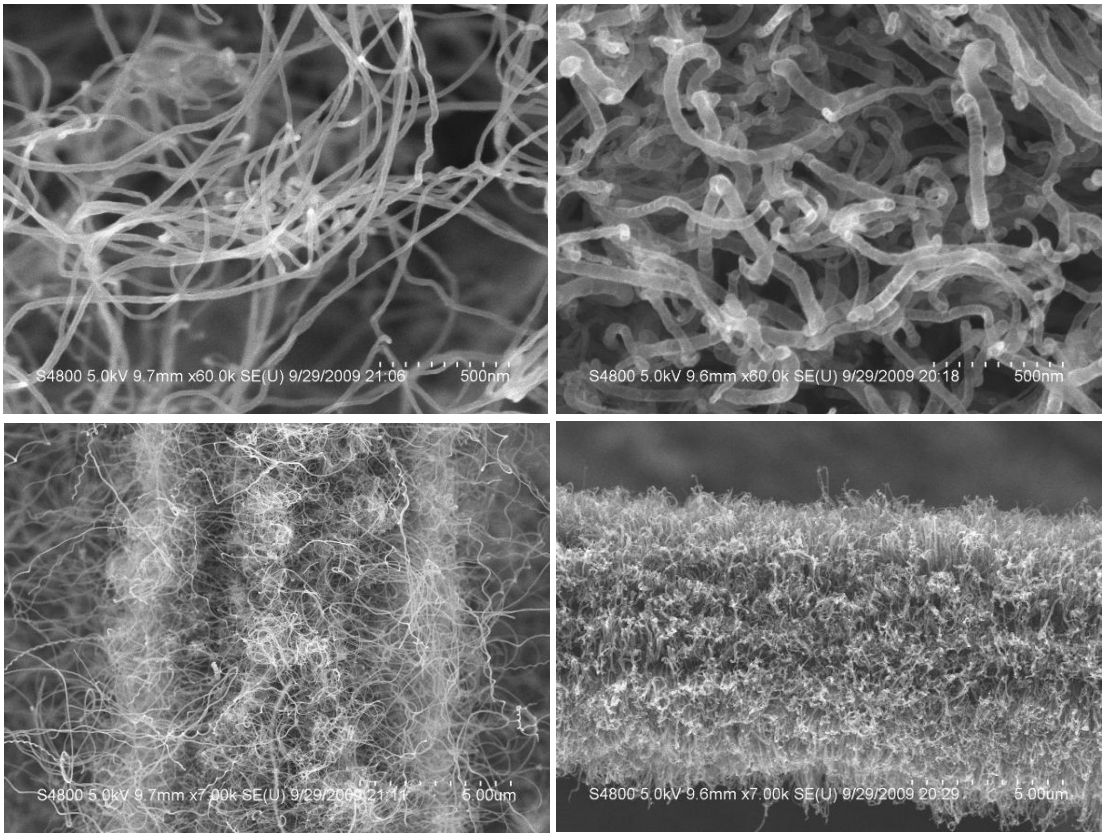


Figura 4.1 - Microscopia de varrimento electrónico de tecido de carbono revestido com CNT e com CNT dopado com azoto (CNx).

4.2.2. Preparação do eléctrodo e do biossensor

Os eléctrodos foram fabricados cortando o tecido de carbono modificado em secções rectangulares com a dimensão aproximada de 1,0 × 0,5 cm^2. Posteriormente uma das pontas destes rectângulos de tecido é preso por uma mola metálica que vai servir como contacto eléctrico e que foi originalmente concebido para ligar cristais de quartzo/Au.

Devido ao seu caracter hidrofóbico, os tecidos de carbono (modificados e não modificados), necessitam de ser funcionalizados quimicamente. Desta forma, os diferentes rectângulos de tecido foram imersos em HNO_3 2 M durante 24 h, depois enxaguados com água ultra pura a fim de neutralizar o pH e finalmente deixou-se a secar a uma temperatura de 50 ºC durante outras 24 h.

Para a electropolimerização de EDOT, uma solução 0,01 M deste monómero teve de ser preparada por dissolução numa solução de NaPSS 0,1 M que devido à pouca solubilidade do monómero foi posteriormente aquecida, até à sua dissolução completa.

A preparação do filme de EDOT foi realizada através de voltametria cíclica, com um varrimento de potencial -0,6 até 1,2 V *vs* SCE durante 10 ciclos a uma velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1}, um procedimento optimizado por Kakhki [123]. Os filmes de PEDOT foram deixados a secar ao ar à temperatura ambiente, durante pelo menos 24 h, antes da sua utilização.

Glucose oxidase foi imobilizada em cima de eléctrodos PEDOT-modificado CCl_CNT/CNx por reticulação com glutaraldeído (GA) como relatado por Ghica [276]. Um volume de 20 µl de solução de enzima foi então misturada com 10 µl GA (2,5% v/v diluído em água) e 20 µl desta mistura foi então depositada na superfície do eléctrodo e deixada a evaporar à temperatura ambiente durante pelo menos 4 h.

4.3. Caracterização electroquímica da fibra de carbono

Neste trabalho, o comportamento eletroquímico do tecido de carbono modificado por CNT e CNx foi caracterizado por voltametria cíclica, utilizando a espécie eletroactiva modelo, $K_4Fe(CN)_6$. A área electroactiva também foi estimada.

4.3.1 Determinação das áreas electroactivas dos eléctrodos modificados CCl, CNT_CCl e CNx_CCl

Os voltamogramas cíclicos foram registados para os três tipos de eléctrodos baseados no tecido de carbono (CCl) em KCl 0,1 M, e observou-se que o material mais

resistivo é o CCl não modificado (Fig,4.2a). Como esperado, a modificação de CCl com os CNT conduz a um aumento das correntes capacitivas, com as maiores correntes a serem obtidas para a modificação de CCl com nanotubos dopados com azoto, CNx. Os valores de carga foram calculados por integração da corrente dos correspondentes voltamogramas cíclicos e o eléctrodo modificado CNx_CCl apresentou um valor de carga de 7,2 mC cm^{-2}, valor esse que é superior por um factor de 1,6 e 16 aos obtidos para CNT_CCl e CCl, respectivamente.

A fim de investigar mais aprofundadamente as propriedades electroquímicas dos eléctrodos modificados CCl, foi estudada por voltametria cíclica a espécie modelo $K_4Fe(CN_6)$ numa solução de KCl 0,1 M. Primeiramente, efectuou-se as experiências utilizando as amostras de tecido sem estas terem sido submetidas a qualquer tipo de funcionalização. Devido à sua natureza hidrofóbica, não se observou qualquer resposta electroquímica para a oxidação de $[Fe^{II}(CN)_6]^{4-}$, em CCl e CNT_CCl. Em relação ao eléctrodo modificado CNx_CCl, este apresentou uma resposta com caracter irreversível, uma vez que tem um carácter menos hidrofóbico, devido à sua funcionalização com azoto (Fig. 4.2a). Desta forma os eléctrodos foram funcionalizados, (secção 4.2.1) de maneira a tornar a superfície dos eléctrodos mais hidrofílica, exceptuando CCl que permaneceu hidrofóbico, e necessitou de uma imersão de 10 minutos na solução de hexacianoferrato (II) antes de ser efectuada a voltametria cíclica correspondente.

Mesmo assim, observou-se para este tecido, picos mal definidos e as espécies electroactivas apresentaram um comportamento redox irreversível, com uma separação de pico maior que 120 mV. Pelo contrário, pares de picos redox bem definidos para a espécie electroactiva $Fe(CN)_6^{4-}$ foram obtidos para os eléctrodos modificados CNT_CCl e CNx_CCl (Fig. 4.2b), com um potencial formal ($E^{o'}$), estimado a partir do valor do ponto médio dos potenciais de pico anódico e catódico, $(E_{pa}+E_{pc})/2$, de ≈0,18 V *vs* SCE em ambos os tipos de eléctrodo.

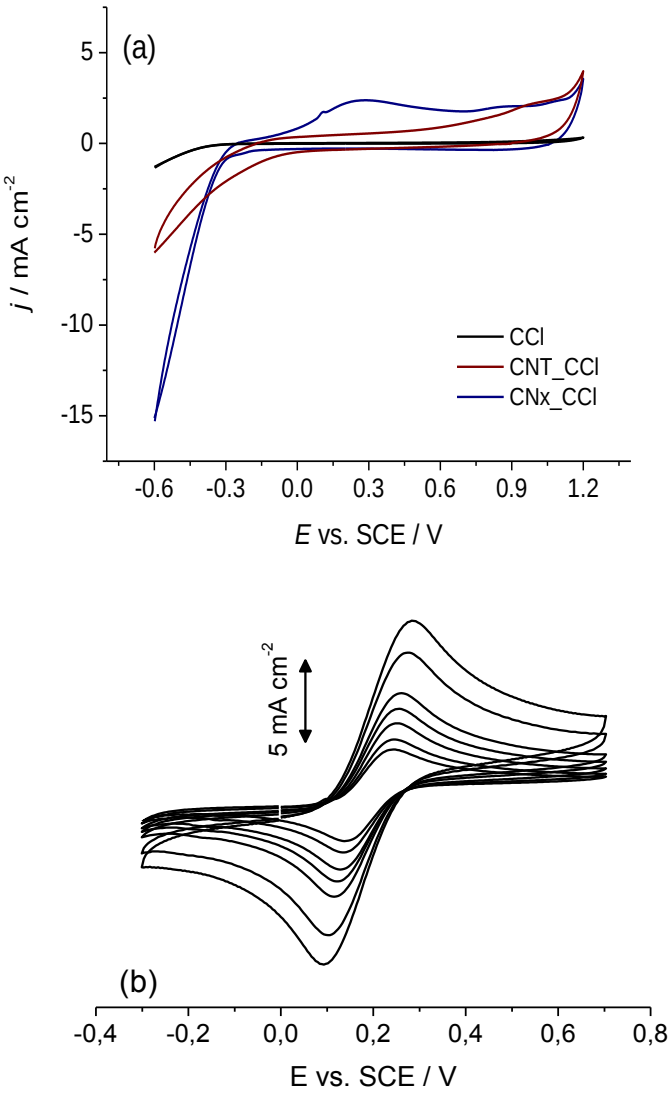


Figura 4.2 - Voltamogramas cíclicos em KCl 0,1 M com $K_4Fe(CN)_6$ 3 mM: a) para CCl, CNT_CCl e CNx_CCl a *v*= 50 mV s^{-1}; b) no eléctrodo CNx_CCl (funcionalizado) para velocidades de varrimento desde 10 mV s^{-1} até 150 mV s^{-1}.

Voltamogramas cíclicos foram registados numa gama de velocidades de varrimento, de 10 mV s^{-1} até 150 mV s^{-1}. Ambas as correntes de pico anódico e catódico obtidas são linearmente dependentes da raiz quadrada da velocidade de varrimento (r^2 = 0,998), o que indica que o processo electroquímico é controlado por difusão.

As áreas electroactivas da superfície (A_{ele}) dos eléctrodos CNT / CNx_CCl foram calculadas de acordo com a equação Randles-Sevcik (eq. 3.1), e através da qual a constante

da velocidade de transferência electrónica, k_0, pode ser também deduzida, Os resultados são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Área electroactiva (A_{ele}), razão área electroactiva e a área geométrica (A_{geo}) dos eléctrodos CCl, CNT/CNx_CCl, e a constante da velocidade de transferência electrónica, calculada para as velocidades de varrimento entre 10 mV s^{-1} e 150 mV s^{-1}, em KCl 0,1 M com $K_4Fe(CN)_6$ 3 mM.

	CCl	CNT_CCl	CNx_CCl
A_{ele} / cm^2	0,08	0,54	0,77
A_{ele} / A_{geo}	0,32	2,13	3,52
$k_0 \times 10^3$ / cm s^{-1}	0,13	1,72	3,71

Observa-se que as modificações de CNT e CNx no tecido de carbono (CCl) conduzem a um aumento significativo da área electroactiva. Além disso, a modificação com CNx, é a que faz aumentar mais a área electroactiva, apresentando a maior proporção de área electroactiva relativamente à área geométrica (A_{ele}/A_{geo}) de 3,52, em comparação com 2,13 para CNT_CCl e de 0,32 para CCl .

4.4. Electropolimerização de EDOT em CCl, CNT_CCl e CNx_CCl

Um dos inconvenientes do uso de tecido de carbono como substrato de eléctrodo durante a realização de experiências é a sua elevada porosidade. Uma vez que para experiências que necessitam obrigatoriamente de tempos de imersão mais longos, o electrólito vai alcançar o contacto eléctrico por meio de capilaridade e provocar um curto-circuito que por sua vez vai impedir que a experiência electroquímica seja bem-sucedida. Desta forma recorreu-se a técnicas electroquímica relativamente rápidas, e com tempo de experiências curto, o que implica a imersão dos eléctrodos CCl modificados por apenas alguns minutos, de modo a que não haja possibilidade de molhar o contacto eléctrico. A fim de avaliar o período de tempo necessário para o contacto ser humedecido, os eléctrodos CCl foram imersos em solução de electrólito e observou-se que, depois de ≈200 s o electrólito alcançou o contacto metálico do eléctrodo.

Uma forma encontrada para diminuir a capilaridade foi tentar reduzir a porosidade do material de carbono e através do enchimento do tecido com um polímero inerte condutor, tal como PEDOT. A electropolimerização do monómero EDOT foi realizada através da variação cíclica do potencial de uma solução contendo 0,01M EDOT dissolvido em NaPSS 0,1M (secção 4.2.2), e um perfil típico CV durante a polimerização é apresentado na Fig. 4.3a.

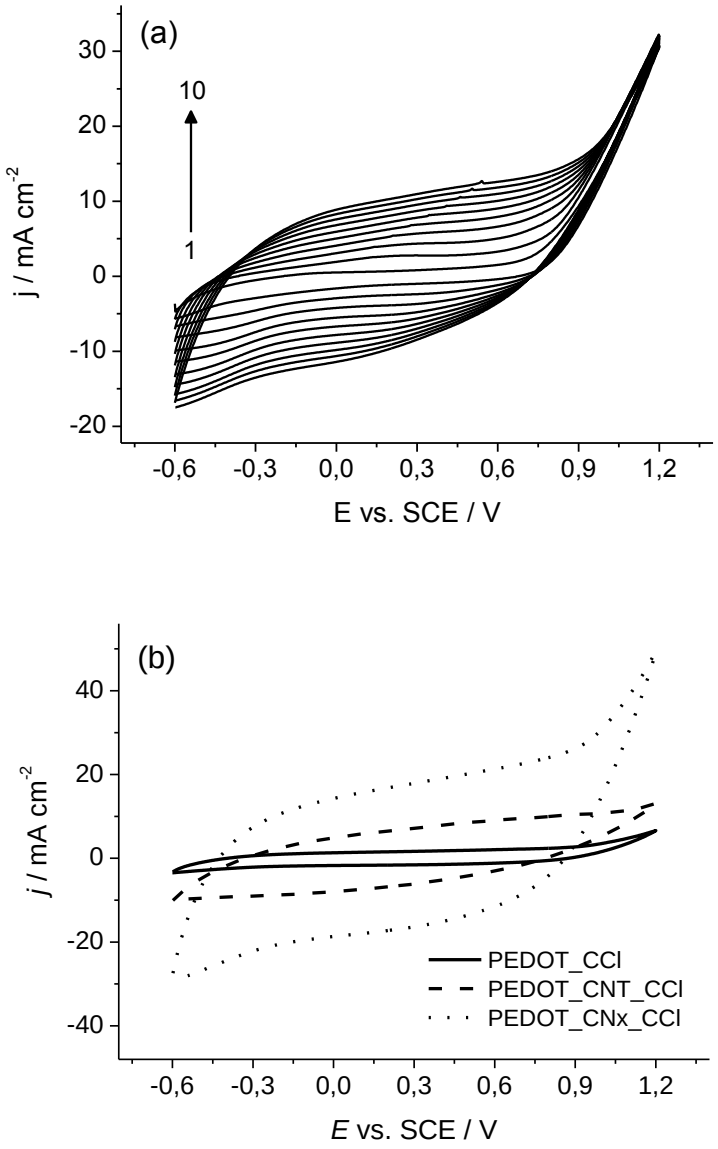


Figura 4.3 - a) Voltamogramas cíclicos obtidos durante a polimerização de EDOT no eléctrodo CCl; b) Voltamogramas cíclicos obtidos para os eléctrodos CCl, CNT_CCl e CNx_CCl modificados com PEDOT em KCl 0,1 M; v = 50 mV s^{-1}.

O limite de potencial superior escolhido foi +1,2 V, uma vez que foi observado que este é o potencial óptimo necessário para gerar espécies suficientes de radicais catiões $EDOT^{\bullet+}$, para iniciar o processo electropolimerização [135]. O aumento da corrente capacitiva observada na Fig 4.3 é uma indicação de que o polímero PEDOT é formado. Uma comparação das respostas de CV para os eléctrodos modificados com PEDOT é apresentada na Fig. 4.3b.

A deposição PEDOT nos eléctrodos CNT_CCl e CNx_CCl conduz a aumentos diferentes da carga em relação aos eléctrodos de tecido de carbono (CCl). Os valores de carga foram calculados a partir dos voltamogramas cíclicos obtidos para os eléctrodos CCl, CNT_CCl e CNx_CCl modificados com PEDOT em KCl 0,1 M e são mostrados na Tabela 4.2.

O maior aumento em valor de carga foi observado para PEDOT_CCl, sendo 6,9 mC cm^{-2} comparado com 0,45 mC cm^{-2} para o CCl sem qualquer modificação. O valor mais elevado de carga (66,5 mC cm^{-2}) foi obtido para o eléctrodo modificado PEDOT_CNx_CCl, seguido por PEDOT_CNT_CCl, com 24,2 mC cm^{-2}, sendo 10 e 6, respectivamente vezes maior que a registada para os eléctrodos sem qualquer modificação.

Tabela 4.2 - Valores da carga (Q / mC cm^{-2}), calculados a partir da integração da corrente do correspondente voltamograma cíclico obtido para CCl, modificado com PEDOT e biossensor CCl modificado com PEDOT em KCl 0,1 M ; v = 50 mV s^{-1}.

	CCl	PEDOT_CCl	GOx_PEDOT_CCl
CCl	0,5	6,9	3,2
CNT_CCl	4,3	24,2	12,9
CNx_CCl	7,2	66,5	33,4

4.5. Biossensores baseados em CCl, CNT_CCl e CNx_CCl modificados com PEDOT

Biossensores de glucose foram construídos por imobilização de glucose-oxidase no topo de PEDOT_CNT/CNx_CCl e as propriedades analíticas em conjunto com a estabilidade operacional foram avaliadas.

4.5.1. Optimização do método de imobilização enzimática

Considerando a elevada porosidade dos diferentes eléctrodos PEDOT_CCl, o primeiro método usado para imobilizar a enzima foi por adsorção física. A principal vantagem deste método é que não requer reagentes adicionais, e faz com que ocorra pouca ou nenhuma alteração conformacional na enzima (secção 1.4.4.1). Os substratos foram imersos em uma solução de GOx 1% (m/v), durante 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, foram imersos em água, a fim de remover toda a solução enzimática não adsorvida e deixados a secar durante 4 h antes de serem utilizados.

Os biossensores foram aplicados para a detecção de glucose por amperometria a potencial fixo a um potencial de -0,45 V *vs* SCE. Nenhuma resposta para glucose foi observada aquando a utilização do biossensor PEDOT_CCl, enquanto os eléctrodos PEDOT_ CNT/CNx_CCl exibem sensibilidades semelhantes, de 9,0 µA mM^{-1} cm^{-2} ± 0,6 (n = 3). Infelizmente, a resposta diminuiu drasticamente e desapareceu completamente depois de apenas 3 medições, provavelmente devido às forças de ligação entre a enzima e o substrato serem muito fracas, uma vez que se tratam de ligações de hidrogénio, múltiplas ligações salinas, e a forças de Van der Waals.

Assim sendo, optou-se por imobilizar a enzima quimicamente recorrendo à técnica de reticulação com GA (secção 1.4.4.2), usando uma solução de GOx 1% (m/v) que continha 4% (m/v) de BSA. O biossensor construído por este método mostrou possuir uma boa resposta linear até 1 mM, e manteve-se estável durante uma semana de ensaios. Este método foi o escolhido para a arquitectura de outros biossensores.

4.5.2 Optimização do potencial ideal para a determinação amperométrica

Detecção de glucose por amperometria a potencial fixo foi realizada em potenciais aplicados no intervalo de -0,5 até 0,0 V, com o objectivo de se determinar qual o potencial a que se obtém a melhor resposta para o biossensor. Em primeiro lugar, foi efectuada uma curva de calibração para uma gama de concentrações completa para o potencial de -0,45 V. Este potencial foi escolhido tendo em conta o potencial formal do FAD (cofactor da enzima), $E^{o'}$= -0,45 V *vs* SCE [277]. A resposta obtida foi linear até cerca de 1 mM. Decidiu-se injectar uma concentração de 0,4 mM de glucose em todos os potenciais acima mencionados, e calcular a mudança na corrente (Fig. 4.4). Em todos os casos ocorreu um aumento na corrente anódica. Correntes mais elevadas foram registadas perto do valor do potencial formal FAD/$FADH_2$, como esperado, e observou-se também que à medida que o potencial se tomava mais positivo, a mudança na corrente diminuía de forma contínua e tanto o eléctrodo CCl, e os biossensores CNT_CCl perderam toda a resposta para o potencial 0,0 V *vs* SCE. Importa salientar, que nenhuma variação significativa na resposta da corrente foi observada entre -0,4 V e -0,3 V, e portanto, -0,3 V foi o potencial escolhido para as restantes experiências, uma vez que o uso de potenciais menos negativos diminui a possibilidade da resposta incluir a redução de espécies interferentes.

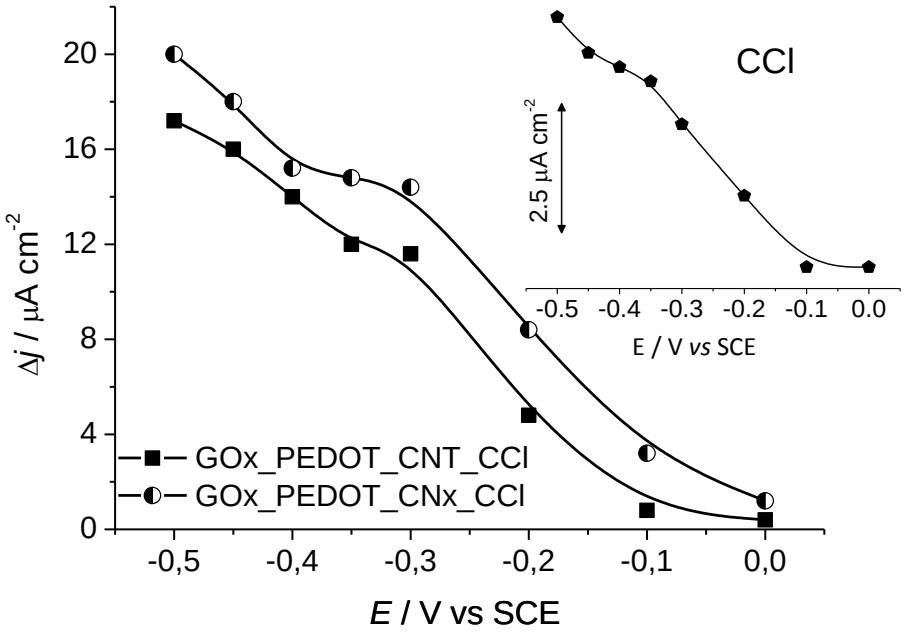


Figura 4.4 - Variação dos diferentes biossensores CCl modificados com PEDOT com o potencial aplicado; Δ*j* corresponde à injecção de 0,4 mM de glucose em NaPBS 0,1 M pH 7,0.

4.5.3. Propriedades analíticas dos biossensores modificados com PEDOT: CCl, CNT_CCl e CNx_CCl

Usando as condições optimizadas anteriormente, os biossensores GOx_PEDOT_CCl e GOx_PEDOT_CNT / CNx_CCl foram utilizados para a determinação amperométrica de glucose para o potencial -0,3 V *vs* SCE e as curvas de calibração são apresentadas na Fig. 4.5. Uma vez que o substrato influenciou a deposição de PEDOT, observa-se que este também tem um papel importante no desempenho do biossensor.

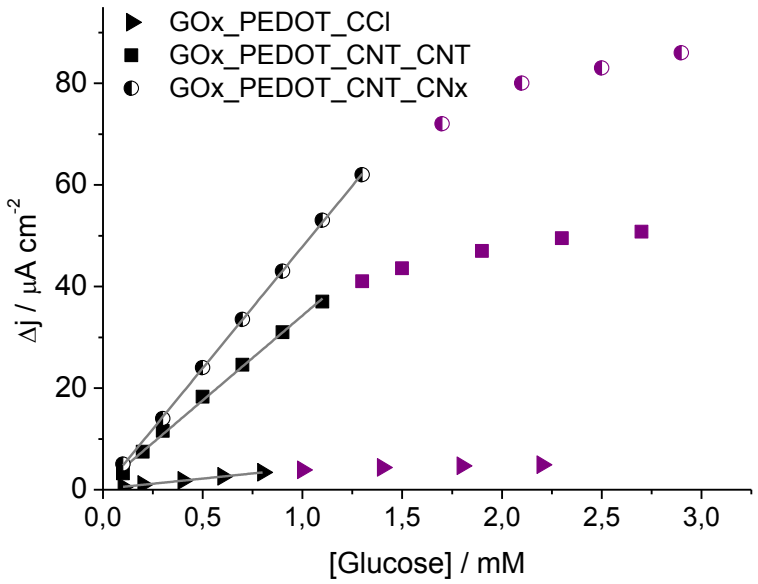


Figura 4.5 – Curvas de calibração para os diferentes biossensores em solução NaPBS pH 7.0; para o potencial aplicado de -0.3 V vs. SCE.

Como esperado, o substrato CNx_CCl, que também conduziu à melhor polimerização de EDOT, origina as melhores propriedades analíticas, apresentando a maior sensibilidade de 47,9 mA cm^{-2} mM^{-1}, o limite de detecção mais baixo, 16 nM, e a maior gama linear. Como se pode observar, comparando as sensibilidades dos três substratos diferentes (Tabela 4.3), as modificações de CCl com CNT e CNx melhoram consideravelmente a resposta do biossensor, obtendo-se para estas modificações sensibilidades ≈ 10 vezes maiores do que as obtidas pelo biossensor GOx_PEDOT_CCl.

Tabela 4.3 - Parâmetros analíticos retirados a partir das curvas de calibração obtidas para os biossensores-CCl apresentados na Fig. 4.4.

	Sensibilidade/ $\mu A\ mM^{-1}\ cm^{-2}$	Limite de detecção/ nM	K_M / mM
GOx_PEDOT_CCl	4,1	22,0	0,43
GOx_PEDOT_CNT_CCl	33,4	65,0	0,61
GOx_PEDOT_CNx_CCl	47,9	16,0	0,74

4.5.4. Estudo da estabilidade dos biossensores GOx_PEDOT_CNT/CNx_CCl

Um estudo de estabilidade dos biossensores foi necessário para avaliar a retenção da actividade enzimática num biossensor com uma arquitectura tão complexa. Com este objectivo, os biossensores GOx_PEDOT_CNT / CNx_CCl foram testados ao longo de um período de 40 dias, com a obtenção de curvas de calibração com sete pontos a intervalos de 3 dias. Os biossensores foram armazenados, à temperatura de 4 ºC, em seco, quando não estavam a ser utilizados. A variação da sensibilidade com o tempo é apresentada na Fig. 4.6.

Os resultamos obtidos (Fig. 4.6) mostram que existe um aumento da sensibilidade após os primeiros 3 dias. Este comportamento pode estar relacionado com as mudanças conformacionais da enzima na estrutura do biossensor, e provavelmente devido a um melhor contacto electrónico entre a “malha” de PEDOT_CNT / CNx e o centro activo da enzima. Após 40 dias, a sensibilidade de GOx_PEDOT_CNT_CCl diminuiu 40%, mas o decréscimo foi de apenas 25% quando o biossensor continha CNT dopado (CNx). Esta discrepância é provavelmente devido à hidrofilicidade do material, que permite que as moléculas de GOx penetrem na estrutura do tecido CCl quando a solução de enzima é imobilizada sobre a superfície do eléctrodo. Além disso, o facto de não ser necessário armazenar os biossensores em solução também traz vantagens, eliminando a possível libertação de enzima para a solução.

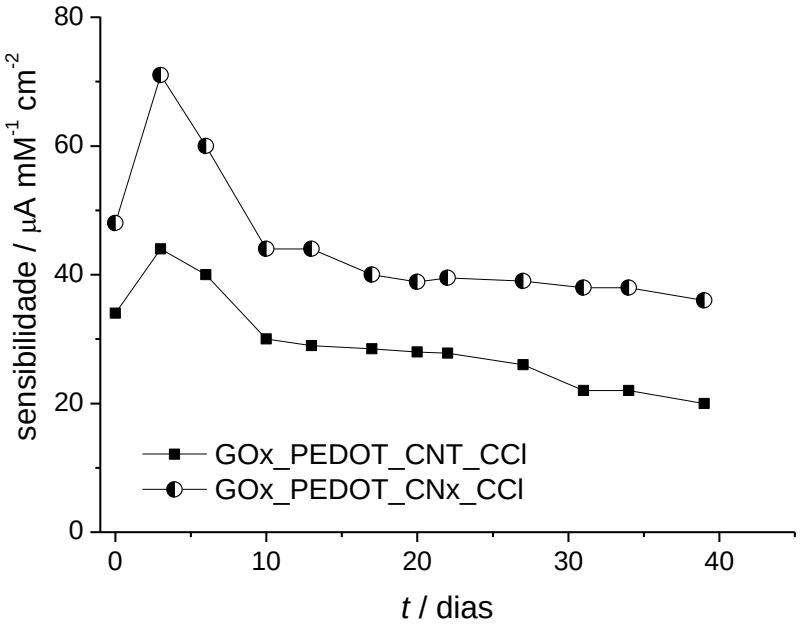


Figura 4.6 - Estabilidade dos biossensores GOx_PEDOT_CNT/CNx_CCl. A sensibilidade vem representada em função do tempo.

A estabilidade após o armazenamento dos biossensores GOx_PEDOT_CNT / CNx_CCl também foi avaliada, através da obtenção de uma curva de calibração completa após 45 dias de armazenamento em seco à temperatura de 4 ºC. A redução da sensibilidade de 11% e 6%, respectivamente, mostra que, sob estas condições, os substratos de tecido de carbono modificados permitem uma muito boa conservação da actividade enzimática.

4.5.5. Caracterização por EIS dos eléctrodos modificados PEDOT e GOx_PEDOT

Os espectros de impedância de plano complexo obtidos para os eléctrodos CCl, CNT_CCl e CNx_CCl em KCl 0,1 M são mostrados na Fig. 4.7a. Todos os espectros são dominados pelas linhas capacitivas e observa-se que a presença de CNT leva a uma diminuição da parte imaginária da impedância (-Z ") por um factor de 40, sugerindo que o aumento na capacitância melhora a resposta electroquímica. Isto também foi observado, comparando os voltamogramas cíclicos obtidos para estes eléctrodos, onde as maiores correntes capacitivas obtidas foram para os eléctrodos CNx_CCl (Fig. 4.3b).

Os eléctrodos de PEDOT modificados mostram um menor desvio do comportamento capacitivo (Fig. 4.7b), o que é indicativo de uma transferência de electrões rápida nas interfaces eléctrodo / polímero e polímero / solução, assim como um transporte de carga rápida na matriz polimérica. Estimou-se que a área de superfície real de uma película de polipirrol nodular foi 50 vezes maior do que a de um eléctrodo liso com dimensões laterais idênticas [278]. Ao trabalhar com substratos mais porosos, a polimerização não irá ocorrer de uma maneira dimensional. Em vez disso haverá uma polimerização quase tridimensional, com o polímero a penetrar no eléctrodo de tecido em vez de apenas formar um revestimento superficial. A diminuição da grandeza dos valores de impedância observados para os eléctrodos de PEDOT modificados, mostra que a presença desta matriz polimérica tridimensional conduz a um aumento da área de superfície activa total, deste modo aumentando a condutividade eléctrica dos eléctrodos modificados. A diferença nos valores de impedância imaginários obtidos para CCl e PEDOT_CCl não é tão grande como a entre CCl e PEDOT_CNT / CNx_CCl, indicando que PEDOT melhora significativamente a condutividade dos eléctrodos CCl. O facto de os valores de impedância serem 4 e 10 vezes menores para PEDOT_CNT_CCl e PEDOT_CNx_CCl respectivamente, é indicativo que os nanotubos melhoraram a resposta electroquímica, devido a um aumento da área electroactiva e devido ao seu comportamento eletrocatalítico [108], com os melhores resultados a serem observados para os eléctrodos PEDOT_CNx_CCl, devido à presença dos CNT dopados com azoto. De salientar que também foi publicado que a presença de nanotubos de carbono aumenta o número de sítios activos, em comparação com os filmes de PEDOT depositadas nas superfícies lisas [279].

A Fig. 4.7c mostra espectros de biossensores de tecido de carbono GOx_PEDOT, que são muito semelhantes aos registados para os biossensores de PEDOT modificados com nanotubos, demonstrando que a camada enzimática não influencia significativamente o comportamento electroquímico dos eléctrodos de tecido de carbono.

Circuitos diferentes foram testados com o objectivo de se ajustar os espectros de impedância, pelo método dos mínimos quadrados não-lineares, e o circuito equivalente escolhido (Fig. 4.8) mostrou ser capaz de oferecer um ajuste excelente, apresentando um erro médio (χ^2) para as diferentes modificações de $<5 \times 10^{-4}$. Todos os espectros são representados na Fig. 4.7 com os respectivos ajustes teóricos.

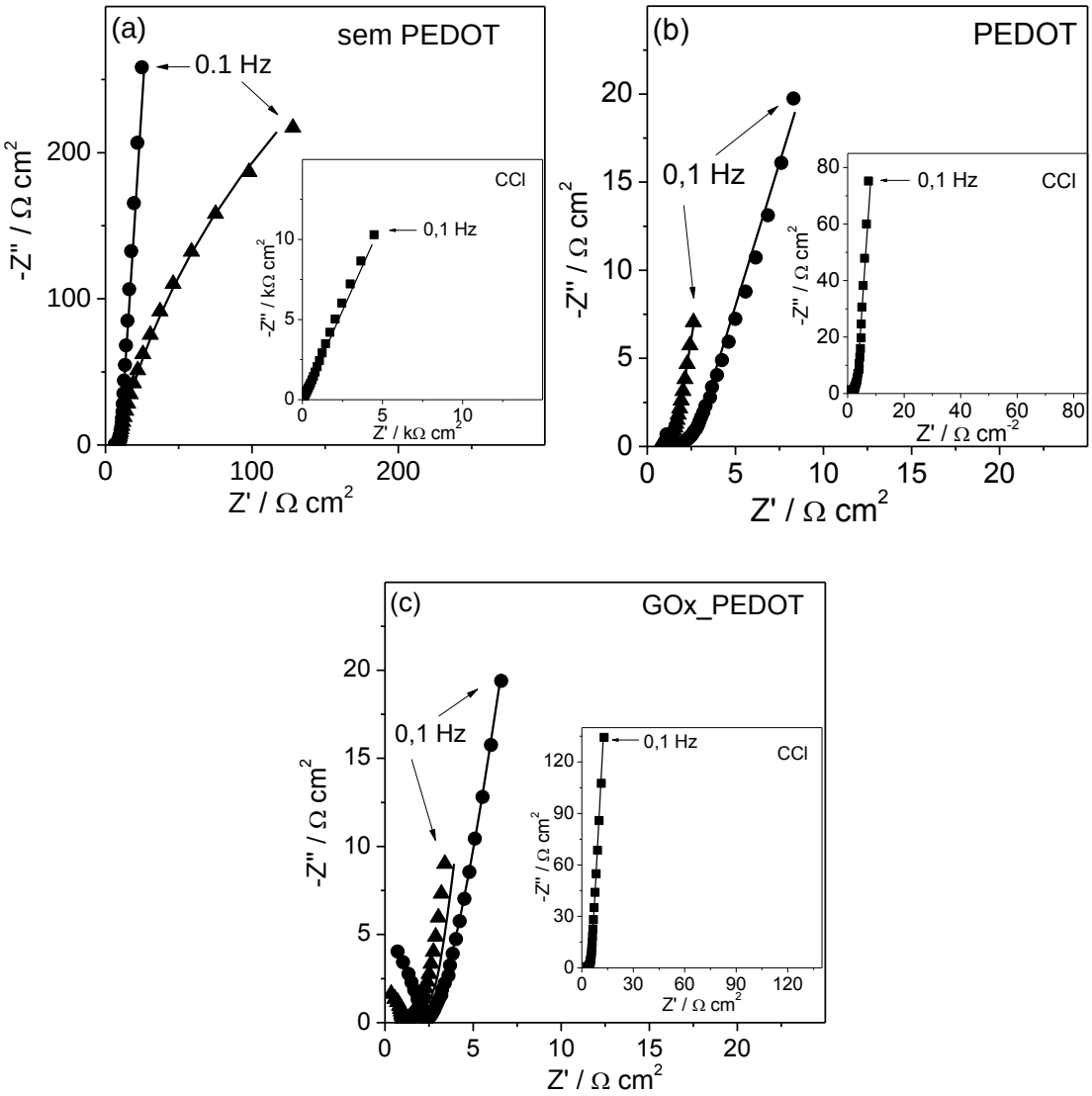


Figura 4.7 - Espectros de impedância no plano complexo em KCl 0,1 M no OCP para a) sem PEDOT, b) modificado com PEDOT e c) biossensores modificados GOx_PEDOT; ■-CCl, ●-CNT_CCl e ▲-CNx_CCl.
As linhas apresentam o ajuste pelo circuito equivalente.

Os espectros complexos obtidos para os eléctrodos CCl modificados com PEDOT (Fig.4.7b), apresentam 2 regiões distintas, correspondentes a uma impedância de difusão finita de Warburg para as gamas de alta e média frequência e uma linha quase vertical que representa uma região capacitiva para a gama de frequências mais baixas, resultados que são semelhantes aos observados por Bobacka para um eléctrodo de platina PEDOT-modificado [280]. O circuito equivalente (Fig. 4.8) é constituído por uma resistência da

célula (R_Ω), um elemento de difusão de Warburg (Z_D) e um elemento de fase constante (CPE_d) como um capacitor não ideal (um capacitor puro foi utilizado por Bobacka [280]). O elemento de Warburg difusional, Z_D, é descrito pela equação: $Z_D = R_D[\mathrm{ctg}(j\omega\tau_D)^{1/2}/(j\omega\tau_D)^{1/2}]$ e é caracterizado por uma constante de tempo difusional (τ_D), uma pseudo-capacitância difusional (C_D) e uma resistência à difusão ($R_D = \tau_D/C_D$) [192]. O CPE_d foi modelado como um condensador não ideal, dado por $CPE = 1 / (Ci\omega)^\alpha$, onde C é a capacitância, que descreve a separação de carga na interface da camada dupla, ω é a frequência em rad s^{-1} e α o expoente que está relacionado com a heterogeneidade (rugosidade) da superfície.

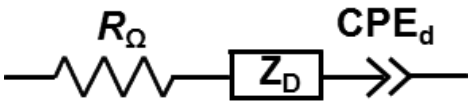


Figura 4.8 - Circuito equivalente.

Como esperado, os valores de C_D aumentaram para os eléctrodos modificados PEDOT_CNT / CNx_CCl, sendo 49,5 mF cm^{-2} e 631,8 mF cm^{-2} respectivamente, em comparação com os 19,0 mF cm^{-2} obtidos para o eléctrodo PEDOT_CCl. Observou-se também que a dopagem com azoto teve um efeito sobre a morfologia da superfície do eléctrodo, demonstrado pelo aumento do valor do parâmetro α 0,8 para 0,9, mostrando que o eléctrodo PEDOT_CNx_CCl apresenta uma superfície mais lisa que os restantes eléctrodos. Foi necessário invocar a existência de uma superfície não uniforme de modo a se poder justificar o desvio do ângulo de 45 º (linha de difusão infinita) para as frequências mais altas e intermédias, melhorando deste modo significativamente a qualidade do ajuste. Com a finalidade de ajustar os espectros obtidos para PEDOT_CCl, utilizou-se um circuito equivalente sem a presença do CPE_d, circuito esse que é o modelo utilizado por Bobacka para eléctrodos de PEDOT modificados [280]. Neste caso, a capacitância total resultante da presença do polímero foi representada pelo elemento difusional sozinho, como vem apresentado na Tabela 4.4.

Devido à resposta altamente capacitiva obtida para o CCl sozinho e para CNT/CNx_CCl, o circuito equivalente utilizado para ajustar os espectros a partir da Fig. 4.7a foi composto pela resistência da célula (R_Ω) e um elemento de fase constante (CPE_d). Observando os valores CPE_d apresentados na Tabela 4.4, a influência dos CNT é

facilmente perceptível, conduzindo a um aumento dos valores de capacitância num factor de ≈ 30 para CNT e ≈ 43 para CNx em comparação com os eléctrodos de CCl não modificados.

A condutividade eléctrica é uma das propriedades mais importantes para um biossensor electroquímico e os valores relativamente baixos obtidos para R_D de 6,9, 3,6 e 2,4 Ω cm^2 (Tabela 4.4) para GOx_PEDOT_CCl, GOx_PEDOT_CNT_CCl e GOx_PEDOT_CNx_CCl respectivamente, apresentados na Tabela 4.4, confirmam a boa condutividade eléctrica dos biossensores. Como esperado, a camada de enzima leva a uma ligeira diminuição na condutividade geral, devido à presença de uma camada de difusão adicional, em que as macromoléculas GOx podem dificultar de transferência de electrões [281]. O mais importante é que o comportamento electroquímico global dos eléctrodos PEDOT_CCl modificados não é alterada pela deposição da camada de enzima, e os valores baixos de resistencia obtidos são promissores para utilização destes substratos na arquitectura de um biossensor enzimático, uma vez que um baixa resistência é fundamental para que as recações de cinética rápida (como é o caso das enzimas) possam ocorrer.

Tabela 4.4.- Resistência (R_D), constante de tempo difusional ($\tau_{D)}$, capacitância (C_D) elemento de fase constante (CPE) e valores de α obtidos pelo ajuste dos espectros EIS apresentados na Fig 4.6.

	CCl			PEDOT_CCl			GOx_PEDOT_CCl		
	CCl	CNT_CCl	CNx_CCl	CCl	CNT_CCl	CNx_CCl	CCl	CNT_CCl	CNx_CCl
R_D / Ω cm^2	-	-	-	4,2	2,6	2,0	6,9	3,6	2,4
τ_D / s	-	-	-	0,04	0,13	1,30	0,13	0,09	0,80
C_D / mF cm^{-2}	-	-	-	10,0	49,5	631,8	19,0	25,2	331,9
CPE / mF cm^{-2} s$^{\alpha-1}$	0,13	4,05	5.80	-	93,1	360,5	-	101,0	204,0
α	0,73	0,81	0,86	-	0,80	0,90	-	0,81	0,92

4.6. Conclusões

O comportamento electroquímico de tecido de carbono modificado com CNT e CNT dopados com azoto, CNx, foram investigados e comparados. Espécies electroactivas modelo mostraram um comportamento electroquímico reversível para os eléctrodos modificados com CNT previamente funcionalizados, onde os nanotubos de carbono dopados conduziram a um aumento da área electroactiva. A electrodeposição de EDOT em eléctrodos de CCl reduz a sua porosidade e aumenta a condutividade dos mesmos, e observou-se uma maior quantidade de polímero a ser depositado no eléctrodo CNx_CCl. A imobilização de GOx no PEDOT_CNT_CCl e substratos PEDOT_CNx_CCl conduz à produção de biossensores bastante robustos, onde aqueles que contêm CNx exibem maior sensibilidade e limite de detecção mais baixo, realçando uma vez mais a importância da dopagem dos CNT. A boa estabilidade obtida mostra as vantagens existentes na utilização de substratos porosos para a retenção da actividade enzimática, e a possibilidade de armazenagem a seco mostrou trazer benefícios adicionais, uma vez que impede a lixiviação da enzima. Os espectros de impedância estão de acordo com a voltametria cíclica, onde se observa que os eléctrodos CNx_CCl apresentam uma maior capacitância que CNT_CCl. A polimerização de EDOT na matriz tridimensional de CCl leva a uma diminuição significativa na resistência de transferência de carga. Os dois tipos de biossensor têm semelhantes propriedades interfaciais, com a camada enzimática a aumentar ligeiramente a resistência de transferência de carga.

Capítulo 5

Eléctrodos impressos modificados com nanotubos de carbono e com negro de carbono

Neste capítulo é descrito o trabalho efectuado com eléctrodos impressos (SPE). Estes eléctrodos devido ao seu baixo custo e simplicidade de operação, foram utilizados como substrato electroquímico para diferentes modificações (MWCNT, CB e Cu-NP) com o intuito de se desenvolver um sensor para a determinação directa de aminoácidos [282].

5.1 Introdução

Aminoácidos, como blocos de construção das moléculas biológicas, desempenham um papel fundamental nos mecanismos de resposta neuroquímicos, tais como a memória, controle de apetite e transmissão de dor [283]. Estudos bioquímicos e patológicos recentes em células cancerígenas apontam para a existência de flutuação dos níveis de nutrientes entre as células normais e cancerígenas. Muitos estudos têm demonstrado que variações nas concentrações de aminoácidos essenciais tais como o triptofano, asparagina, tirosina em mamíferos, podem agir como biomarcadores para o crescimento das células cancerígenas e para expressão genética Para além da sua grande utilidade como biomarcadores, os aminoácidos também tem um papel fundamental na correcção de possíveis deficiências diatéticas [284, 285], sendo desta forma frequentemente adicionados aos alimentos durante a sua confecção, o que faz com que seja cada vez mais relevante o desenvolvimento de técnicas que permitam a sua determinação [286]

Um dos 20 aminoácidos essenciais para os seres humanos é o triptofano (Trp). Este é um constituinte essencial de proteínas, sendo um precursor do neurotransmissor serotonina, e também indispensável na alimentação humana de forma a se estabelecer um balanço positivo de azoto no nosso organismo. Durante a última década, inúmeros procedimentos envolvendo a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram desenvolvidos com sucesso e implementados na determinação de aminoácidos [287], mas nos últimos anos, têm havido preferência, tanto por conveniência como por simplicidade, pelo desenvolvimento de metodologias de detecção que não requeiram derivatização [288]. Em alguns casos, a detecção quantitativa de certos compostos não é

necessária; apenas é suficiente a detecção qualitativa, como no caso de contaminação, onde a presença de certos contaminantes, por si só indica a qualidade inaceitável de alimentos.

Uma das possibilidades para a determinação rápida de aminoácidos é o uso de técnicas electroquímicas. Uma vez que os aminoácidos têm pelo menos dois grupos funcionais activos (dependendo do pH):-NH2 e-COOH, eles têm a capacidade de complexar alguns metais de transição, por exemplo o níquel [289] e o cobre [290], que é por sua vez um dos iões metálicos mais fáceis de complexar como ião Cu (II).

Métodos electroquímicos têm encontrado muitas aplicações na determinação de aminoácidos com caracter electroactivo. Triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e cisteína (Cys) são exemplos de aminoácidos que, devido à electroactividade inerente dos seus grupos tiol ou aromáticos, dão uma resposta electroquímica [291]. Diversos materiais de eléctrodo, tais como o carbono, platina e ouro têm sido usados [292] mas, infelizmente, a resposta voltamétrica não tem mostrado ser satisfatória, uma vez que a transferência de electrões nestes processos é demasiado lenta [293]. Portanto, é necessário desenvolver e empregar eléctrodos fisicamente e quimicamente modificados, a fim de se facilitar a oxidação anódica deste tipo de aminoácidos [294].

Como foi mencionado nos capítulos anteriores, os nanotubos de carbono têm propriedades únicas [16] devido à sua alta estabilidade química, alta rigidez mecânica, condutividade térmica, comportamento semicondutor [295]. Eles são utilizados como materiais de eléctrodo, porque como se observou nos capítulos anteriores, a presença dos nanotubos serve para aumentar a transferência de electrões entre as espécies electroactivas e o eléctrodo [296, 297] o que torna os CNT muito úteis para o desenvolvimento de sensores químicos ou de biossensores.

No capítulo 3 observou-se que a incorporação de um mediador redox aumentou a aplicabilidade e a performance dos CNT, nomeadamente dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT). Neste capítulo vai ser estudada a integração de nanopartículas metálicas, como catalisadores, na construção de sensores electroquímicos, uma vez que estas demonstram ter uma resistência de contacto óhmica muito baixa quando integradas em estruturas compostas [298, 299]. A incorporação de nanopartículas de metais de transição, incluindo ouro, platina, paládio, cobre, prata [300-304] têm sido cada

vez mais utilizadas de forma a aumentar a actividade e consequente resposta electroquímica.

Em contraste, as perspectivas anteriormente mencionadas para o uso de nanotubos de carbono são ofuscadas pelos custos de produção excessivamente altos e problemas relacionados com a com a pureza dos mesmos. Ozawa e Osawa realizaram um amplo estudo comparativo dos custos de produção desses nanomateriais de carbono e apontaram os enormes custos de produção dos nanotubos, principalmente os nanotubos de carbono de parede simples [32]. Além disso, ocorrem alterações nas propriedades dos nanotubos dependente da proveniência, do tipo de síntese utilizada, etc. Estas diferenças, já foram estudadas quantativamente no capítulo 3 e já foram alvo de publicação [115].

Numa altura de controlo de custos como é aquele em que vivemos, somos confrontados com a necessidade de explorar o custo-eficácia dos materiais utilizados na modificação de eléctrodos, especialmente quando se utiliza eléctrodos do tipo descartável como é o caso dos SPE (secção 1.2.2). No presente trabalho, optou-se por trabalhar também com negro de carbono uma vez que é um material de carbono produzido em grande escala e tem um custo de produção extremamente baixa, sendo cerca de 50 mil vezes mais barato do que MWCNT, além de apresentar um grau de pureza elevado e excelente homogeneidade [305]. Para além das propriedades mencionadas, estudos recentes demonstraram uma melhor biocompatibilidade por parte do negro de carbono em comparação com nanotubos de carbono [306]. Estes materiais micro/nanoestruturados apresentam um grande número de locais com defeitos, e são frequentemente utilizados como um suporte de catalisador em células de combustível [40, 307], devido à sua estabilidade relativamente elevada tanto em meio ácido como meio básico, boa condutividade electrónica e elevada área superficial específica [308]. Poucas aplicações têm sido publicadas sobre o uso de CB como material de eléctrodo para detecção do analito em solução [309]. Juntamente com o negro de carbono, as nanopartículas de cobre, que por sua vez também apresentam baixo custo em comparação com os seus homólogos de metais nobres, também foram seleccionadas como modificadores de eléctrodos devido à sua interacção activa com aminoácidos [300, 309].

Eléctrodos impressos (SPE) representam uma das alternativas mais interessantes e de mais baixo custo para a arquitectura de sensores electroquímicos para aplicações

biomédicas, análises ambientais e industriais [56]. A caracterização e identificação dos locais com defeitos presentes nos SPE de carbono [310, 311] mostra que o desempenho analítico destes eléctrodos pode ser melhorado, aumentando o número de sítios com defeito na sua superfície. Desta forma, as nano/micro partículas de carbono tais como CNT e CB mostram ser ideais para modificar os SPE, de forma a melhorar as suas propriedades electroquímicas. Por isso, neste trabalho utilizou-se os SPE como substrato para diferentes modificações (CNT, CB, Cu), a fim de se avaliar e melhorar a determinação de aminoácidos, nomeadamente o triptofano. Além disso, a viabilidade de eléctrodos compostos usando CB/Cu e CNT/Cu foram estudados e foi desenvolvido com sucesso, a um custo baixo, um sensor que utiliza as propriedades electrocatalítica provenientes da sinergia existente entre o negro de carbono e as nanopartículas de cobre.

5.2. Preparação e modificação dos eléctrodos

5.2.1. Pré-tratamento dos eléctrodos impressos

Antes de qualquer medição voltamétrica, a superfície do eléctrodo foi sujeita a um pré-tratamento a +1,6 V durante 120 s e de seguida a +1,8 V durante mais 60 s numa solução tampão de acetato 0,0025 mM pH = 4,6. Uma vez que o SPE utiliza uma pseudo-referência de tinta de prata (secção 1.2.2) é necessário utilizar 50 mM de KCl como electrólito de suporte para o bom funcionamento do eléctrodo de referência. A aplicação de altos potenciais positivos em meio ácido ajuda a aumentar as propriedades hidrófilicas da superfície do eléctrodo por meio da introdução de novos grupos funcionais oxigenados através de uma limpeza oxidativa [56].

5.2.2 Preparação de SPE modificados por MWCNT e CB

Os MWCNT utilizados foram funcionalizados como vem descrito na secção 3.2.1. Após a funcionalização química, fez-se uma suspensão de MWCNT em Nafion, através da adição de 0,5 mg de MWCNT em 1ml de solução Nafion 0,1% (em etanol). Em seguida, colocou-se no ultra-som esta dispersão num banho de ultra-sons durante 1 h, e diferentes

volumes (2-10 µl) desta suspensão foram depositados na superfície do eléctrodo de trabalho do SPE e deixada a evaporar por um período mínimo de 4 h.

A área de superfície e dimensão das partículas de negro de carbono dependem, em grande medida, do seu método de produção [287]. Neste trabalho, foi utilizado um tipo de CB, N220, produzido num forno comercial.

À semelhança do que sucedeu com os MWCNT, o negro de carbono foi funcionalizado numa solução concentrada de ácido nítrico durante 24 h, com agitação. Posteriormente, o CB funcionalizado foi deixado a secar num forno a 80 ºC durante 24 h. A fim de se obter uma dispersão estável de CB com boa reprodutibilidade, os SPE foram modificados com CB através da deposição, em que uma dispersão CB foi preparada em acetonitrilo a fim de alcançar uma evaporação rápida de solvente e uma produção mais rápida do sensor. Anteriormente, Arduini [35] relatou que o CB N330, após a irradiação de ultra-som, à temperatura ambiente e à pressão atmosférica sob azoto durante cerca de 44 min, formou nanofolhas de carbono de uma espessura de poucos nanómetros [56]. A sonicação foi então limitada a 30 min, porque, de acordo com Arduini, este tempo é suficiente para reduzir o número de partículas presentes em cada agregado de forma a melhorar a solubilização do negro de carbono, sem alterar a estrutura do CB, obtendo-se assim uma suspensão de CB estável e homogénea [35].

Diferentes concentrações da dispersão CB em acetonitrilo foram avaliadas em conjunto com estudos electroquímicos. Resultados similares foram obtidos para diferentes cargas de CB, mas, após a análise de dados, foi decidido utilizar uma concentração de dispersão igual a 1 mg ml^{-1}. Tal como no caso dos MWCNT, após a deposição, os eléctrodos foram deixados a secar ao ar.

5.2.3. Electrodeposição de nanopartículas de cobre

Nanopartículas de cobre foram electroquimicamente depositadas sobre eléctrodos de SPE, CB/SPE e MWCNT/SPE a um potencial de -1,0 V numa solução de Na_2SO_4 0,1 M de + $CuSO_4$ 2,0 mM e desoxigenada com azoto de elevada pureza, durante 10 min [304].

5.3 Optimização da preparação do eléctrodo modificado

5.3.1. Escolha da concentração de CNT e CB

A escolha da quantidade de CNT e CB a ser depositada sobre a superfície do eléctrodo para um desempenho óptimo do sensor foi avaliada por monitorização da corrente de pico como função da concentração de Trp por voltametria de onda quadrada. A Fig. 5.1 mostra a resposta de oxidação de Trp, e observa-se que esta aumenta com a quantidade de CNT depositada sobre a superfície do eléctrodo até a um valor máximo correspondente a um volume de CNT de 6 µL, acima da qual a resposta do pico de corrente diminuiu ligeiramente. Este comportamento pode estar relacionado com o aumento da espessura da camada de CNT que cobre o eléctrodo que por sua vez pode impedir o movimento da carga, diminuindo desta forma a condutividade eléctrica [115].

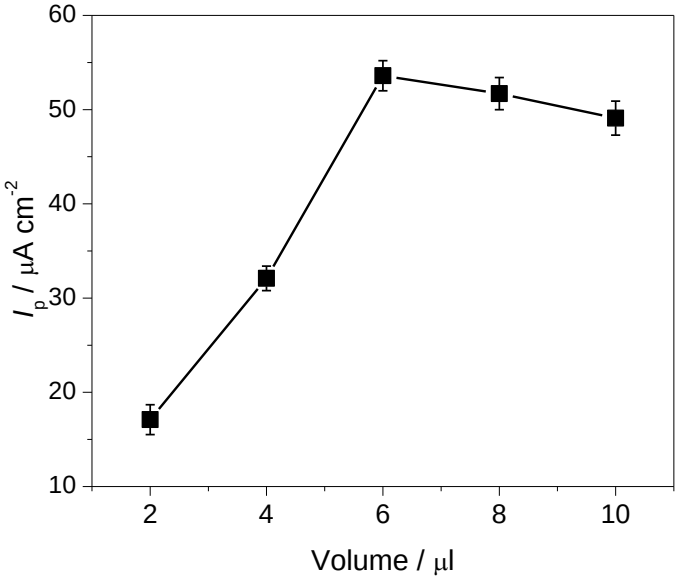


Figura 5.1 - Relação entre a corrente do pico de oxidação para uma concentração de 100 µM de Trp em KCl 0,1 M e o volume de uma solução de CNTs depositado na superfície do SPE.

Observações semelhantes foram feitas a respeito da modificação com o negro de carbono. O volume óptimo de CB encontrado foi de 8 µL em adições separadas de 2 µL. Acima deste volume observou-se a diminuição da resposta para a oxidação de Trp, devido ao bloqueio da superficie.

5.3.2. Estudo do potencial de pré-concentração

O potencial de pré-concentração e tempo de deposição de Trp são factores de extrema importância e devem ser tidos em consideração, uma vez que a resposta amperométrica dos eléctrodos impressos modificados é afectada não só pela concentração de CNT ou CB, mas também pelas nanopartículas de Cu depositados. A influência do potencial de pré-concentração sobre a resposta electroquímica foi investigada, ver a Tabela 5.1. A corrente-resposta para os sensores modificados aumenta para potenciais mais negativos até -0,2 V, com aumentos significativos a ocorrerem na presença de nanopartículas de Cu até ao potencial de -0,3 V. No entanto, para pré-concentração, em potenciais ainda mais negativos (≤ -0,3 V) observa-se uma diminuição de corrente de pico relativa à oxidação do Trp.

Tabela 5.1 -.Dependência da corrente de pico de oxidação (100 µM) com o potencial de oxidação dos eléctrodos modificados Cu/SPE; pré-concentração de 60 s.

Potencial de pré-concentração	Corrente de pico (I_p/µA)		
	Cu/SPE	Cu/CNT/SPE	Cu/CB/SPE
0,0	7,4±0,6	27,1±0,9	12,2±0,6
-0,1	8,6±0,7	32±1,1	14,4±0,9
-0,2	10,3±0,7	32,1±0,7	18±1,2
-0,3	11,0±0,6	29±1,6	17±1,1
-0,5	10,5±0,8	25±1,2	16,7±0,9
-0,7	9,6±0,5	23±1,1	15±1,0

De acordo com resultados presentes na literatura [312], um aumento na corrente a 0,0 V foi observado (dados não mostrados) para a oxidação de Cu_2O, na superficie das partículas de Cu, para CuO na presença do aminoácido, seguido da formação de um complexo entre Cu (II) e Trp, de acordo com:

$$Cu(II) + 2Trp^{-} \rightleftharpoons Cu(Trp)^{+} + Trp^{-} \rightleftharpoons Cu(Trp)_2 \quad (5.1)$$

A partir dos valores da Tabela 5.1, a resposta máxima para as diferentes modificações ocorre para um potencial de deposição de cerca de -0,2 V, sendo este o potencial escolhido para o restante trabalho.

Para este potencial (-0,2 V) está presente o equilíbrio $Cu^{II}O$ / $Cu^{I}O$ e as superfícies dos eléctrodos enriquecidas com $Cu^{II}O$ / $Cu^{I}O$ mostram ser estáveis e eficientes para a complexação selectiva de aminoácidos [312]. Desta forma, pode-se concluir que a adsorção do complexo Cu(II) aminoácido resulta duma pré-concentração efectiva juntamente com a electro-oxidação de Trp mediada por CuO, que vai conduzir a um aumento cumulativo do sinal de corrente.

Quando o potencial de pré-concentração de -0,2 V foi mantido por mais de 60 s, observou-se que o sinal correspondente ao triptofano diminuía, uma vez que o equilíbrio $Cu^{II}O/Cu^{I}O$ é deslocado para Cu(I)O, resultando no deslocamento do equilíbrio que envolve o complexo cobre -triptofano (eq. 5.1) na direcção de Cu (II) (cobre livre). Este efeito é maior para potenciais aplicados mais negativos do que-0,3V, onde há uma queda imediata na corrente de pico de oxidação, uma vez que, nestas condições, Cu (0) pode também ser formado, como observado em [312]. Estes factos indicam o papel crucial do sistema reversivel Cu(II)O/Cu(I)O/Cu(0) para a obtenção do sinal analítico ideal para o triptofano.

5.3.3 Estudo do tempo de pré-concentração

A corrente de pico relativa à oxidação de 100 µM de Trp nos eléctrodos modificados aumentou com o aumento do tempo de pré-concentração até um máximo de 60 s, acima do qual se observou uma ligeira diminuição para os valores de corrente de pico obtidos (Fig. 5.2). Este comportamento poderá estar relacionado com o equilíbrio reversível Cu^{I}/Cu^{II} que ocorre para o potencial -0,2 V. Na presença de aminoácidos, o equilíbrio é deslocado para a formação do complexo Cu (II) – aminoácido até um certo limite, para além do qual o equilíbrio é deslocado no sentido oposto, resultando então na formação de óxido Cu (I) e o respectivo aminoácido fica desadsorvido na solução [312].

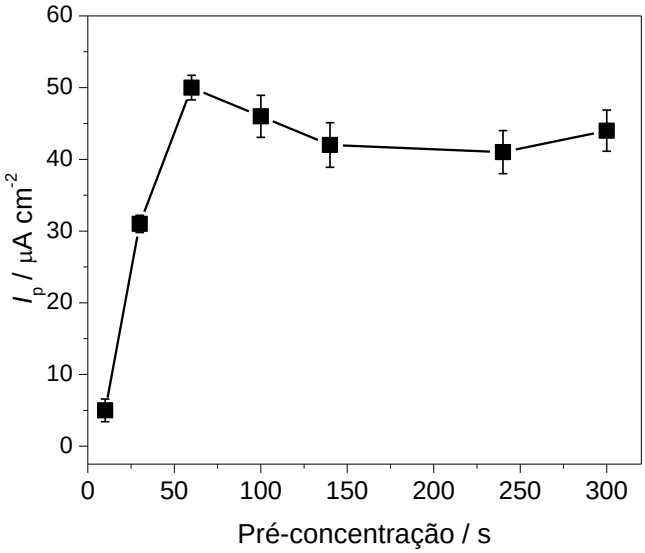


Figura 5.2 - Dependência da corrente de pico de oxidação (100 µM) em KCl 0,1 M com o tempo de pré-concentração no eléctrodo modificado Cu/CNT/SPE.

Relativamente à Fig. 5.2, observou-se uma resposta não muito constante, evidenciada pelo aumento do erro relativo. De salientar que apesar de as correntes obtidas serem menores em valor absoluto, o comportamento para os eléctrodos modificados com CB foi semelhante ao observado para os nanotubos de carbono.

5.4. Caracterização dos eléctrodos SPE modificados

Foi feita a caracterização morfológica dos eléctrodos impressos modificados através da utilização de um microscópio electrónico de varrimento. A caracterização electroquímica foi efectuada através da técnica de voltametria cíclica, que, entre outros parâmetros, fornece informações sobre a área electroactiva dos diferentes eléctrodos. A técnica de impedância electroquímica auxilia a compreensão dos fenómenos electroquímicos que ocorrem na superficie dos diferentes eléctrodos modificados.

5.4.1. Caracterização morfológica

Observações feitas às micrografias obtidas por microscopia de varrimento electrónico (SEM), Fig. 5.3, revelam que as partículas de cobre nanométricas são

depositadas e distribuídas ao longo da superfície dos SPE modificados com CNT e CB. Nas imagens de SEM, a diferença entre as amostras com e sem cobre depositado é claramente visível; ambas as modificações (CB e CNT) com cobre apresentam deposição de partículas com diâmetros semelhantes de ~40 nm e estas apresentam-se agregadas em nano-aglomerados.

No caso do eléctrodo de SPE modificado com CNT (Fig. 5.3b), observou-se que a quantidade de cobre depositado é visivelmente maior que aquela obtida para os SPE modificados com CB (Fig. 5.3d). Isto poderá ser devido ao facto de os nanotubos de carbono providenciarem uma área superficial activa superior à dos eléctrodos modificados pelo CB. Esta observação torna-se mais evidente a partir dos estudos de voltametria cíclica discutidos a seguir.

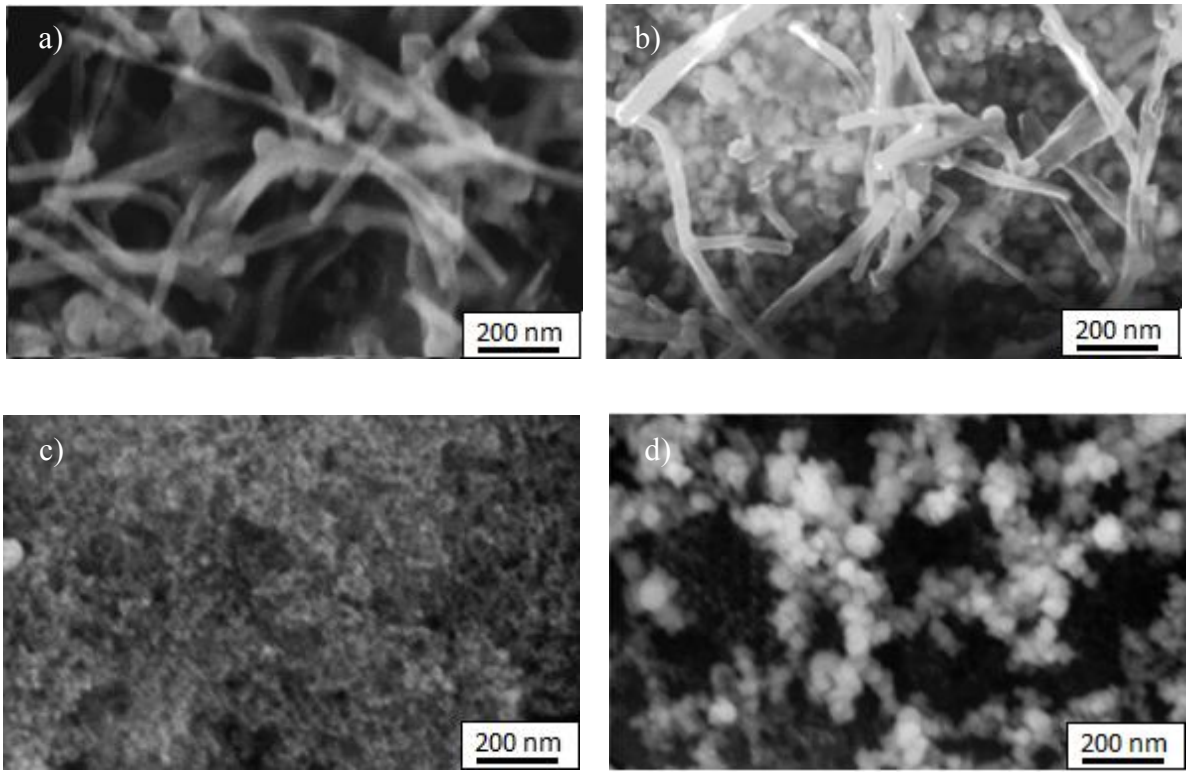


Figura 5.3 - Micrografias de SEM: (a) CNT/SPE (b) Cu/CNT/SPE (c) CB/SPE (d) Cu/CB/SPE.

A partir das micrografias de SEM, também se pode observar que, para o caso dos eléctrodos modificados por CB, há uma maior predominância de partículas de Cu na

superfície do eléctrodo. Essa predominância mostra que as partículas de CB estão dispostas de uma forma muito compacta e homogénea [32] em comparação, por exemplo, com os CNT. Desta forma observa-se que os espaços intersticiais existentes no negro de carbono poderão ter dimensões demasiado pequenas para que as nanopartículas de cobre consigam penetrar neles.

5.4.2. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (CV) foi utilizada para caracterizar electroquimicamente as diferentes modificações nos SPE, e tentar avaliar as diferenças e semelhanças entre a utilização de CNT ou CB. Os voltamogramas cíclicos obtidos nos diferentes eléctrodos SPE, CB/SPE e CNT/SPE na presença de $Fe(CN)_6^{4-}$ 3,0 mM numa solução de electrólito KCl 0,1 M são mostrados na Fig. 4.3. Uma vez mais a superfície electroactiva foi calculada usando a equação de Randles-Sevcik (eq. 3.1).

No caso de um SPE sem qualquer modificação, observou-se um comportamento electroquímico *quasi*-reversível de um electrão de hexacianoferrato (II), apresentando uma separação de pico anódico e catódico de 100 mV a uma velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1}. Depois de se proceder à modificação dos SPE com os compostos carbonáceos, observou-se que ocorreu um aumento considerável das correntes de pico, ao mesmo tempo que ΔEp diminuiu em relação ao SPE sem qualquer modificação.

Como era esperado, o maior aumento de área electroactiva foi para a modificação de SPE com CNT, obtendo-se uma área de 0,17 cm^2, que é muito maior do que a área geométrica dos SPE que é de 0,070 cm^2. Relativamente à modificação com CB, verificou-se que a presença destas micropartículas aumenta a área electroactiva do SPE (23%), mas este aumento é inferior ao verificado para os nanotubos (Fig. 5.4.)

A resposta após a electrodeposição de cobre nas diferentes modificações de SPE foi também estudada, onde a modificação de Cu/SPE mostra uma melhoria no comportamento electroquímico e um carácter mais reversível do que na ausência de cobre (Fig. 5.4).

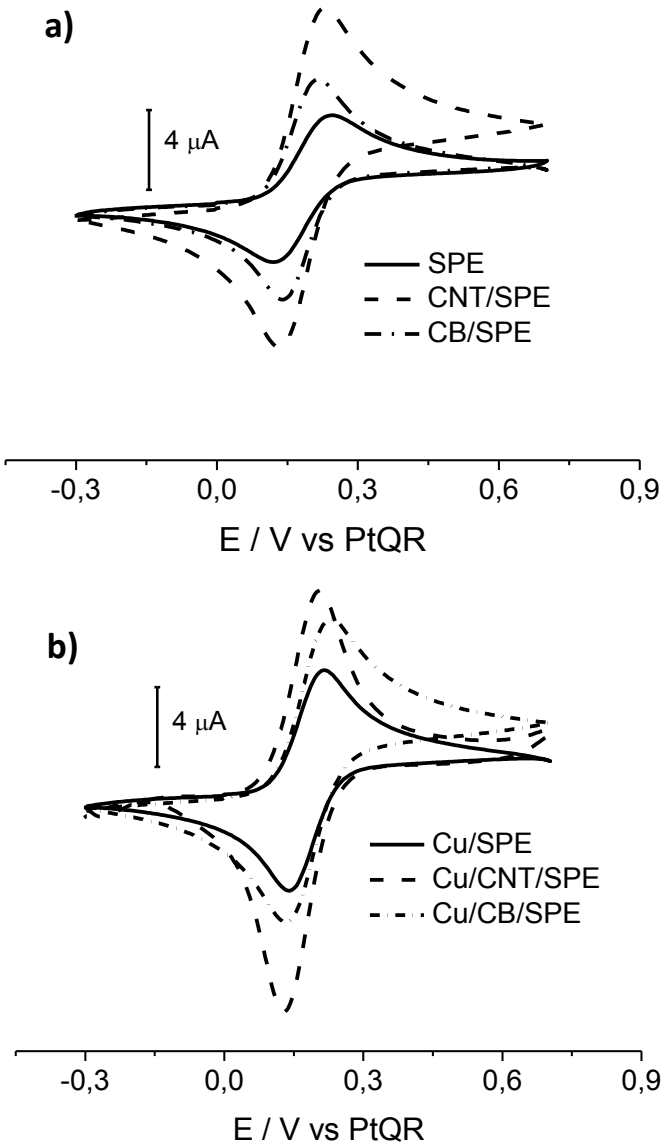


Figura 5.4 - Voltamogramas cíclicos com as correntes de base subtraídas, obtidos numa solução de KCl 0,1 M com 3 mM de $K_4Fe(CN_6)$ em SPEs modificados com (a) CNT e CB (b) Cu/CNT e Cu/CB. Velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1}.

Um aumento na corrente de ambos os picos foi observada para ambos os eléctrodos Cu/CB/SPE e Cu/CNT/SPE e, embora a resposta (valor absoluto de corrente de pico) continue a ser maior para o eléctrodo modificado com CNT, o aumento relativo da resposta electroquímica (na presença de cobre em comparação com a sua ausência) foi maior para os SPE modificados com CB, o que indica que poderá estar a ocorrer um fenómeno diferente na superfície do eléctrodo. Este comportamento anómalo do CB na presença de nanopartículas de cobre pode ser explicado com base na redução da área de superfície de CB após a sua funcionalização, tal como foi mencionado em trabalhos prévios [308].

Carmo e colaboradores, mencionaram que a introdução de grupos funcionais oxigenados no negro de carbono após a funcionalização com ácido nítrico (secção 5.2.2) provoca a obstrução dos poros [308]. Este bloqueio dos poros do CB, faz com que a electrodeposição das nanopartículas de cobre ocorra preferencialmente sobre a superfície exterior do CB (Fig. 5.3d) aumentando assim a exposição e consequente interacção do cobre com os aminoácidos. Assim sendo, um efeito sinergético do substrato Cu / CB pode causar um enriquecimento eficiente do complexo Cu (II):aminoácido na superfície do eléctrodo e subsequente electrooxidação mediada por CuO.

5.4.3. Espectroscopia de impedância electroquímica

Os eléctrodos SPE e SPE modificados com CB e CNT foram caracterizados por EIS e as medidas foram realizadas numa solução electrolítica de 0,1 M de KCl a +0,70 V *vs* Ag/AgCl pseudo-referência (ver secção 1.2.2). Uma vez que os dados mostram uma tendência para semicírculos, utilizou-se um elemento de fase constante (CPE) em vez de um condensador simples, para representar a separação de carga na região interfacial [35], de acordo com a relação CPE = $-1/(Ci\omega)^{\alpha}$, onde C é a capacitância (descreve a separação de carga na interface da dupla camada), ω é a frequência angular e α é o factor de rugosidade (devido à heterogeneidade e não uniformidade da superfície). Diferentes circuitos eléctricos equivalentes foram testados, com a finalidade de se ajustar bem os espectros, pelo método dos mínimos quadrados não linear. A escolha final recaiu num único circuito eléctrico representado na Fig. 5.5, constituído por uma resistência da célula, R_{Ω} em série com uma combinação em paralelo de um elemento de fase constante, C_{dl}, e uma resistência de transferência de carga, R_{ct}, com uma média de erro (χ^2) para as diferentes modificações de $<3 \times 10^{-4}$. Devido ao comportamento resistivo inerente aos SPE sem qualquer modificação, o elemento R_{ct}, foi removido do circuito.

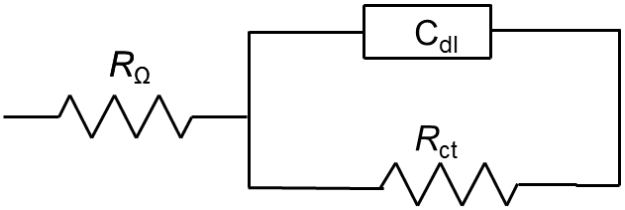


Figura 5.5 - Circuito eléctrico equivalente.

Os espectros de impedância no plano complexo para todos os tipos de eléctrodos modificados estão representados na Fig. 5.6, juntamente com os respectivos ajustes teóricos, cujos valores dos parâmetros obtidos são apresentados na Tabela 5.2.

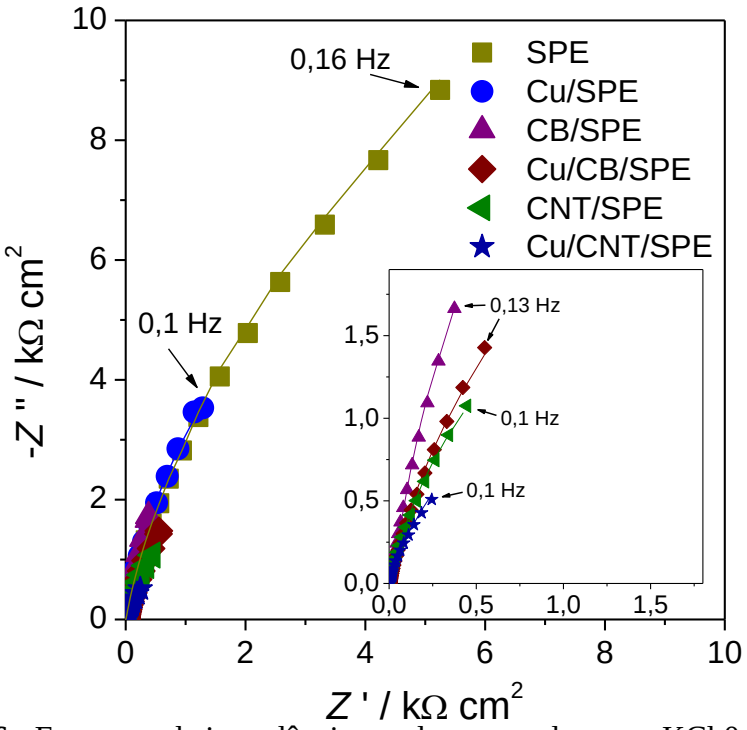


Figura 5.6 - Espectros de impedância no plano complexo em KCl 0,1 M para + 0,7 V *vs.* pseudo-referência. O *inset* amplia os espectros de todos os eléctrodos modificados à excepção de Cu / SPE. As linhas representam o ajuste pelo circuito equivalente.

Observando os valores de CPE, a influência das modificações com os carbonáceos nos SPE é facilmente observável, e conduz a um aumento dos valores de capacitância por um factor de ≈ 6 para CB, em comparação com o SPE sem qualquer modificação. No que diz respeito à modificação com CNT, de acordo com os valores presentes na Tabela 5.2 há um aumento ainda maior da capacitância (≈ 28 x) em relação aos SPE. Para os eléctrodos modificados com nanopartículas de cobre, observa-se uma diminuição dos valores de impedância (Fig. 5.6), revelando uma resistência à transferência de electrões muito mais baixa para os eléctrodos modificados com cobre.

Tabela 5.2 - Parâmetros obtidos através do ajuste do circuito eléctrico equivalente, para diferentes espectros de impedância.

Eléctrodo	R_{Ω} / Ω cm^2	R_{ct} / kΩ cm^2	C / mF cm^{-2} s$^{\alpha-1}$	α
SPE	4,0	--	0,22	0,76
Cu/SPE	3,6	36,4	0,51	0,80
CNT/SPE	3,9	4,32	6,2	0,86
Cu/CNT/SPE	4,2	2,99	8,4	0,85
CB/SPE	3,9	7,00	1,2	0,81
Cu/CB/SPE	4,0	3,43	1,2	0,85

Estes resultados são coerentes com o que foi observado anteriormente por voltametria cíclica e demonstram que a modificação dos SPE melhora através de um efeito sinérgico devido à modificação com nanopartículas Cu – nanopartículas de carbono, cuja presença possibilita melhores vias de condução de electrões melhorando as propriedades electroquímicas destes eléctrodos impressos.

5.5. Estudo da oxidação electrocatalítica de triptofano na superfície de SPE modificado com nanopartículas

5.5.1. Voltametria de onda quadrada

A oxidação e redução electroquímica são geralmente processos irreversíveis e ocorrem a altos potenciais positivos e negativos, respectivamente. Em diversos estudos, o triptofano apresentou picos bem definidos de oxidação na janela de potencial compreendida entre + 0,70 e +0,85 V [294, 313, 314]. A técnica de SWV foi usada para investigar o comportamento electroquímico de Trp em KCl 0,1 M, e para a janela de potencial compreendida entre 0,0 e +1,1 V, apenas um único pico de oxidação foi observado. A Figura 5.7 mostra que para um eléctrodo impresso, o potencial de oxidação de Trp é de +0,798 V. Para CNT / SPE, a oxidação de Trp ocorre em +0,691 V, observando-se um deslocamento de pico de 0,11 V. Este deslocamento do potencial de

pico para sobrepotenciais menores, é indicativo da ocorrência de um efeito electrocatalítico causado pela modificação com os CNTs. A modificação com negro de carbono (CB/SPE) também melhora a resposta electroquímica para a oxidação de Trp.

Comparando CNT/SPE e CB/SPE, embora o aumento da corrente do pico de oxidação e a diminuição do sobrepotencial seja maior para a modificação com CNT, a modificação com CB também apresenta melhorias em relação ao SPE, observando-se também a existência de um comportamento electrocatalítico por parte do CB. Era esperado que as correntes de oxidação fossem maiores para a modificação CNT/SPE uma vez que se verificou anteriormente que a área electroactiva destes eléctrodos era muito maior do que a de CB/SPE.

Observou-se um aumento da resposta da oxidação de triptofano para os eléctrodos modificados com Cu, mesmo aqueles sem qualquer nanopartícula de carbono. A Fig. 5.7b mostra que há um aumento de aproximadamente 1,5 vezes na corrente de pico, que pode ser atribuído a um efeito catalítico mais eficiente por parte das nanopartículas de cobre. Relativamente à modificação com CNT, a Fig. 5.7b mostra que o híbrido Cu/CNT pode acelerar a transferência de electrões melhorando assim o desempenho electroquímico [315].

Observa-se a ocorrência de uma melhoria de desempenho do eléctrodo Cu/CB/SPE após a electrodeposição de cobre em SPE modificado com CB funcionalizado. Para os eléctrodos com negro de carbono não funcionalizados, não se verificou muita diferença na resposta electroquímica para a oxidação de Trp na presença e na ausência de cobre (dados não mostrados), sugerindo que o negro de carbono não funcionalizado é inadequado para a deposição do metal. A funcionalização da superfície CB por tratamento com ácido nítrico introduz grupos funcionais com oxigénio, alterando o carácter hidrofóbico/hidrofílico destes carbonáceos. Após a funcionalização a reactividade é alterada e as propriedades catalíticas bem como a polaridade (potencial zeta) modificadas [316-318]. Esta permite à superfície do CB ancorar as nanopartículas de metal e, assim, melhorar as propriedades electroquímicas do eléctrodo modificado Cu/CB/SPE observadas na Fig. 5.7b.

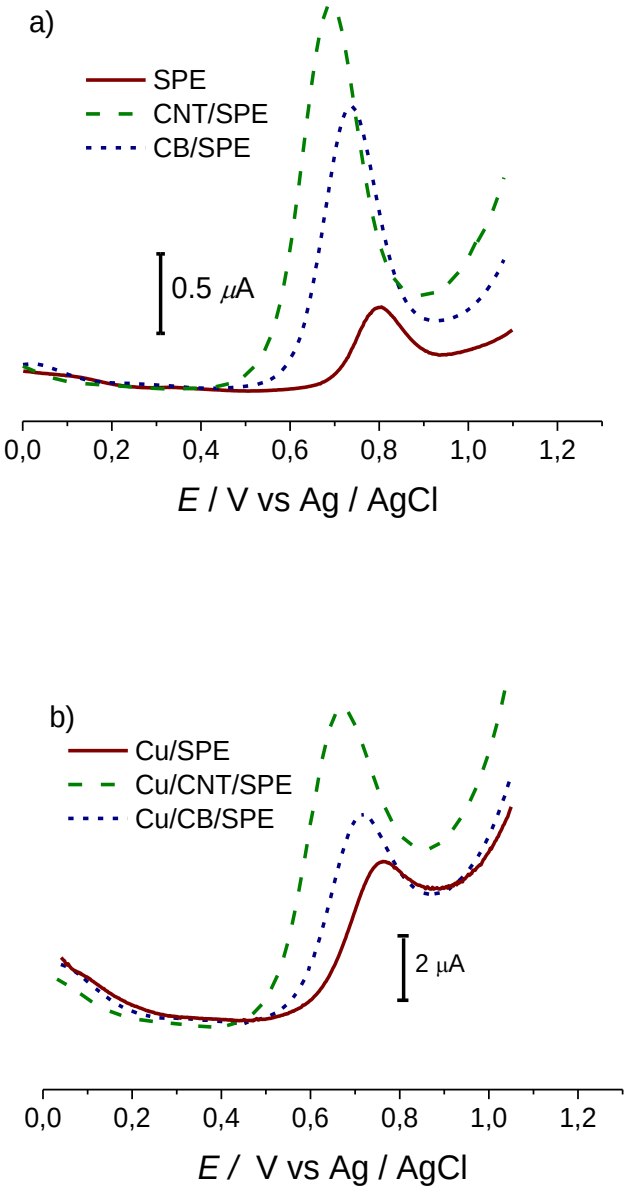


Figura 5.7 - SWV de Trp 50 µM numa solução de KCl 0,1 M para diferentes modificações de eléctrodos: a) SPE, CB/SPE e CNT/SPE; b) Cu/SPE, Cu/CB/SPE e Cu/CNT/SPE.

Embora na análise global dos voltamogramas (Fig. 5.7) é inegável que os eléctrodos impressos modificados com os nanotubos de carbono apresentem a melhor resposta global para a oxidação de Trp, a modificação com o negro de carbono conduz a um deslocamento negativo maior para o potencial de pico de oxidação na presença de nanopartículas de Cu, comparado com o obtido para CNT/SPE com e sem as nanopartículas de cobre.

De forma inesperada, também se verificou que o aumento relativo da corrente de pico (na ausência e presença de cobre) é maior no caso de CB/SPE do que para CNT/SPE. Esta interessante propriedade observada para o eléctrodo Cu/CB/SPE é devida a uma acumulação eficaz de partículas de cobre na estrutura exterior do CB, que permite que as nanopartículas de cobre estejam mais expostas aos grupos funcionais dos aminoácidos [308].

5.5.2. Espectroscopia de impedância electroquímica

Foram registados espectros de impedância para as diferentes modificações de eléctrodo numa solução de KCl 0,1 M na presença de Trp. Todos os espectros obtidos foram ajustados pelo circuito eléctrico equivalente utilizado anteriormente para a caracterização de SPE modificados e não modificados na ausência de triptofano (Fig.5.5). Os valores dos elementos do circuito equivalente são apresentados na Tabela 5.3.

Analisando o conjunto de espectros presentes na Fig. 5.8, observa-se que a adição de Trp 0,5 mM de à solução conduz a uma diminuição da resistência de transferência de carga de ≈55% para a modificação com CB e ≈ 84% para a modificação com CNT relativamente aos valores obtidos para o SPE (Tabela 5.3).

Relativamente aos eléctrodos modificados com nanopartículas de cobre, estes apresentaram, de uma maneira geral, uma melhor resposta electroquímica na presença de Trp. Este comportamento é facilmente observado na Fig 5.8, onde se verifica a diminuição de R_{ct}, na ordem de 65% para o eléctrodo Cu/CB/SPE e de 90% para o eléctrodo Cu/CNT/SPE, indicando que a transferência de electrões é facilitada pela presença das nanopartículas metálicas.

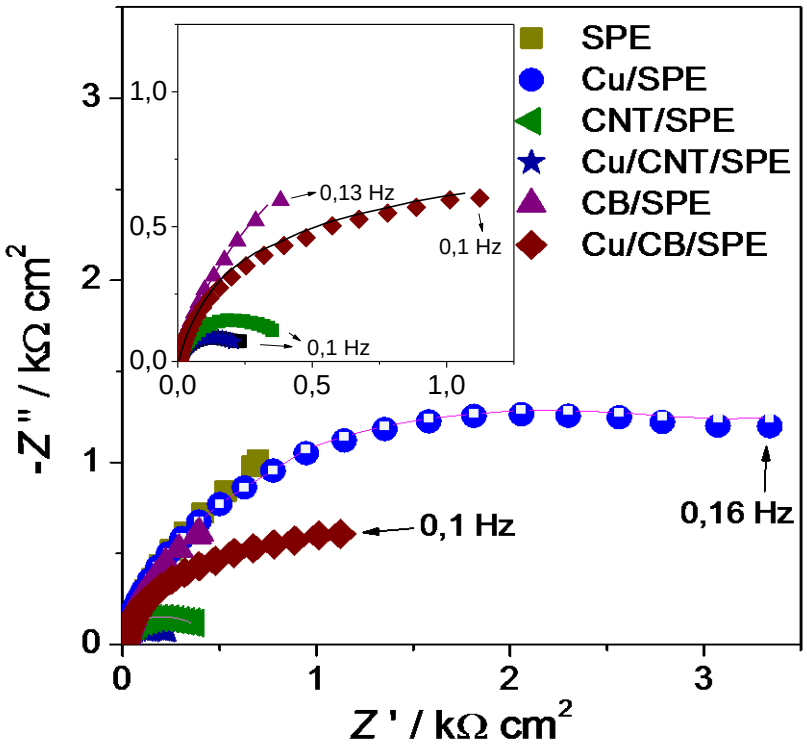


Figura 5.8 - Espectros de impedância no plano complexo em KCl 0,1 M + Trp 0,50 mM para + 0,7 V *vs*. pseudo-referência. O *inset* amplia os espectros de todos os eléctrodos modificados à excepção de Cu / SPE. As linhas representam o ajuste pelo circuito equivalente.

Tabela 5.3 - Parâmetros obtidos através do ajuste do circuito eléctrico equivalente, para diferentes espectros de impedância, em KCl 0,1 M + Trp 0,5 mM.

Eléctrodo	R_Ω / Ω cm^2	R_{ct} / kΩ cm^2	C_{dl} / mF cm^{-2} s$^{\alpha-1}$	α
SPE	4,2	10,6	0,36	0,81
Cu/SPE	3,3	12,2	0,72	0,83
CNT/SPE	3,9	0,72	8,8	0,90
Cu/CNT/SPE	3,6	0,39	10,5	0,89
CB/SPE	3,5	3,1	1,6	0,88
Cu/CB/SPE	3,7	2,12	1,6	0,87

Também se verificou um aumento dos valores da capacitância para os eléctrodos modificados na presença de Trp, devido a um aumento da acumulação de dupla camada de carga. Este comportamento é acompanhado por um aumento do expoente α, que significa que para os eléctrodos modificados, a superfície torna-se mais liso e mais uniforme na presença do aminoácido.

5.5.3 Parâmetros analíticos

O desempenho analítico dos eléctrodos modificados é demonstrado a partir dos dados obtidos através da técnica de SWV, cuja representação gráfica consta na Fig. 5.9. Observa-se que os picos de corrente de oxidação relativos à resposta electroquímica do sensor para concentrações crescentes de Trp (10-150 μM) resultam em picos bem definidos após cada adição do aminoácido. Além disso, é observado que na presença de nanopartículas de cobre o eléctrodo Cu/CB/SPE mostra um aumento na resposta de corrente de pico, bem como uma diminuição no potencial de oxidação.

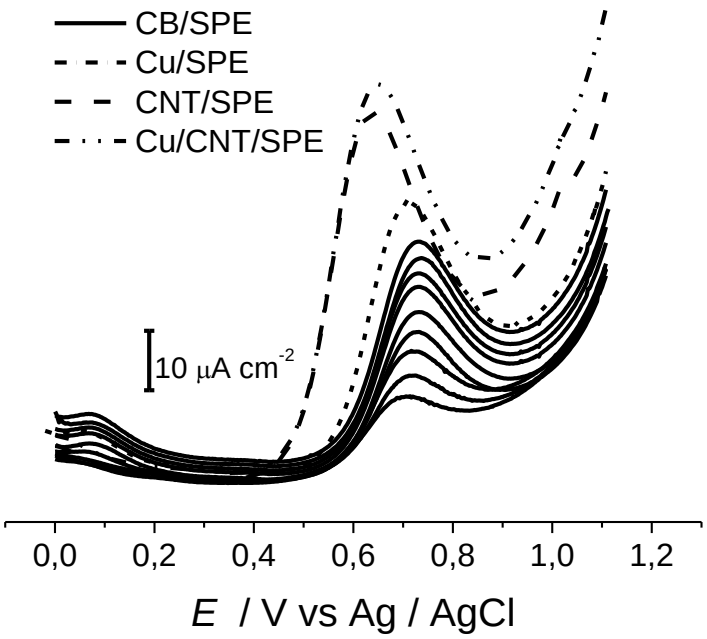


Figura 5.9 - SWV para diferentes concentrações de Trp desde 10 até 150 μM em KCl 0,1 M para CB/SPE e depois de Trp 150 μM para as outras modificações de SPE.

Os potenciais inferiores de oxidação obtidos para os SPE modificados com nanopartículas representam uma vantagem importante em comparação com os SPE normais, uma que este deslocamento para sobrepotenciais inferiores vai reduzir o número de respostas por parte de espécies interferentes (facilmente oxidáveis) que estão presentes em solução quando se trabalha com amostras naturais.

Na Fig 5.10 observa-se que a resposta electroquímica dos diferentes eléctrodos modificados aumenta linearmente com o aumento da concentração de Trp. Como mencionado anteriormente, estes resultados corroboram as observações anteriores de um melhor comportamento electroquímico por parte dos eléctrodos modificados com CNT, apresentando estes eléctrodos uma maior sensibilidade (1,16±0,07 $\mu A\ \mu M^{-1}\ cm^{-2}$) e um limite de detecção inferior (1,41 µM) comparado com o eléctrodo CB / SPE (Tabela 5.4).

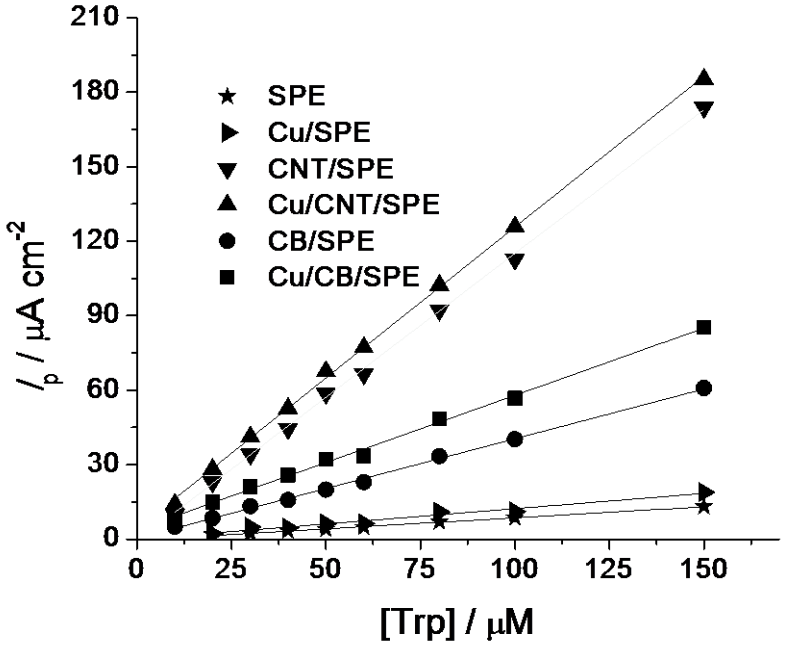


Figura 5.10 - Curvas de calibração calculadas a partir da corrente de pico de oxidação de Trp obtidas por SWV para as diferentes modificações de SPE.

O limite de detecção foi estimado a partir da relação sinal-ruído (S/N=3). É importante salientar que, embora a resposta electroquímica para os eléctrodos CNT/SPE melhore ligeiramente com a presença das nanopartículas de cobre, no caso dos SPE

modificados com o negro de carbono (CB/SPE) a presença de cobre melhora a resposta electroanalitica do CB de mais forma significativa. O efeito sinergético entre o CB e as nanopartículas de cobre conduz à ocorrência da electrocatálise.

5.5.4. Interferentes e estabilidade operacional

Outros aminoácidos (cistina e tirosina), que podem ser oxidados na superfície do eléctrodo [294, 319], foram seleccionados para testar a sua resposta electroquímica nos eléctrodos modificados para o Trp. Um estudo da interferência destes dois aminoácidos em relação ao Trp foi também realizado. A resposta electroquímica do SPE modificado para a oxidação destes aminoácidos (Cys e Tyr) foi então investigada e observou-se a ocorrência de um efeito electrocatalítico. Obteve-se um efeito electrocatalítico menor (ainda menor no caso da modificação com CB), de que o obtido para o Trp. A Tabela 5.4 mostra a melhoria nos LOD dos eléctrodos modificados com CNT ou CB, e o correspondente aumento na sensibilidade para a determinação de Trp em comparação com Tyr e Cys. Em relação à determinação de Trp na presença de Cys e Tyr, os resultados mostram que para o CB/SPE e CNT/SPE não há interferência perceptível até concentrações 10 vezes maior que Trp. Além disso, os eléctrodos de CB e CNT modificados com nanopartículas de cobre apresentam uma maior resposta electroquímica. Outra característica notável foi que a modificação com nanopartículas de cobre reduz o LOD e a sensibilidade dos eléctrodos CB/SPE sem sacrificar a selectividade.

Como a maioria das outras moléculas orgânicas, Trp adsorve facilmente sobre a superfície do eléctrodo e pode levar ao envenenamento, por bloqueamento, do eléctrodo. Para avaliar este possível comportamento, foram efectuados 8 ciclos consecutivos de CV na presença de Trp 100 mM, Fig. 5.11. Observa-se uma diminuição de cerca de 20% para os eléctrodos CB/SPE e CNT/SPE após o 8º ciclo. Embora haja uma diminuição da resposta, estes resultados demonstram que a capacidade anti-envenenamento dos eléctrodos nanoestruturados é muito maior do que o eléctrodo não modificado, onde se verifica que o SPE não modificado mostra uma diminuição na resposta de cerca de 60%. A Fig.5.11 mostra também que a presença de nanopartículas de cobre leva a uma diminuição da resposta dos eléctrodos, que pode ocorrer devido à formação do complexo Cu-Trp para potenciais inferiores [312].

Tabela 5.4.- Parâmetros analíticos para Trp, Tyr e Cys em SPE e SPE modificados SPE, em KCl 0,1 M, por SWV.

Eléctrodo	Aminoácido	LOD / μM	Sensibilidade / $\mu A\ \mu M^{-1}\ cm^{2}$
SPE	Trp	24±1,1	0,081±0,002
	Tyr	80±3,1	0,012±0,002
	Cys	97±5,1	0,007±0,001
Cu/SPE	Trp	16,7±0,9	0,12±0,01
	Tyr	67±1,2	0,013±0,002
	Cys	101±6,2	0,009±0,001
CNT/SPE	Trp	1,41±0,08	1,20±0,07
	Tyr	34±1,2	0,011±0,002
	Cys	74±2,2	0,051±0,003
Cu/CNT/SPE	Trp	3,5±0,3	1,11±0,09
	Tyr	22,3±0,9	0,091±0,004
	Cys	82±3,2	0,071±0,003
CB/SPE	Trp	7,1±0,6	0,41±0,02
	Tyr	50±1,4	0,051±0,001
	Cys	88±2,1	0,041±0,001
Cu/CB/SPE	Trp	3,8±0,21	0,05±0,030
	Tyr	31,3±0,9	0,009±0,001
	Cys	82±2,1	0,0021±0,0002

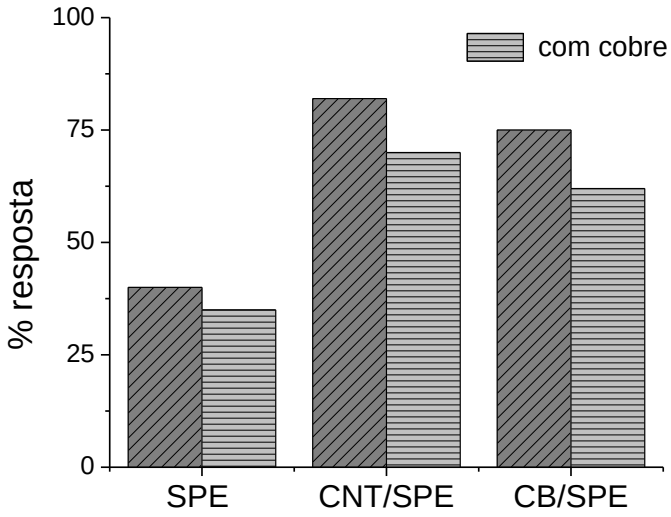


Figura 5.11 - Resposta do eléctrodo (%) após 8 ciclos de CV consecutivos (50 mV s^{-1}) para 100 µM Trp em KCl 0,1 M .

Uma vez que, devido à oxidação dos aminoácidos os eléctrodos SPE modificados estão sujeitos a problemas de passivação da superfície, o tempo de vida e de armazenamento dos diferentes eléctrodos foram também estudados. A estabilidade dos eléctrodos modificados foi estudada através da medição da resposta voltamétrica após diferentes períodos de armazenamento.

Para os SPE modificados com nanopartículas de carbono (CB e CNT) com e sem as nanopartículas de metal, não se verificou nenhuma diminuição aparente na resposta após uma semana. Os eléctrodos modificados mostraram uma retenção da resposta inicial semelhante de ≈95 e ≈88% até 15 e 30 dias, respectivamente.

5.6. Conclusões

Foi demonstrado que os SPE são adequados para a análise rápida de alguns aminoácidos, apresentando-se como um excelente substrato para a modificação de nanopartículas. As condições experimentais, incluindo a escolha da quantidade de CNT e CB, o tempo de pré-concentração de cobre e potencial foram investigados e além disso foi demonstrado que o negro de carbono, um material muito mais barato e acessível do que

nanotubos de carbono, pode ser usado na arquitectura de sensores electroquímicos. Os eléctrodos de CB modificados, apresentaram propriedades electrocatalíticas e provaram ser adequados para a deposição de nanopartículas de metal, observado pelo efeito sinérgico obtido com as nanopartículas de cobre que conduziram a uma melhoria na resposta electroquímica na determinação de Trp. As excelentes características dos eléctrodos modificados CB / SPE, tais como fabricação relativamente simples, baixo custo, alta estabilidade e biocompatibilidade garante um futuro promissor em análises clínicas e alimentares. A atracção comercial destes materiais pode ainda ser aumentada, através da optimização do método de produção destes eléctrodos, imprimindo as partículas de Cu/CB em conjunto com a tinta de carbono directamente no SPE.

Capítulo 6

6. Determinação de metais pesados por inibição enzimática

Neste capítulo está descrito a modificação de filmes de carbono (CF) com o mediador redox hexacianoferrato (cobalto e cobre) e com enzima glucose oxidase, com o intuito de se determinar diferentes metais pesados por cronoamperometria [320].

6.1. Introdução

A contaminação ambiental a partir de iões metálicos pesados é uma preocupação mundial. Após a sua acumulação na atmosfera eles transferem-se para a cadeia alimentar e conduzem a consequências graves para a saúde de seres humanos, animais e plantas. A sua toxicidade resulta da sua interacção com proteínas (especialmente enzimas) através da ligação aos grupos sulfidrílicos, conduzindo à inibição do metabolismo da glutationa e da função de numerosas enzimas e hormonas. Eles podem competir com os elementos de nutrientes para os sítios de ligação causando aberrações no metabolismo dos hidratos de carbono, proteínas, neurotransmissores e hormonas [321].

Os metais pesados são muitas vezes necessários em concentrações vestigiais em funções essenciais dos organismos vivos e seres humanos, mas tornam-se tóxicos se os valores de tolerância para o organismo respectivo forem excedidos [322]. Devido à sua elevada toxicidade existe uma necessidade óbvia de os determinar rapidamente. A crescente necessidade de métodos mais rápidos e mais custo-efectivos para o monitoramento ambiental, tem levado ao desenvolvimento de uma variedade de métodos no campo da análise, tais como métodos laboratoriais miniaturizados, kits de teste de campo e sensores (bio) químicos capazes de análises em concentrações vestigiais.

Em analises do meio ambiente, os metais pesados são geralmente detectados utilizando biossensores baseado na inibição da actividade da enzima, que são capazes de detectar elementos individuais e/ou espécies em baixas concentrações, e podem ser utilizados para análise *in-situ* e/ou procedimentos de rastreio de baixo custo [323]. Biossensores baseados em inibição, utilizam enzimas tais como urease (a mais usada) [322, 324] peroxidase [325, 326], álcool oxidase [327], colina oxidase [328], e os metais mais

determinados são o mercúrio [327, 329, 330], cobre [325, 327, 329], cádmio [322] e chumbo [325].

Glucose oxidase (GOx) é uma enzima ideal para estudos de inibição devido ao seu baixo custo, boa estabilidade e alta actividade específica, no entanto, o seu uso em biossensores de inibição enzimática não é generalizada. Existem, porém, alguns relatos sobre a inibição de metais pesados de GOx, imobilizada por diferentes métodos [331, 332].

O objectivo do trabalho descrito neste capítulo, consistiu na investigação de biossensores com glucose oxidase e com hexacianoferrato de cobalto ou cobre como mediadores redox na determinação quantitativa por inibição enzimática de metais pesados. A enzima foi imobilizada com glutaraldeído (GA) e albumina de soro bovino (BSA), para formar uma membrana biologicamente sensível. A diminuição de resposta do sensor para iões metálicos foi avaliada através da medição da actividade da enzima glucose oxidase após a adição de diferentes concentrações de iões metálicos. A resposta do biossensor para glucose na presença e na ausência de metais foi também determinada. A inibição de metais pesados usando diferentes configurações de biossensor foi avaliada e comparada com outros sensores da literatura, com especial atenção para as concentrações que conduzeam a uma inibição enzimática de 10% e 50%. Espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada para a caracterização dos eléctrodos modificados e, pela primeira vez, utilizada para monitorar o comportamento de um biosensor enzimático na presença e na ausência de metais pesados.

6.2. Preparação dos eléctrodos de filme de carbono

6.2.1. Pré-tratamento do eléctrodo

Devido à estrutura e fragilidade dos eléctrodos de filme de carbono (secção 1.2.3), estes não podem ser limpos por polimento mecânico com é o caso dos eléctrodos de carbono vítreo, uma vez que esta acção de polimento físico iria destruir a camada de carbono, assim sendo teve que se recorrer a métodos de pré-tratamento electroquímico.

Primeiro, um potencial fixo positivo de +0,9 V *vs* SCE foi aplicado durante 240 s [61], com a finalidade de se polarizar a superfície do eléctrodo. Esta polarização, conduz à oxidação de estruturas semelhantes à quinona que existem na superfície do eléctrodo.

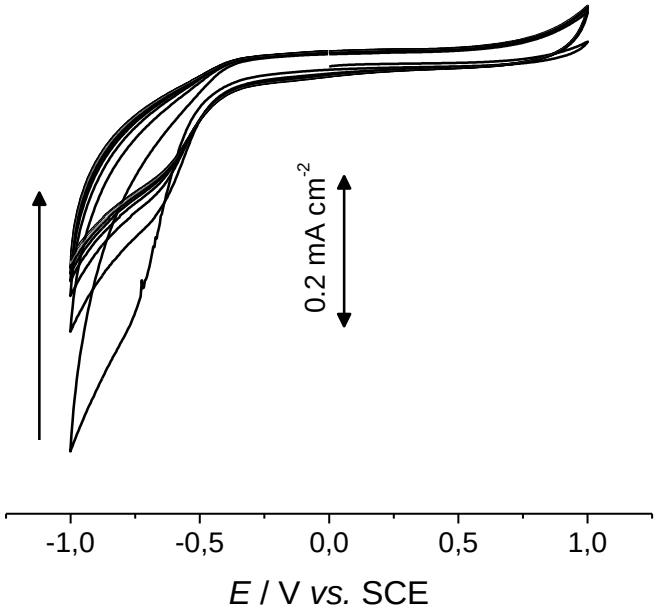


Figura 6.1 - Voltametria cíclica pré-tratamento de eléctrodos de filme de carbono; 50 mV s^{-1}.

Posteriormente, o potencial foi varrido entre -1,0 e +1,0 V *vs* SCE, a uma velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1}, até se obter um voltamograma estável (normalmente 5 a 10 ciclos). Após este pré-tratamento observa-se uma diminuição nas correntes de fundo e um aumento da janela de potencial dos eléctrodos, Fig 6.1.

6.2.2. Deposição de hexacianoferrato de cobalto

Filmes de hexacianoferrato de cobalto foram preparados por electrodeposição. Para este efeito, o eléctrodo de CF foi varrido 25 vezes entre os potenciais -0,2 e +0,9 V com uma velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} (Fig. 6.2A) em uma solução recentemente preparada, contendo 5 mM de $CoCl_2$, 2,5 mM de $K_3Fe(CN)_6$ e 0,05 M de NaCl, a pH 3,0 (ajustado com HCl) [167]. Após a deposição, os eléctrodos foram estabilizados durante 1 h em 0,05 M de NaCl, pH 3,0 e em seguida foram guardados no escuro até serem utilizados.

6.2.3. Deposição de hexacianoferrato de cobre

Para a deposição de hexacianoferrato de cobre, utilizou-se um método de deposição química, uma vez que se foi observado em trabalhos anteriores [163], que se obtém um filme mais robusto seguindo esta metodologia. A solução para a deposição foi preparada imediatamente antes da sua utilização e continha $CuCl_2$ 10 mM, $K_3Fe(CN)_6$ 10 mM e KCl 0,10 M (pH 5,5). Os eléctrodos de filme de carbono foram imersos em solução e esta foi deixada sob agitação contínua durante 50 min. Após a deposição, os filmes foram secos em ar quente durante 5 minutos e posteriormente "envelhecidos" durante um mínimo de 24 h no escuro.

6.2.4. Imobilização da enzima

A enzima glucose oxidase (secção 1.4.3) foi imobilizada pelo método de reticulação com glutaraldeído e albumina de soro bovino. Para a técnica de revestimento de gota [333], 1 mg de GOx e 4 mg de BSA foram dissolvidos em 100 µl de NaPBS 0,1 M (pH 7,0). Um volume de 10 µl desta solução foi então misturado com 5 µl de GA (2,5%) e 7 µl desta mistura foi espalhada sobre a superfície do eléctrodo (previamente modificado com CoHCF ou CuHCF). Para efeitos de comparação, um eléctrodo sem mediador também foi modificado com enzima. Quando não estavam a ser utilizados, os eléctrodos com enzima foram mantidos a 4 º C em tampão fosfato, pH 7,0.

6.3. Deposição e caracterização de eléctrodos modificados com hexacianoferrato

6.3.1. Voltametria cíclica

Como foi mencionado anteriormente, a modificação dos eléctrodos de filme de carbono por deposição electroquímica de hexacianoferrato de cobalto, foi realizada por varrimento de potencial entre -0,2 V e +0,9 V *vs* SCE a 50 mV s^{-1} durante 25 ciclos [167]. Sucessivos voltamogramas cíclicos são mostrados na Fig. 6.2A e o crescimento do filme é demonstrado pelo aumento da densidade de corrente em cada um dos ciclos. Os filmes de

CuHCF, foram depositados quimicamente usando o procedimento optimizado por Pauliukaite [163], e descrito na secção 6.2.3.

Ambos os filmes hexacianoferrato foram caracterizados em tampão fosfato, pH 7,0 antes da sua utilização e os respectivos voltamogramas obtidos são apresentados na Fig. 6.2B. Os picos de corrente são mais elevadas para o filme CuHCF e a carga acumulada obtida foi de 137 µC cm^{-2} para CoHCF e 250 µC cm^{-2} para CuHCF.

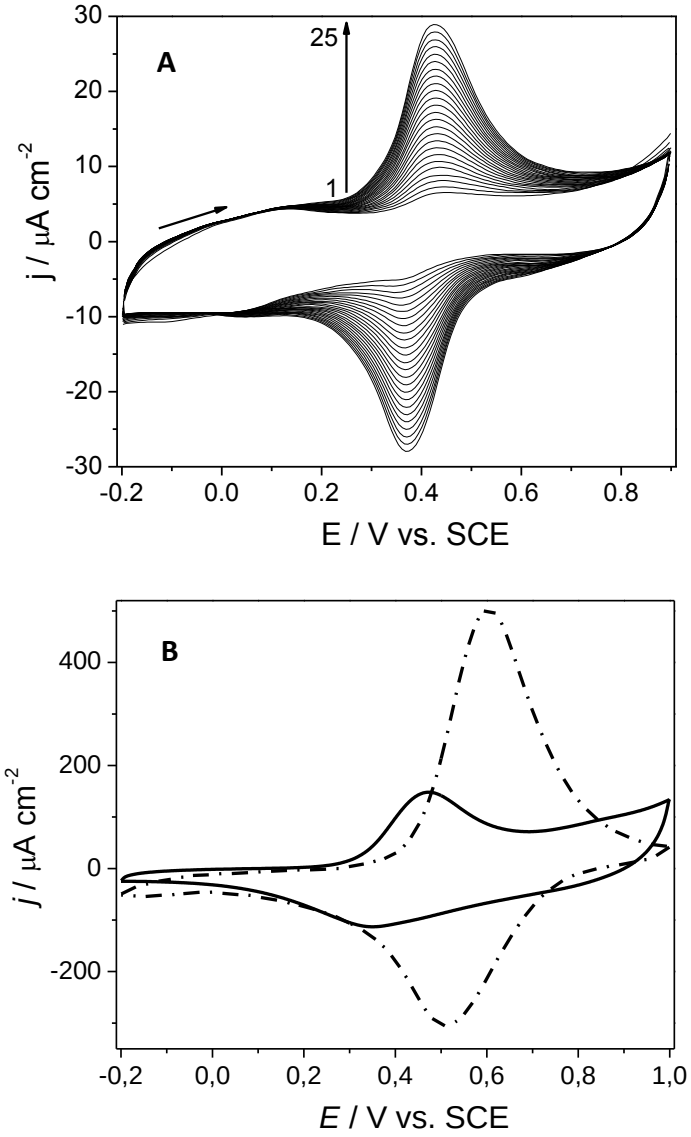


Figura 6.2 - Voltametria cíclica de: (A) deposição de CoHCF (secção 6.2.2) e (B) eléctrodos de CF electrodepositado com CoHCF (–) e com CuHCF depositado quimicamente (–.–) em NaPBS 0,1 M, pH 7,0.

A diferença observada nos voltamogramas e a maior espessura de filme obtida para a deposição de CuHCF, poderá ser devido ao facto de se ter usado concentrações mais elevadas na deposição química do que na deposição electroquímica de CoHCF. Porém, deve-se salientar que trabalhos anteriores [333] em que usaram concentrações iguais, se verificou que a deposição química continuou a dar melhores resultados que o método electroquímico.

6.3.2. Impedância electroquímica

Os eléctrodos não modificados e modificados com hexacianoferrato de cobre ou cobalto foram caracterizados por EIS. As medidas foram realizadas em tampão NaPBS 0,1 M 7,0 pH a -0,35 V e -0,45 V *vs* SCE, os mesmos potenciais utilizados na amperometria a potencial fixo, a ser descrito abaixo.

Todos os espectros foram ajustados ao circuito eléctrico equivalente constituído pela resistência da célula, R_{Ω}, em série com uma combinação em paralelo de um elemento de fase constante, CPE, e uma resistência de transferência de carga, R_{ct}, Fig. 5.5. O CPE é modelado como um condensador não ideal de acordo com a relação CPE = $-1/(Ci\omega)$ α, onde C é a capacitância (descrevendo a separação de carga na interface camada dupla), ω é a frequência angular e α é o factor de rugosidade (devido à heterogeneidade da superfície), secção 1.8.2.4. Os espectros são mostrados na Fig. 6.3 e os resultados dos respectivos ajustes teóricos apresentados na Tabela 6.1.

Os valores de α obtidos foram 0,82 para os eléctrodos sem modificação e 0,85 para as duas moficações de eléctrodo; o pequeno aumento do expoente α sugere que os eléctrodos modificados possam apresentar uma superfície ligeiramente mais lisa e uniforme. Para ambos os potenciais, -0,35 V e -0,45 V *vs* SCE, os valores de capacitância aumentam para os eléctrodos modificados devido a um aumento de acumulação de carga na dupla camada; por outro lado, a resistência à transferência de carga diminui com a modificação, o que indica que a transferência de electrões é facilitada.

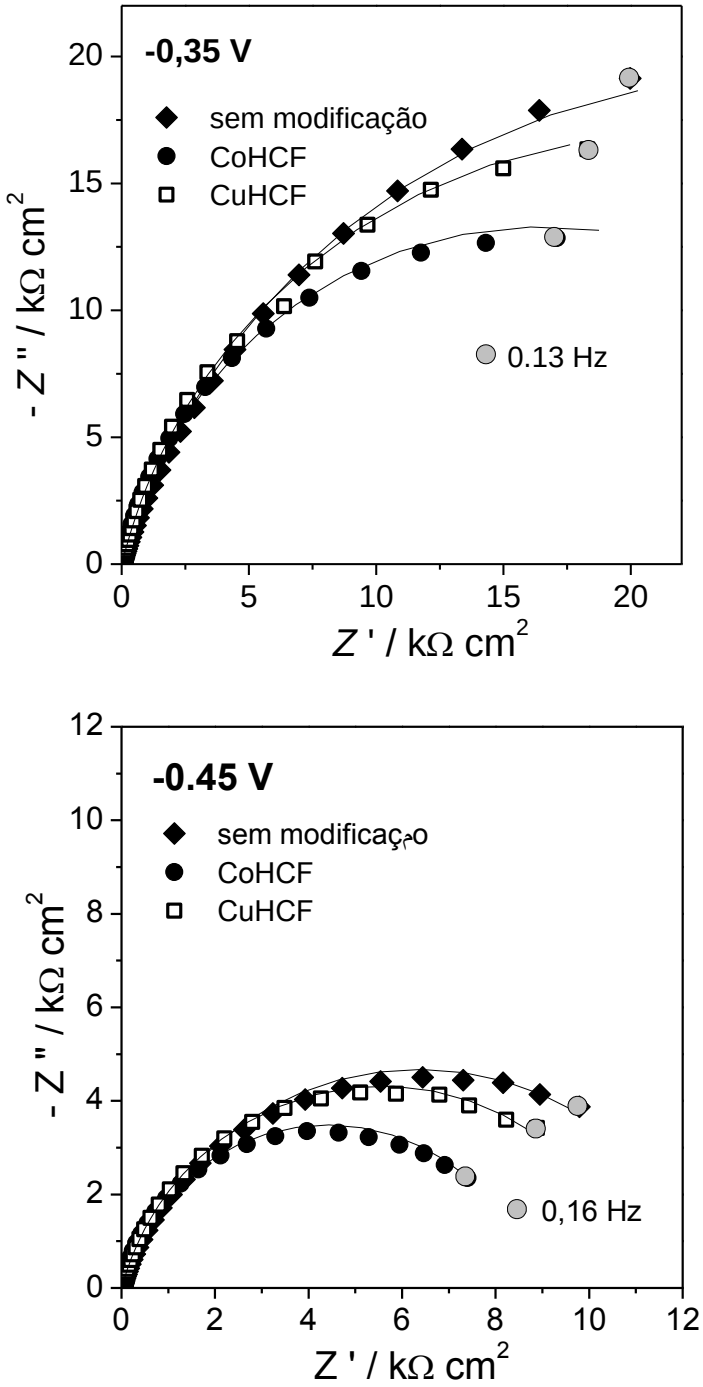


Figura 6.3 - Espectros de impedância no plano complexo para os eléctrodos (◆) sem modificação; (□) CoHCF e (●) CuHCF em 0,1 M NaPBS no (A) -0,35 e (B) -0,45. As linhas representam o ajuste pelo circuito equivalente.

Tabela 6.1 - Parâmetros obtidos através do ajuste do circuito eléctrico equivalente, para eléctrodos de CF e CF modificados com CoHCF e CuHCF, para -0,35 e -0,45 V em NaPBS 0,1 M, pH 7,0.

Eléctrodo	R_{ct} / kΩ cm^2		C / µF cm^{-2} s$^{\alpha-1}$	
	-0,35 V	-0,45 V	-0,35 V	-0,45 V
sem modificação	51,5	12,7	30,1	36,0
CoHCF	33,2	8,8	37,1	41,0
CuHCF	42,9	11,1	34,5	38,1

6.4 Biossensores de inibição - Optimização

A arquitectura dos eléctrodos de CF modificados com hexacianoferratos, sofreu uma nova alteração através de mais uma modificação, desta feita por imobilização de glucose oxidase (GOx) com glutaraldeído (GA) e albumina de soro bovino (BSA), como é descrito na secção 6.2.4. Os biossensores obtidos foram então aplicados na determinação de glucose por amperometria a potencial fixo com e sem inibição.

6.4.1. Influência do potencial aplicado

Normalmente, biossensores à base de hexacianoferratos metálicos são utilizados em potenciais baixos, perto de 0,0 V, através da monotorização da redução do peróxido de hidrogénio resultante da reacção que é catalisada pela GOx. Para observar uma resposta inibidora, é necessário que, aquando da injecção do catião metálico a mudança do valor da corrente resultante da presença deste ião seja na direcção oposta à do substrato da enzima, como foi observado em estudos anteriores, utilizando inibição enzimática [329, 332]. Uma vez que neste trabalho a resposta à presença dos catiões metálicos ocorre na direcção catódica, foi necessário escolher um potencial onde a resposta à glucose ocorra na direcção anódica. Isso acontece em -0,35 V para o CF modificado com CoHCF e em -0,45 V para o

CF modificado com CuHCF, ou a potenciais mais negativos – a potenciais mais perto de 0,0 V a resposta para a glucose ocorre na direcção catódica.

A razão disto acontecer pode ser explicada da seguinte forma. Em potenciais menos negativos, a redução de peróxido de hidrogénio ocorre e em potenciais mais negativo a regeneração do FAD (reacção de oxidação) tem lugar em conjunto com a redução de peróxido, tal como vem mencionado em [209]. Por conseguinte, a potenciais menos negativos onde a regeneração do FAD não pode ocorrer, após a adição de glucose observa-se uma mudança na corrente catódica, devido à redução do peróxido de hidrogénio, e com a adição de iões metálicos a mudança na corrente também é catódica. Em potenciais mais negativos, a regeneração FAD predomina sobre a redução de peróxido, de modo que a injecção de glucose conduz a um aumento da corrente anódica e a posterior injecção de iões metálicos provoca a inibição da actividade da enzima e a consequente mudança no sentido catódico. O potencial menos negativo para que isso aconteça é -0,35 V para CoHCF e para -0,45 V para CuHCF. A menos que especificado de outra forma, as experiências foram realizadas nesses potenciais para os dois tipos de biossensor.

De salientar que apesar das medições directas destes metais pesados nos eléctrodos de filme de carbono modificados com mediadores redox apresentarem resposta para estes potenciais, esta é relativamente pequena e maioritariamente no caso dos iões cobre. Quando há inibição (inibição da regeneração do FAD) isto ocorre principalmente perto da interface enzima / electrólito, o substrato (glucose) ou inibidor (iões metálicos) vai se ligar aos sítios activos da enzima. Assim, apenas os produtos da reacção enzimática irão passar através da camada enzimáica para a camada de mediador. Os resultados experimentais obtidos estão de acordo com essa observação.

6.4.2. Influência do pH da solução tampão

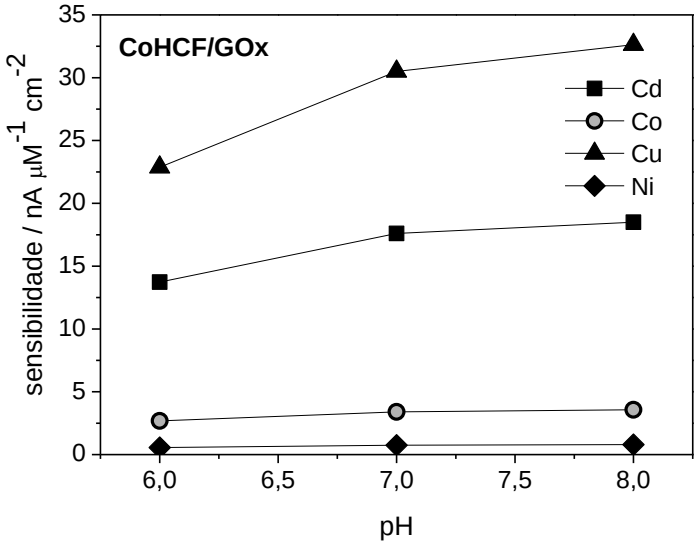
O pH da solução pode influenciar a actividade global da enzima uma vez que as enzimas têm uma estrutura nativa terciária que é sensível ao pH (tal como as proteínas naturais), que faz com que seja possível que ocorra a desnaturação das mesmas a pH extremos. Também a actividade enzimática é altamente dependente dos valores de pH e

desta forma o valor do pH óptimo para um ensaio enzimático deve ser determinado empiricamente. Assim sendo a melhor opção é escolher uma janela de valores de modo que o pH não exerça qualquer efeito sobre a actividade enzimática, não interferindo com os resultados obtidos. Para a GOx obtida a partir de *Aspergillus niger*, a enzima utilizada neste trabalho, a maior actividade é observada na gama de pH 5,5-9,0, com a actividade óptima para pH 6,5 [334]. Por esta razão, a influência do pH sobre a resposta da inibição enzimática em tampão fosfato 0,1 M no intervalo de pH 6,0-8,0 foi estudada; de salientar que o tampão fosfato foi escolhido por conveniência prática, uma vez que é o electrólito normalmente utilizado para estudos com biossensores de glucose e cobre a gama de pH óptimo para o funcionamento desta enzima.

A determinação de metais na presença de concentrações fixas de glucose (diferentes para cada metal a fim de garantir uma boa resposta de inibição) foi realizada a pH 6,0, 7,0 e 8,0 e os resultados foram comparados. A Fig 6.4 mostra a resposta para iões metálicos diferentes para os biossensores GOx/CoHCF (-0,35 V) e GOx/CuHCF (-0,45 V) como função do pH.

Para todos os metais, o comportamento foi semelhante, verificando-se um aumento da resposta com o aumento no valor do pH. Um aumento significativo da resposta para cada um dos catiões ocorre a partir de pH 6,0 a pH 7,0 e um aumento muito menor para os valores de pH 7,0 a 8,0. Com base nestes resultados e tendo em conta o valor para a actividade enzimática óptima desta enzima, decidiu-se realizar todas as experiências adicionais em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,0. Outros tipos de biossensores para a determinação de metais pesados por inibição enzimática usam também tampão fosfato a pH 7,0 [321, 332, 335] ou citrato-fosfato nesse mesmo pH [336]. O tampão acetato também foi utilizado previamente [337, 338], mas este pode formar complexos com os metais pesados, como foi observado em [338] para o caso do chumbo, o que não permite a utilização deste tampão para determinações de analito a níveis residuais.

A



B

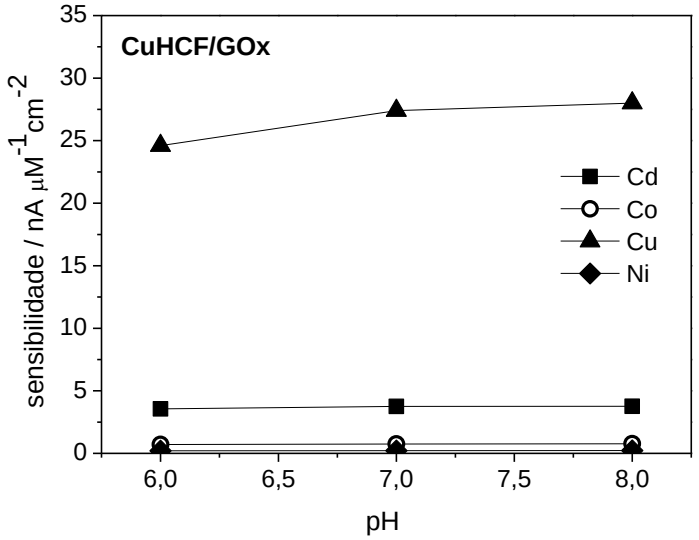


Figura 6.4 - Influência do pH de 0,1 M tampão de NaPBS na determinação de catiões metálicos na presença de glucose em (A) CoHCF/GOx para -0,35 V na presença de 50 µM de glucose para Cd^{2+} e Co^{2+} e de 150 µM de glucose para Cu^{2+} e Ni^{2+} (B) CuHCF/GOx para -0,45 V na presença de 300 µM de glucose para Cd^{2+} e Co^{2+} e de 100 µM de glucose para Cu^{2+} e Ni^{2+}. A sensibilidade provém da curva de calibração para cada um dos metais a diferentes valores de pH.

6.4.3. Influência do mediador redox

Mediadores redox são normalmente utilizados para poder diminuir o potencial aplicado necessário para a transdução do sinal e, consequentemente, reduzir interferências (secção 1.5). O potencial aplicado ideal está dependente do substrato enzimático a ser detectado e normalmente para a determinação de glucose um potencial mais próximo de 0,0 V seria o ideal (para reduzir interferências), mas no presente trabalho o objectivo centrava-se na determinação de metais pesados por inibição.

Com o objectivo de comparar a resposta para a glucose e especialmente a alteração ao adicionar os catiões metálicos, foi necessário utilizar um biossensor de controlo, ou seja, sem a presença de inibidor. A resposta amperométrica para os iões cobalto e cobre a -0,45 V para os três biossensores: sem-mediador, mediadores GOx/CoHCF e GOx/CuHCF foram comparados. Para a determinação de cobalto, foi observado um aumento na resposta por um factor de 17 usando o mediador CuHCF em relação ao biossensor sem mediador, e por um factor de 7 quando se utiliza CoHCF. Para o cobre, o aumento de resposta foi de 5 (para CoHCF) e 6 (para CuHCF) vezes superiores, respectivamente. Ao mesmo tempo, a resposta à glucose é de cerca de duas vezes maior quando se utiliza esses mediadores redox. Estes resultados levaram à conclusão de que mediadores redox de hexacianoferratos, melhoraram a sensibilidade para a determinação de catiões metálicos por inibição enzimática. Determinações de catiões metálicos foram também realizadas em eléctrodos de carbono modificados apenas com o mediador redox e obteve-se uma resposta muito pequena. No entanto, esta não vai influenciar a determinação dos iões metálicos através de inibição enzimática, uma vez que esta, é alcançada através da medição da diminuição da resposta da glucose, aquando da adição do catião metálico.

6.5. Determinação da inibição enzimática por amperometria a potencial fixo

Em geral, os estudos de inibição podem ser realizados com ou sem incubação das espécies tóxicas. Neste trabalho a influência da incubação foi investigada, mas não se observou diferenças nas respostas obtidas após diferentes tempos de incubação de 5, 15, 30

min. Estes resultados estão de acordo com um mecanismo de inibição competitiva, para o qual não é necessária a incubação. Desta forma, todas as experiências foram efectuadas sem tempos de incubação

Para a determinação amperométrica destes iões metálicos foram avaliadas duas estratégias distintas. A razão para se usar estas duas estratégias foi para se poder determinar se ocorre ou não inibição competitiva – uma vez que nesta situação, a ordem em que o inibidor ou a glucose é injectada irá influenciar o grau de inibição.

Em ambos os casos, a inibição da actividade da enzima foi avaliado pela fórmula (6.1).

$$I(\%) = 100\ (I_1 - I_2)\ /\ I_1 \qquad (6.1)$$

- I_1, resposta na ausência de inibidor
- I_2, resposta na presença de inibidor

Na primeira estratégia, após estabilização de linha de base, uma quantidade conhecida de solução de glucose foi adicionada à solução tampão, e a resposta foi registada (I_1). Posteriormente adicionou-se o inibidor e a resposta (I_2) é medida. Vem que $I_1 > I_2$, uma vez que na presença de inibidor diminui a actividade da enzima.

Na segunda estratégia, em primeiro lugar,é registada a resposta do biossensor à presença de glucose na ausência de qualquer inibidor (I_1). O biossensor foi então transferido para uma solução tampão nova, sem glucose, e uma quantidade conhecida de inibidor foi adicionada, seguida de injecção da mesma quantidade de glucose usada anteriormente, obtendo-se assim a resposta (I_2). O grau de inibição foi calculado recorrendo à mesma fórmula (eq. 6.1).

A Fig. 6.5 ilustra os resultados de ambos os tipos de experiências para os dois biossensores no potencial -0,45 V: para o biossensor CuHCF/GOx vem a resposta para diferentes concentrações de Cd^{2+} na presença de 300 µM de glucose (estratégia 1 - (Fig. 6.5A); e para o biossensor CoHCF/GOx, as respostas típicas para glucose na ausência e na presença de 60 µM Cd^{2+} (estratégia 2 - Fig. 6.5B).

Com este tipo de experiência, a gama linear para a determinação de cádmio com ambos os biossensores foi de 1,5-6,0 µM na presença de 300 µM de glucose com

CuHCF/GOx e 50 μM de glucose com o biossensor CoHCF/GOx. A sensibilidade foi maior no caso do biossensor CuHCF/GOx, principalmente devido ao facto da quantidade de mediador depositada quimicamente ser mais elevada (Fig. 6.2 B), esta situação observou-se para os os quatro iões metálicos investigados. Os parâmetros analíticos estão resumidos na Tabela 6.2, que inclui também uma comparação com outros biossensores baseados em GOx para a detecção de metais pesados por inibição.

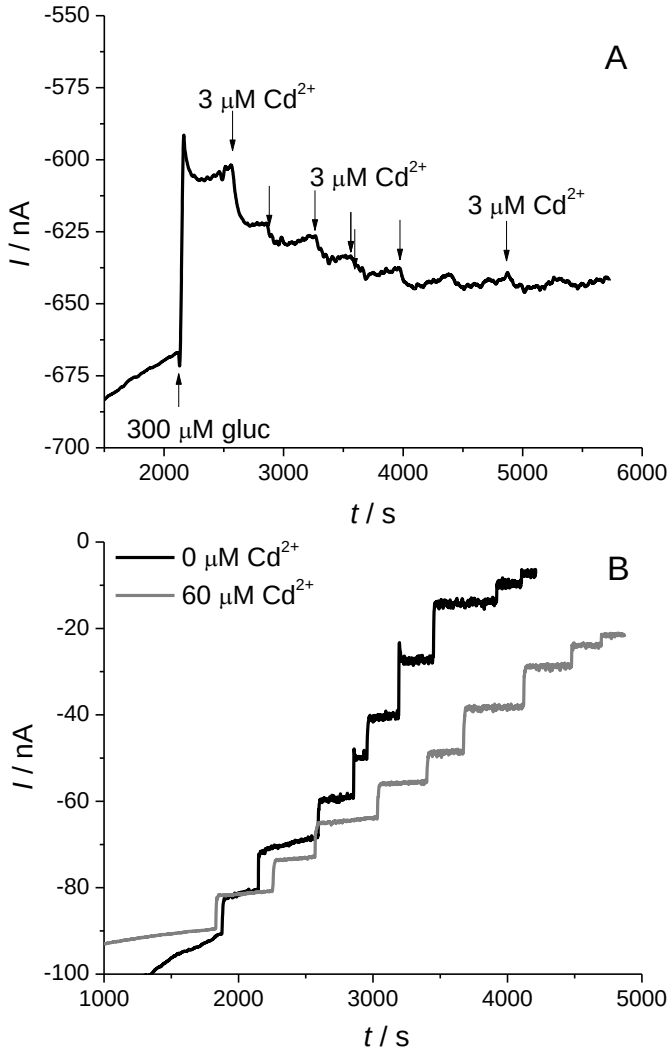


Figura 6.5 – Respostas para os biossensores em NaPBS 0,1 M pH 7,0; potencial aplicado de -0,45 V: (A) resposta para 300 mM de glucose, seguido por injecções de Cd^{2+} 3 mM no biossensor CuHCF/GOx eléctrodo; (B) resposta típica de glucose na ausência (-) e na presença (-) de Cd^{2+} 60 μM no biossensor CoHCF/GOx.

O cádmio foi medido em trabalhos anteriores pela inibição de lactato desidrogenase acoplada com lactato oxidase ligados a um eléctrodo de Clark [339] após 5 min de incubação; a concentração necessária deste metal para se obter 50% de inibição, I_{50}, foi de 10 µM. Neste trabalho, 50% de inibição de glucose-oxidase foi conseguida através da adição de 17 µM de cádmio para o biossensor CoHCF/GOx na presença de 50 µM de glucose, e da adição de 5,8 µM de cádmio para o biossensor CuHCF/GOx na presença de 300 µM de glucose (Tabela 6.2).

Em [332], o cádmio foi medido pela inibição da GOx num eléctrodo de platina modificado com poli (o- fenilenodiamina) (GOx/PDDA/Pt) apresentando uma resposta linear entre 20-150 µM (concentrações maiores do que no presente trabalho), o limite de detecção foi de 5 µM (I_{10} superior ao obtido com ambos os biossensores no presente trabalho) e I_{50} foi de 210 µM. Em [335] o I_{10} para o cádmio também foi maior do que o obtido neste trabalho [320].

A mesma experiência foi repetida para outros metais: cobre, cobalto e níquel e os resultados (faixa linear, sensibilidade e limite de detecção) vêm também apresentados na Tabela 6.2. O cobalto foi medido na presença de 300 µM de glucose com os dois biossensores e uma resposta linear foi obtida entre 5,0-35 µM com CoHCF/GOx e entre 2,0-40 µM com CuHCF/GOx. O I_{50} para o cobalto foi de 19 µM para o biossensor CuHCF/GOx na presença de 150 µM de glucose, e 13,5 µM para o biossensor CoHCF/GOx na presença de 50 µM de glucose. Guascito [331] determinou cobalto no intervalo linear 35-440 µM (concentrações mais elevadas do que no presente trabalho) e obteve um I_{50} de 380 µM. Cobalto também inibiu a glucose oxidase num eléctrodo de ouro modificado com poli(N-noradrenalina), GOx/PNA/Au com uma gama linear situada entre 30-340 µM e um limite de detecção relativamente alto de 30 µM [321].

Tabela 6.2 – Parâmetros analíticos para a determinação de catiões metálicos nos biossensores CoHCF e CuHCF e comparação com outros biossensores baseados na inibição da glucose-oxidase. Ver o texto para detalhes das condições experimentais e abreviações.

Biossensor	Ião metálico	Gama linear / µM	Sensibilidade / nA cm^{-2} μM^{-1}	LOD (I_{10}) / µM	I_{50} / µM	K_i / µM	Ref.
GOx/PNA/Au	Co^{2+}	30-340 340-2500	**	30	1700	*	321
	Cu^{2+}	20-90 90-300		20	100		
GOx/PPDA/Pt	Cd^{2+}	20-150	2,29	5	210	*	332
	Co^{2+}	55-400	41,8	8	380		
	Cu^{2+}	10-100 100-250	3566 1242	5	70		
	Ni^{2+}	35-440	50,9	4,8	349		
GOx/PNR/CFE	Cd^{2+}	0,035-0,142	3,95	10,6	--	1,5	335
	Cu^{2+}	0,51-9.1	9,57	4,7		34,6	
GOx/MnO_2/CPE	Cd^{2+}		*		< 4 % (3,9 mM)	*	336
	Cu^{2+}				< 4 % (2,2 mM)		
GOx/PANI/Fc/Pt	Cd^{2+}		*		1,56 % (7,9 µM)	*	21
	Cu^{2+}				6,17 % (4,4 µM)		
GOx/CoHCF/CFE	Cd^{2+}	1,5-6,0	3,75	2,4	17	11	Este trab. [320].
	Co^{2+}	5,0-35	0,75	2,1	13,5	5.7	
	Cu^{2+}	0,2-3,0	27,4	0,2	1,4	0,032	
	Ni^{2+}	20-120	0,22	3,3	21,8	22,7	
GOx/CuHCF/CFE	Cd^{2+}	1,5-6,0	17,6	1,2	5,8	2,0	Este trab. [320]
	Co^{2+}	2,0-40	3,4	0,9	19	1,9	
	Cu^{2+}	0,2-3.0	30,5	0,5	2,2	0,039	
	Ni^{2+}	20-120	0,75	4,8	50,1	39,8	

* - não é especificado
**- os valores indicados não podem ser usados para comparação

O cobre foi detectado entre 0,2-3,0 µM com ambos os tipos de biossensor na presença de 300 µM de glucose para CuHCF/GOx e 500 µM de glucose para CoHCF/GOx. Uma inibição de 50% foi obtida por 2,2 µM de cobre para o biossensor CuHCF na presença de 100 µM de glucose, e I_{50} para 1,4 µM de cobre para o biossensor CoHCF na presença de 150 µM de glucose. Em [332] o cobre foi detectado em duas faixas lineares diferentes, 10-100 e 100-250 µM (ambas as faixas são superiores às obtidas no presente trabalho) o limite de detecção foi superior ao nosso por 5 µM e a I_{50} foi de 70 µM.

Relativamente à determinação de níquel, esta foi realizada a partir de 20 µM até 120 µM na presença de 300 µM de glucose no eléctrodo CoHCF/GOx e 200 µM de glucose para o eléctrodo CuHCF/GOx. O valor de I_{50} correspondia a 50,1 µM de níquel para o biossensor CuHCF/GOx (na presença de 50 µM de glucose) e de 21,8 µM para o biossensor CoHCF/GOx (na presença de 150 µM de glucose). Para Guascito e colaboradores o intervalo linear para a determinação de níquel foi mais amplo, 35-440 µM mas o valor para se obter I_{50} superior 349 µM [332]. De salientar que o níquel também foi medido com sarcosina oxidase imobilizada sobre um eléctrodo de platina [327] na gama linear compreendida entre 8,5-85 µM, o limite de detecção foi de 8,5 uM (maior que I_{10} obtida para os nosso dois biossensores) e I_{50} foi 64,7 µM.

Uma representação da resposta para a inibição obtida para os quatro catiões em ambos os biossensores é ilustrada na Fig. 6.6. Observa-se que a resposta de inibição é semelhante em ambos os eléctrodos modificados, excepto o valor para a inibição máxima atingida, que mostra ser mais elevada para o biossensor CuHCF/GOx, por razões que não são totalmente claras. Verificou-se também, que para todos os quatro catiões metálicos, aquando a redução da concentração de glucose a percentagem de inibição máxima aumentou, indicando que a inibição da enzima glucose oxidase ocorre de forma competitiva.

Um limite de detecção prático que foi adoptado neste trabalho é o I_{10}, que é definido como a concentração de metal relativa a 10% de inibição, I_{10}. Os valores de I_{10} estão na gama micromolar e vêm apresentados na Tabela 6.2. Em [332], o cádmio, cobre, cobalto e níquel foram medidos por inibição de glucose oxidase num biossensor desenvolvido sobre um eléctrodo de disco de platina com polifenilenodiamina.

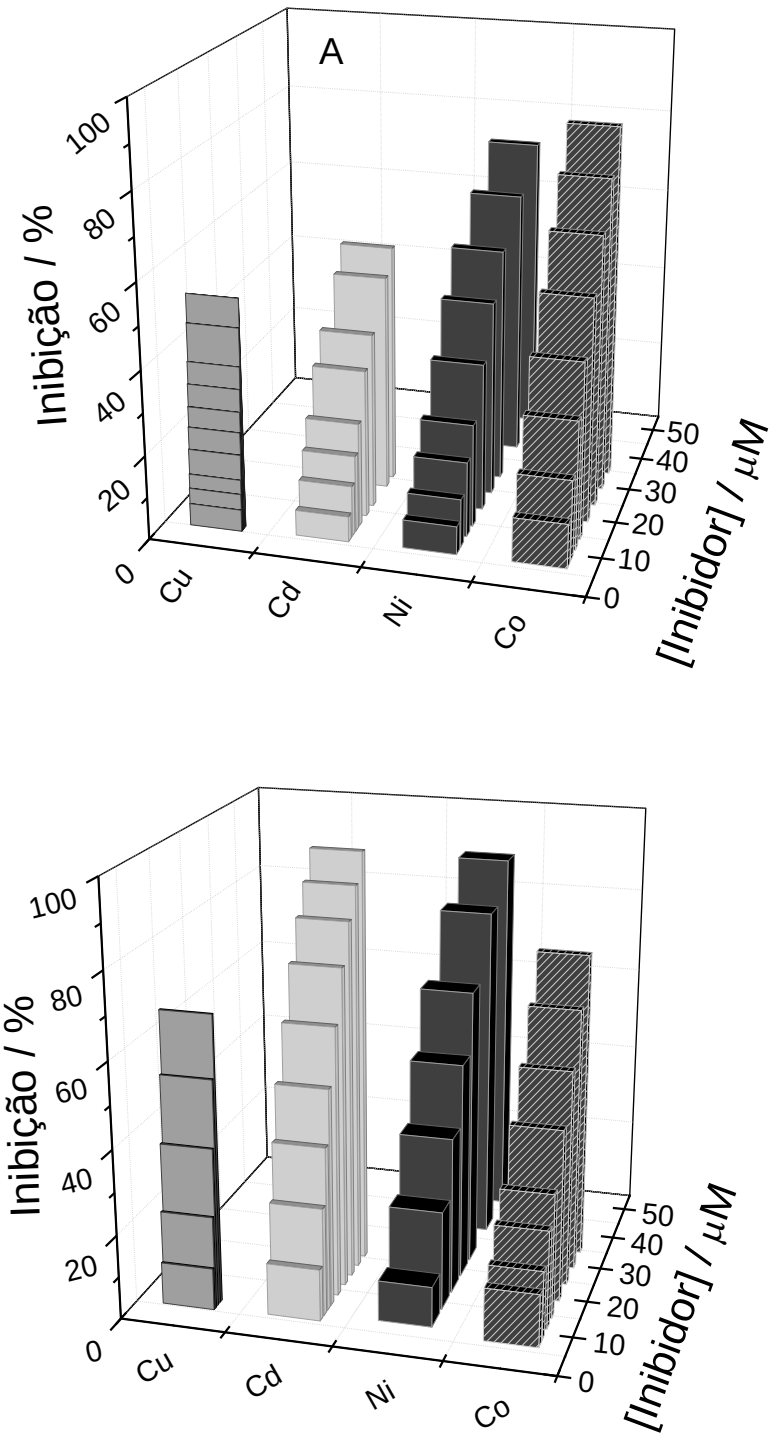


Figura 6.6. Gráfico 3D da inibição em NaPBS 0,1 M, pH 7,0 causada pelos catiões metálicos no biossensor: (A) CoHCF/GOx em -0,35 V e (B) CuHCF/GOx em -0,45 V.

Os limites de detecção obtidos em [332]: 5 µM (Cd^{2+}), 8 µM (Co^{2+}), 5 µM (Cu^{2+}) e 4,8 µM (Ni^{2+}) foram mais altos que os valores para I_{10} obtidos com os biossensores propostos com os mediadores de hexacianoferratos, excepto para Ni^{2+} com o eléctrodo CuHCF/GOx, cujo resultado é igual.

A discrepância entre os relatos na literatura em relação à concentração de ião metálico necessário para produzir 50% de inibição da enzima pode ser devido às diferentes quantidades de enzima utilizadas em cada caso, uma vez que quanto maior actividade da enzima observada no ensaio experimental, menor a inibição para a mesma concentração do ião metálico. A utilização de tampão fosfato por alguns autores poderá também estar relacionado com os valores de I_{50} mais elevados, uma vez que a presença de fosfato poderia ligar os metais ou inactivar a enzima [340].

Na sequência da segunda estratégia mencionada anteriormente, é possível observar a diminuição da resposta de glucose na presença de iões metálicos na solução tampão. Na ausência e na presença de iões metálicos, o biossensor de glucose exibiu uma resposta linear até 1,3 mM de glucose. A sensibilidade determinada a -0,45 V, tanto para eléctrodos CuHCF/GOx como CoHCF/GOx foi de 1,54 µA cm^{-2} mM^{-1} e 2,34 µA cm^{-2} mM^{-1}, com limites de detecção semelhantes de 33 µM e 35 µM, respectivamente. Na presença de metais pesados no eléctrodo CoHCF/GOx observou-se uma diminuição da sensibilidade e a inibição foi de 17% para 60 µM Cd^{2+}, 11% para 200 µM Ni^{2+}, 12% para 200 µM Co^{2+} e 6,0% para 20 µM Cu^{2+}.

Para a mesma concentração de metais, a inibição foi de 11,8%, 7,2%; 6,5% e 3,2%, no biossensor CuHCF/GOx. É importante salientar que para todas as concentrações, foram obtidas inibições mais pequenas pela segunda estratégia do que pela adição de inibidor à solução que continha glucose. Cádmio foi o metalião que mais inibiu a glucose oxidase, seguido por níquel, cobalto e, finalmente, o cobre.

O chumbo e zinco foram também testados como posiveis inibidores, mas nenhuma resposta foi obtida com os biossensores CoHCF/GOx e CuHCF/GOx. A ausência de inibição por parte dos metaliões Pb_2^+ e Zn_2^+ foi também observado em [332], onde utilizaram um biossensor amperométrico de glucose com polifenildiamina no potencial de +0,7 V *vs* SCE.

6.6. Determinação do tipo de inibição enzimática

Para se determinar o tipo de inibição enzimática, recorreu-se às representações gráficas de Dixon [341] e Cornish-Bowden [342]. É necessário utilizar uma combinação das duas representações, uma vez que o gráfico de Dixon (representação da inversa da actividade da enzima versus concentração de inibidor), por si só não é suficiente para se poder efectuar uma distinção clara entre a inibição competitiva e a mista. Em relação ao gráfico complementar, Cornish-Bowden, o rácio da concentração de substrato e a actividade da enzima vem em função da concentração do inibidor. Este gráfico por si só também não é suficiente para determinar o tipo de inibição, uma vez que tem a desvantagem de não permitir a distinção em todas as situações entre a inibição mista e a inibição não-competitiva. No entanto, a análise de ambos em simultâneo, permite caracterizar todos os tipos de inibição.

Os gráficos Dixon e Cornish-Bowden (ver Figura 6.7 para o cobalto) foram representados para duas concentrações diferentes de glucose, 200 e 300 µM, e a partir do gráfico de Dixon pode-se deduzir que a inibição pode ser competitiva ou mista, uma vez que existe uma intercepção de duas linhas na parte esquerda do eixo das ordenadas. No entanto, o gráfico Cornish-Bowden mostra claramente que a inibição é competitiva, uma vez que as linhas rectas traçadas através dos pontos experimentais são paralelos. A partir do gráfico de Dixon a constante de inibição, K_i, é determinada desenhando uma linha paralela ao eixo das ordenadas a partir do ponto em que as linhas rectas atravessam o eixo das abscissas.

Para o cobalto, os valores obtidos foram de 1,9 µM para o biossensor CuHCF/GOx e 5,7 µM para o biossensor CoHCF/GOx. Os valores de K_i para todos os metais são dados na Tabela 6.2.

Relativamente aos outros metais analisados, os gráficos obtidos apresentaram um comportamento semelhante, de modo que se pode concluir que o cádmio, o cobre, cobalto e o níquel inibem a actividade de glucose-oxidase de forma reversível e competitiva. Esta afirmação foi confirmada pelo facto de que quando se aumenta a concentração de substrato (glucose) se verifica uma diminuição da inibição para todos os metais testados, uma vez que o substrato vai competir com o inibidor. Para Guascito e colaboradores [332], a

inibição competitiva de glucose oxidase por parte dos iões de cobre também foi observada. Por outro lado, Shaolin [343] afirmou que o Cu^{2+} inibe a GOx de uma forma não-competitiva, enquanto em [344] a inibição de GOx por cobre era reversível e mista. No que diz respeito ao cádmio, os resultados estão de acordo com aqueles observados por Ghica, i.e. inibição reversível e competitiva [335].

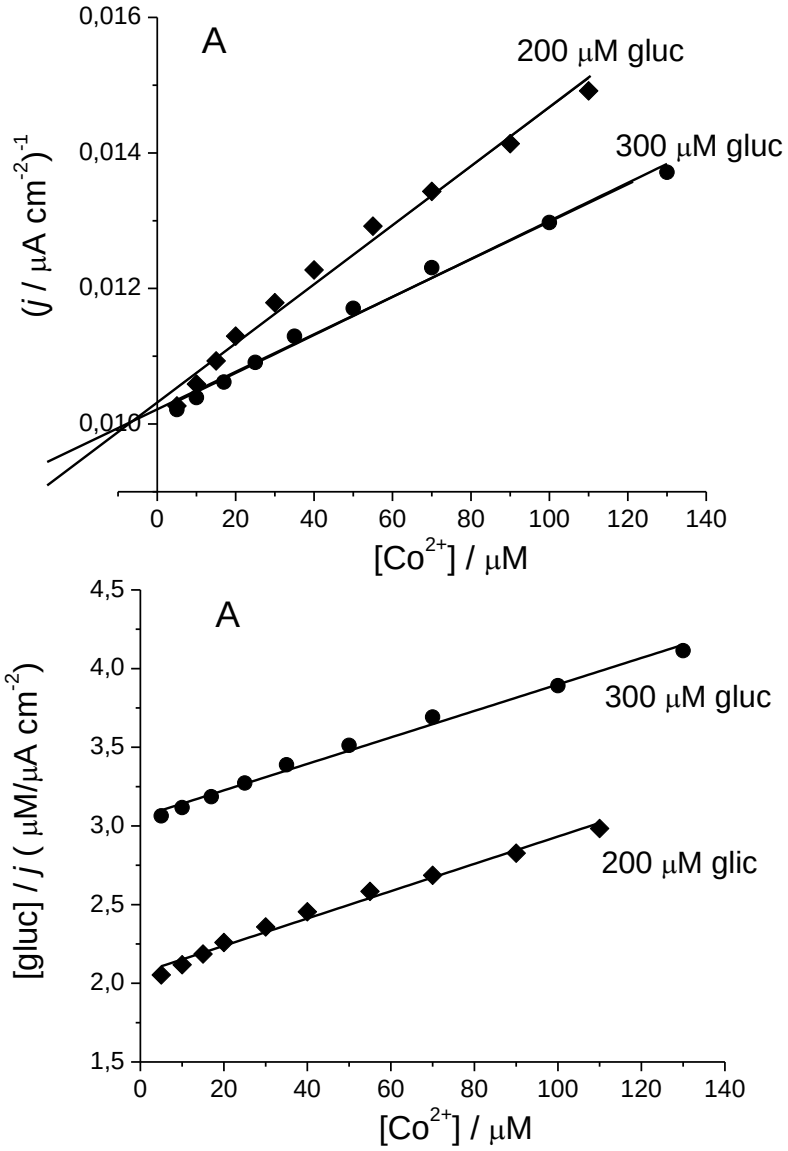


Figura 6.7 – Gráfico (A) Dixon e (B) Cornish-Bowden para Co^{2+} obtido para duas concentrações de glucose diferentes: 200 e 300 μM.

Para cobalto e níquel, Guascito [332] mencionou a ocorrência de inibição competitiva para GOx e não foram encontrados outros estudos para uma comparação mais

exaustiva. Quando se utiliza outras enzimas, tais como acetilcolinesterase [340] e detecção amperométrica, foi determinada a ocorrência de inibição reversível e não-competitiva para o cádmio e o cobre e, quando se utiliza L-lactato desidrogenase [340] observou-se para o cobre a existência de inibição competitiva.

Estas observações podem ser racionalizadas da seguinte forma. Para biossensores baseados na inibição reversível, um parâmetro que deve ser cuidadosamente considerado é o tipo de imobilização que foi efectuado. O efeito da técnica de imobilização de enzimas sobre a inibição pode influenciar a resposta do biossensor de diferentes maneiras: através da diminuição da sensibilidade do biossensor de inibição e/ou alterando o tipo de inibição [345]. Uma alteração no tipo de inibição foi relatado e investigado por Stoytcheva para a inibição da acetilcolinesterase por metais pesados [340]. Do mesmo modo, Narli [346] demonstrou para a inibição da polifenol-oxidase que a imobilização da enzima em diferentes filmes poliméricos altera o tipo de inibição e a constante de inibição (afinidade do inibidor para a enzima) como uma função das características das películas de polímero. Assim sendo, o procedimento de imobilização pode ser uma explicação para a obtenção de diferentes tipos de inibição para o mesmo metal, mesmo quando se utiliza a mesma enzima.

6.7. Espectroscopia de impedância electroquímica dos biossensores

Biossensores condutométricos para determinação de metais pesados já foram anteriormente utilizados [347], no entanto, para o nosso conhecimento a espectroscopia de impedância electroquímica nunca foi anteriormente empregue na determinação de metais pesados por inibição enzimática. Usando a técnica de EIS, monitorou-se a alteração nos valores de resistência de transferência de carga como forma de diagnóstico da inibição enzimática devido à presença dos metais pesados. Embora esta técnica ainda não possa ser usada para calcular quantitativamente o grau de inibição, mostra ter importância num cariz mais qualitativo.

Os biossensores CoHCF/GOx e CuHCF/GOx foram caracterizados por espectroscopia de impedância electroquímica em 0,1 M a pH 7,0 NaPBS nos potenciais

aplicados para detecção amperométrica: -0,35 V para CoHCF -0,45 V e para CuHCF. Dois conjuntos diferentes de espectros foram registados, que são correspondentes às condições utilizadas nas experiências amperométricas:

1º: espectros foram registados em tampão, em seguida com a adição de glucose e, finalmente uma concentração conhecida de iões metálicos foi adicionado.

2º: espectros foram registados em tampão, posteriormente os iões metálicos foram adicionados seguidos de glucose.

Todos os espectros foram ajustados com o circuito equivalente utilizado para a caracterização de eléctrodos de carbono modificados e não-modificados (secção 6.3.2.). Os valores obtidos através do ajuste teórico são apresentados na Tabela 6.3. Para os dois biossensores os valores R_{Ω} eram cerca de 9 Ω cm^2 e os valores de α foram 0,87 para CoHCF/GOx e 0,85 para CuHCF/GOx.

Tabela 6.3 - Parâmetros obtidos através do ajuste do circuito eléctrico equivalente, para eléctrodos CoHCF/GOx (-0,35 V) e CuHCF/GOx(-0,45 V) em 0,1 M NaPBS, pH 7,0; introduzindo catião metálico depois de glucose e adicionando glucose depois do catião metálico

	R_{ct} / kΩ cm^2		C / μF cm^{-2} s$^{\alpha-1}$	
Inibidor	CoHCF/GOx	CuHCF/GOx	CoHCF/GOx	CuHCF/GOx
Glu + M^{2+}				
Cd^{2+}	32,4	14,9	33,9	39,0
Co^{2+}	37,0	14,1	27,8	39,3
Cu^{2+}	36,0	15,9	28,1	40,7
Ni^{2+}	40,2	11,4	38,3	30,3
M^{2+} + Glu				
Cd^{2+}	35,6	15,3	31,4	37,1
Co^{2+}	39,1	15,5	26,4	37,3
Cu^{2+}	35,5	13,4	32,6	37,3
Ni^{2+}	34,9	14,3	26,1	37,5

A partir do primeiro conjunto de espectros (Fig. 6.8A), observa-se que a adição de glucose à solução tampão conduz a uma diminuição da resistência de transferência de carga (12,8 a 10,8 kΩ cm^2 no caso de CuHCF/GOx e de 34,4 para 32,0 kΩ cm^2 no caso de CoHCF/GOx), o que significa que a transferência de electrões é facilitada na presença de glucose.

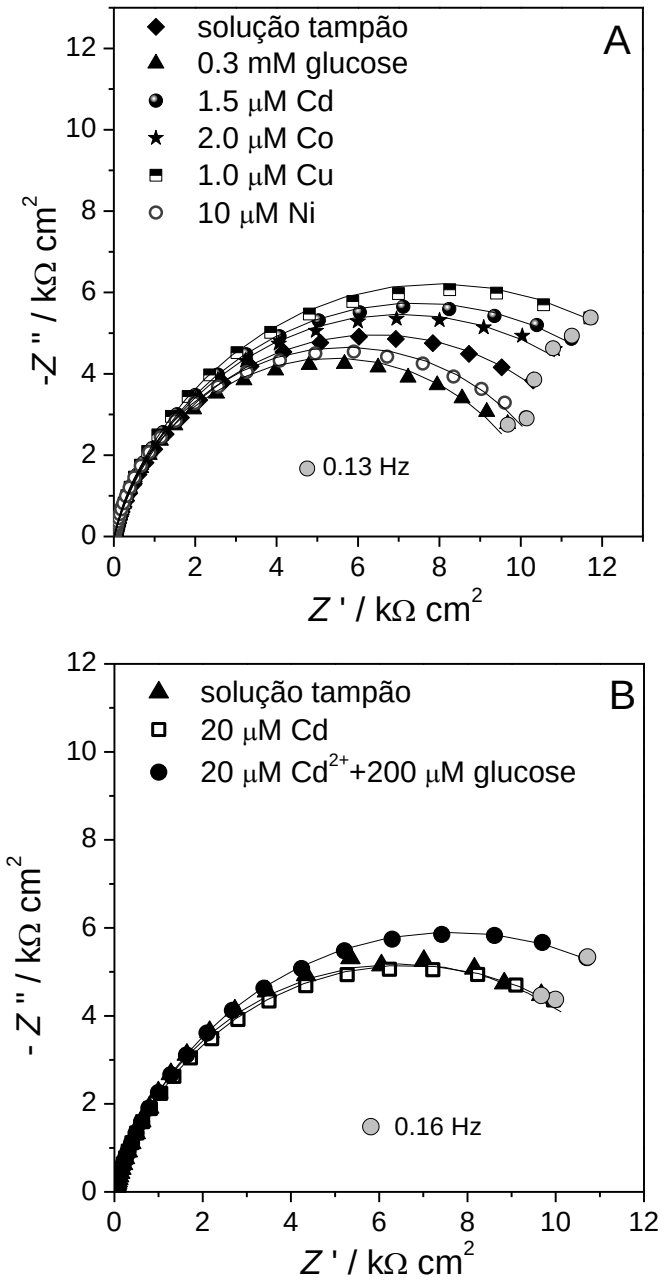


Figura 6.8 - Espectros de impedância no plano complexo para o biossensor CuHCF/GOx em NaPBS 0,1 M pH 7: A) com adição de glucose seguida de adição de iões metálicos; B) adição de 20 μM Cd^{2+}, seguido da adição de 200 μM de glucose. Linhas representam o ajuste do circuito equivalente.

A capacitância do CPE, também diminui a partir de 38,4 a 31 μF cm^{-2} (para CuHCF/GOx) e 27,8 para 24,6 μF cm^{-2} (para CoHCF/GOx). Com a adição de iões metálicos o valor da resistência de transferência de carga aumenta novamente (Tabela 6.3). Esta mudança nos valores da resistência sugere que a presença do ião metálico em solução impede a transferência de electrões. Esta é uma evidência de inibição da actividade da enzima por metais pesados.

O segundo conjunto de espectros (Figura 6.8 B) mostra que com a adição do ião metálico na solução tampão não se verifica quase nenhuma alteração no valor de transferência de carga, verificando-se deste modo que o biossensor por si só, na ausência de substrato de enzima (glucose), não é sensível aos iões metálicos. No entanto, quando a glucose é adicionada, observa-se um aumento da resistência de transferência de carga. Este comportamento electroquímico está em concordância com os dados obtidos pela técnica amperométrica, mostrando novamente que a actividade da enzima é inibida. Além disso, há outra evidência de que ocorre um processo de inibição competitiva, uma vez que o metal que é adicionado primeiro se vai ligar ao centro activo da enzima, obrigando a glucose, que é o substrato natural da enzima a se ligar mais tarde. Tendo em consideração a variação da resistência de transferência de carga, ambos os biossensores demonstraram maior inibição na presença de cádmio, seguido pelo cobalto, níquel e, finalmente cobre. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por amperometria.

6.8. Conclusões

Um novo biossensor electroquímico enzimático baseado em glucose oxidase imobilizada numa película de hexacianoferrato cobre ou cobalto depositada em filmes de carbono foi desenvolvido, caracterizado e avaliado para uso em ensaios de inibição.

A espectroscopia de impedância electroquímica mostrou que a modificação com hexacianoferratos (mediador) facilita o processo de transferência de electrões e os efeitos positivos na inibição foram também observados. A inibição enzimática foi avaliada por amperometria na presença de diferentes concentrações de iões metálicos. Verificou-se que a actividade da enzima foi suprimida duma forma mais evidente na presença de cádmio,

seguido por cobalto, níquel e, finalmente, de cobre para ambos os tipos de eléctrodo modificado. Conclui-se também que a inibição observada era competitiva e reversível e apresentava o mesmo comportamento para todos os metaliões estudados.

Capítulo 7

Conclusões

7. Conclusões

Esta dissertação teve como principal objectivo o estudo de novos substratos e diferentes modificações no desenvolvimento de novas arquitecturas de eléctrodos para a construção de novos sensores e biossensores electroquímicos. Estudou-se diferentes tipos de carbono relativamente à sua aplicabilidade como substrato electroquímico e consequentes modificações, seja através de polimerização de diferentes monómeros, dopagem com azoto ou através de deposição de partículas metálicas.

O comportamento electroquímico de eléctrodos de carbono vítreo revestidos com diferentes concentrações de nanotubos de carbono provenientes de três fontes diferentes foi comparado. Posteriormente o poli(vermelho neutro) foi sintetizado electroquimicamente sobre o carbono vítreo e sobre GC modificado com diferentes marcas de nanotubos, e caracterizados por voltametria cíclica e microscopia electrónica de varrimento. Foram observadas respostas voltamétricas bem definidas, para a oxidação da espécie modelo hexacianoferrato (II), sendo obtidas diferenças para diferentes concentrações e proveniências de MWCNT. Os eléctrodos modificados MWCNT/GC e PNR/MWCNT/GC foram aplicados na determinação do ácido ascórbico, observando-se um comportamento electroquímico que evidencia um comportamento sinergístico por parte dos nanotubos e do PNR, cujo efeito electrocatalítico obtido está intimamente ligado à concentração e marca de nanotubo utilizada. Todas as configurações de eléctrodos modificados com e sem PNR foram empregues com sucesso para a oxidação do ascorbato em 0,05 V *vs* SCE com limites de detecção de 4 μM; boa estabilidade operacional e estabilidade de armazenamento também foram obtidas. Observou-se a influência da presença do carbono amorfo nas propriedades electrocatalíticas imputadas aos nanotubos, através da modificação do eléctrodo de carbono vítreo com pó de grafite e mencionado a influência que as impurezas e os diferentes métodos de produção de nanotubos apresentam na resposta electroquímica dos mesmos.

Estudou-se pela primeira vez como material de eléctrodo, tecido de carbono modificado com MWCNT e MWCNT dopado com azoto (CNx). E conclui-se que os nanotubos de carbono (CNTs) depositados no CCl aumentam substancialmente a

performance de CCl devido à sua razão comprimento/largura e boa condutividade electrónica.

Estes materiais foram caracterizados por voltametria cíclica e impedância electroquímica e a influência da dopagem com azoto foi avaliada. As áreas electroactivas da superfície dos eléctrodos CNT / CNx_CCl foram calculadas e observou-se que as modificações de CNT e CNx no tecido de carbono (CCl) aumentam significativamente a área electroactiva. Além disso, a modificação com CNx, conduz a um maior aumento da área electroactiva, evidenciando vantagens na dopagem dos nanotubos. Posteriormente procedeu-se à polimerização destes tecidos modificados com o monómero EDOT com a finalidade de se diminuir o tamanho do poro deste material e por conseguinte diminuir capilaridade do tecido, de forma a aumentar a robustez e aplicabilidade deste substrato de eléctrodo. A diferença nos valores de carga obtida para eléctrodos modificados com PEDOT é indicativo da deposição de diferentes quantidades de polímero em cada um dos diferentes substratos, evidenciando, uma vez mais, a vantagem da dopagem com azoto. Biossensores de glucose foram construídos pela imobilização de glucose oxidase sobre PEDOT_CNT / CNx_CCl e as propriedades analíticas em conjunto com estabilidade operacional foram avaliadas. A espectroscopia de impedância electroquímica foi utilizado para avaliar as propriedades interfaciais dos eléctrodos de CNT / CNx_CCl, PEDOT_CNT / CNx_CCl e GOx_PEDOT_CNT / CNx_CCl. As diferenças na capacitância e nos valores resistência à transferência de carga foram notórios, revelando as vantagens da modificação do CCL com CNT e com CNx.

Devido ao seu baixo custo e grande simplicidade operacional, os eléctrodos impressos foram usados como substrato no desenvolvimento de sensores electroquímicos. A existência de locais com defeitos nos SPE de carbono mostra que o desempenho analítico destes eléctrodos pode ser melhorado, aumentando o número de sítios com defeito na sua superfície através da modificação destes eléctrodos com CNT, CB e Cu. Os eléctrodos modificados foram caracterizados morfologicamente por microscopia de varrimento electrónico e observou-se que a quantidade de nanopartículas de cobre depositado sobre CNT/SPE é visivelmente maior que aquela obtida para os SPE modificados com CB, devido ao facto de os nanotubos de carbono providenciarem uma maior área superficial activa. Utilizando a técnica de CV na presença da espécie modelo

hexacianoferrato (II), observou-se que após a modificação dos SPE com os diferentes compostos carbonáceos (CNT e CB), ocorreu um aumento considerável das correntes de pico, ao mesmo tempo que ΔEp diminuiu em relação ao SPE sem qualquer modificação. A resposta após a electrodeposição de cobre nas diferentes modificações de SPE foi também estudada, onde a modificação de Cu/SPE mostra uma melhoria no comportamento electroquímico e um carácter mais reversível do que na ausência destas nanopartículas metálicas. A resposta à presença de triptofano em solução também foi melhorada, através da modificação dos eléctrodos com nanopartículas metálicas, uma vez que a sinergia resultante da interacção nanopartículas Cu – nanopartículas de carbono possibilita melhores vias de condução de electrões e desta forma, melhora as propriedades electroquímicas destes eléctrodos impressos. Conclui-se também, que para além do seu baixo custo (muito menor que para os CNT) o negro de carbono mostra ser extremamente promissor no desenvolvimento de novas arquitecturas de sensores electroquímicos.

Eléctrodos de carbono modificados com filmes de hexacianoferratos de cobalto ou de cobre, mais glucose oxidase (GOx) imobilizada por ligação cruzada com glutaraldeído foram aplicados para a determinação de catiões de metais pesados, através da técnica de cronoamperometria. O método foi optimizado em relação ao potencial aplicado uma vez que a fim de se observar uma resposta inibidora, é necessário que, aquando da injecção do catião metálico a mudança do valor da corrente resultante da presença deste ião seja na direcção oposta à do substrato da enzima. Isso acontece em -0,35 V para o CF modificado com CoHCF e em -0,45 V para o CF modificado com CuHCF. Mediadores redox são normalmente utilizados com o objectivo de diminuir o potencial de trabalho e, consequentemente, reduzir interferências. Para a determinação de cobalto, foi observado um aumento na resposta por um factor de 17 em comparação com o biossensor sem mediador usando mediador CuHCF e por um factor de 7 quando se utiliza CoHCF. Na determinação de cobre, o aumento da resposta foi de 5 (para CoHCF) e 6 (para CuHCF) vezes superiores, respectivamente. Ao mesmo tempo, a resposta à glucose é de cerca de duas vezes maior quando se utiliza esses mediadores redox conduzindo à conclusão de que mediadores redox de hexacianoferratos, melhoraram a sensibilidade para a determinação de catiões metálicos. A inibição enzimática foi avaliada por amperometria na presença de concentrações de fixas de iões metálicos. Observou-se que a actividade da enzima foi suprimida duma forma mais evidente na presença de cádmio, seguido por cobalto, níquel e

finalmente, cobre para ambos os tipos de modificação de eléctrodo. Conclui-se também que a inibição observada era competitiva e reversível e apresentava o mesmo comportamento para todos os metais estudados.

Os resultados obtidos nesta tese abrem novas perspectivas futuras, em que os materiais de carbono estudados, poderão ser aplicados como substratos para novos sensores e biossensores electroquímicos.

Relativamente aos sensores desenvolvidos neste estudo, podem ser utilizados em conjunto com outras enzimas e aplicados em amostras naturais, por exemplo sangue e alimentos, e em relação ao biossensor da inibição enzimática, na determinação de metaliões como índice de toxicidade em amostras ambientais, como na água e no solo.

Os tecidos de carbono modificados com nanotubos dopados com azoto vão continuar a ser estudados, com a incorporação de outras formas nanométricas de carbono. Uma vez que o tecido de carbono comporta-se com uma matriz tridimensional, poderá estudar-se a aplicabilidade de outras enzimas no desenvolvimento de biossensores da terceira geração. A colocação da enzima nas paredes interiores do substrato (tecido) em vez de unicamente na sua superficie exterior poderá trazer inúmeras vantagens em termos de robustez e durabilidade operacional

Outras fenazinas poderão ser polimerizadas em diferentes tipos de eléctrodos de carbono nanoestruturados, e as suas propriedades catalíticas para a detecção de diversos analitos deverão ser exploradas. Devido às suas excelentes propriedades como mediadores redox, as fenazinas poderão ser utilizadas em conjunto com outras enzimas no desenvolvimento de novas arquitecturas para biossensores electroquímicos.

O negro de carbono, devido às suas excelentes propriedades electroquímicas demonstradas e acima de tudo a sua relação qualidade/preço, deverá ter um futuro assegurado, podendo, potencialmente, substituir os nanotubos de carbono em muitas aplicações.

Bibliografia

1. Uslu, B., & Ozkan, S. (2007). Anal. Letters, 40, 817.
2. Oliveira-Brett, A.M., & Brett, C.M.A (1993). Electrochemistry, Principles, Methods and Applications. Oxford University: Oxford University Press.
3. Pavone, P. (1993). Phys Rev B, 48(5), 3156
4. Valentini, F., Amine, A., Orlanducci, S., Terranova, M., & Palleschi, G. (2003). Anal. Chem., 75, 5413.
5. O'Shea, T.J, Leech, D., Smyth, M.R., & Vos J.G. (1992). Talanta, 443.
6. Kissinger, P., & Heineman, W. (1996). Eds.Lab. Tech. Electroanal. Chem. 2nd Ed. New York: Marcel Dekker, Inc.
7. Wang, J. (2000) Analytical Electrochemistry 2d Ed. New York Willey-VCH.
8. Noel, M., & Santhanam, R. (1998). J. Power Sources, 72, 53.
9. Juri, G., Wilhelm, H. -A., L'Heureux, J. High-Purity Graphite Powders for High Performance www. Timcal.com- acedido em Maio 2011
10. Lucas, P., & Marchand, A. (1990). Carbon, 28, 207.
11. Bokros, J.C. (1969). Deposition Structure and Properties of Pirolytic Carbon, in Chemistry Physics of Carbon New York Marcel Dekker
12. Beilby, A., & Carlsson, A. (1988). J. Electroanal. Chem., 248, 283.
13. McFadden, C., Russell, L., Melaragno, P., & Davis, J. (1992). Anal. Chem., 64, 1521.
14. Kim, Y., Scarnulis, D., & Ewing, A. (1986). Anal. Chem., 58, 1782.
15. Pierson, H. (1993) Handbook of Carbon, Graphite, Diamond and Fullerenes. Properties, Processing and Aplications, New Jersey, Noves Publication.
16. Iijima, S. (1991). Nature, 354, 56.

17. Kroto, H.W., Heath, J.R., O'Brien, S.C., Curl, R.F., & Smalley, R.E. (1985) Nature 318(14), 162

18. Harris, P.J.F. (1999). Carbon Nanotubes and Related Structures Cambridge Cambridge, University Press.

19. Dresselhaus, M.S., Dresselhaus, G., & Avouris, P. (2001) Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties and Aplications New York Springer Verlag.

20. Katz, E., & Willner, I. (2004). ChemPhysChem., 5, 1085.

21. Popov, V.N. (2004). Mater. Sci. Eng., 43, 61.

22. Dresselhaus, M.S., Dresselhaus, G., & Eklund P.C. (1996). Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes: Their Properties and Applications, Kentucky University, Elsevier Science.

23. Reilly, R.M. (2007). J. Nucl. Med., 48, 1039.

24. Jacobs, C.B., Peairs, M.J., & Venton, B.J. (2010). Anal. Chim. Acta, 662, 105.

25. Du, D., Wang, M., Zhang, J., Cai, J., Tu, H., & Zhang, A. (2008). Electrochem. Commun., 10, 85.

26. Jeykumari D.R.S., & Narayanan, S.S. (2009). Carbon, 47, 957.

27. Wang, Q., Shi, J., Ni, J., Gao F., Gao, F., Weng, W., & Jiao K. (2011). Electrochim. Acta, 56, 3829.

28. Gooding, J.J., Wibowo, R., Liu, J.Q., Yang, W.R., Losic, D., &Orbons, S. (2003). J. Amer. Chem. Soc., 30, 9006.

29. Mawhinney, D., Naumenko, V., Kuznetsova, A., Yates, J., Liu, J., & Smalley, R.E. (2000). JACS, 122, 2383.

30. Feng, W., Zhou, F., Wang, X.G., Wan, M.X., Fujii, A., & Yoshino, K. (2003). Chin. Phys. Lett., 20, 753.

31. Kingston, C.T., & Simard, B.(2003). Anal. Lett., 36, 3119.

32. Ozawa, M., & Ōsawa, E. (2006). Carbon Nanotechnology. In L. Dai. Dordrecht: Elsevier.

33. Medàlia, A.L. (1982). Rubber Chem. and Tech., 51, 447.

34. Banks, C.E., Davies, T.J. Wildgoose, G.G., & Compton, R.G. (2005). Chem. Commun., 829.

35. Arduini, F., Amine, A., Majorani, C., Di. Giorgio, F., Felicis, D., & Cataldo, F., (2010). Electrochem. Commun., 12, 346.

36. Arduini, F., Majorani, C., Amine, A., Moscone, D., & Palleschi, G. (2011). Electr. Acta, 56, 4209.

37. Sartore, L., Sassi, A., & Barbaglio, M. (2011). Chem. Chem. Tech., 5, 67.

38. Lei, Y., Li, T., Gu, J., Yu, T., Liu, J., & Zou, Z. (2012). Electroanal., 24, 699.

39. Bu, P., Liu, S., Lu, Y., Zhuang, S., Wang, H., & Tu, F. (2012). Int. J. Electrochem. Sci., 7, 4617.

40. Alcantara, R., Jimenez-Mateos, J.M., Lavela, P., & Tirado J.L., (2001). Electrochem. Commun., 3, 639.

41. Hocevar, S.B., & Ogorevc, B., (2007). Talanta, 74, 405.

42. Svegl I.G., Bele M., & Ogorevc, B. (2008). Anal Chim Acta., 628, 173.

43. Jenkins, G., & Kawamura, K. (1971). Nature, 231, 175.

44. Jenkins, G., & Kawamura, K. (1972). Procedings of the Royal Academy of London. A Mathematical and Physical Sciences, 327, 501.

45. Pesin, L., & Baitinger, E. (2002). Carbon, 40, 295.

46. Pesin, L. (2002). J. Mater. Sci., 37, 1.

47. Harris, P. (2004). Phil. Mag., 84, 3159.

48. McReery, R. (2006). Chem. Rev., 108, 2646.

49. Hutton, H., Huang, W., Alsmeyer, D., Kometani, J., McCreery, R., & Neenan, T., (1993). Chem. Mater., 5, 1110.

50. Doremus, R. (1973). Glass Science. New York: John Willey & Sons.

51. Friedrich, J., Ponce-de-Leon, C., Reade, G., & Walsh, F. (2004). J. Electroanal. Chem, 561, 203.

52. Hart, J., & Wring, S. (1994). Electroanal., 6, 617.

53. Tse, Y., Janda, P., Lam, H., & Lever, A. (1995). Anal. Chem., 67, 981.

54. Mu, S., Wang, X., Li, Y.T., Wang, Y., Li, D.W., & Long, Y.T., (2012). Analyst, 137, 3220.

55. Galan-Vidal, C., Muñoz, J., Domínguez, C., & Alegret, S. (1995). Trends Anal. Chem., 14, 225.

56. Hart, J., Crew, A., Crouch, E., Honeychurch, K., & Pemberton, R. (2004). Anal. Lett., 37, 789.

57. Honeychurch, K., & Hart, J. (2003). Trends Anal. Chem., 22, 456.

58. F. Cataldo, Carbon40 (2002) 157.

59. Ghica, M.E., Pauliukaite, R., Marchand, N., Devic, E., & Brett, C.M.A. (2007). Anal. Chim. Acta, 591, 80.

60. Pauliukaite, R., Gouveia-Caridade, C., Liess, H.-D., & Brett, C.M.A. (2009). J. Appl. Polymer Sci., 112, 505.

61. Brett, C.M.A., Angnes, L., & Liess, H.-D. (2001). Electroanal., 13, 765.

62. Castillo, J., Gáspár, S., Leth, S., Bontidean, I., Niculescu, & M., Mortari, A., (2004). Sens. Actuators B, 102, 179.

63. Thévenot, D., Toth, K., Durst, R., & Wilson, G. (2001). Anal. Lett., 34, 635.

64. Belluzo, M., Ribone, M., & Lagier, C. (2006). Sensors, 8, 1366.

65. Gáspár, S., Bontidean, A., Collins, A., Niculescu, M. M., & Csöregi, E. (2002). Recent Researc Developments in Analytical Chemistry. Kerala, India: S.G. Pandalai.

66. http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/potentiometric.html acedido em Setembro de 2012.

67. Prodromidis, M. (2010). Electrochim. Acta, 55, 4227.

68. McMurry, J., & Castellion, M. (2003). Fundamentals of General, Organica and Biological Chemistry. New Jersey: Pearson Prentice Hall.

69. Nelson, D., & Cox, M. (2008). Lehninger Principles of Biochemistry. USA: W.H. Freeman.

70. Zubay, G. (1998). Biochemistry. USA: Brown Publishers.

71. Tipton, K. (1994). Eur. J. Biochem, 223, 1.

72. Horton, H., Moran, L., Ochs, R., Rawn, J., & Scrimgeour, K. (2003). Principles of Biochemistry. New Jersey: Prentice Hall.

73. Lehninger, G. (1975). Biochemistry. New York: Worth Publishers.

74. Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., Rodwell, V., Harper, & P. (2009). Harper's Illustrated Biochemistry, New York, McGraw-Hill.

75. http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb77_3.html] acedido em Setembro de 2012

76. O'Malley, J., & Weaver, J. (1972). Biochem., 11, 3527.

77. Nelson, J., & Griffin, E. (1916). J. Am. Chem. Soc., 38, 1109.

78. Fessner, W.-D., & Anthonsen, T. (2008). Modern Biocatalysis, Weinheim, Willey-VCH.

79. Jegannathan, K.R., Abang, S., Poncelet, D., Chan, E.S., & Ravindra, P. (2008) Crit. Ver. Biotechnol., 28, 253.

80. Cardoso, C.L., Moraes, M.C., & Cass, Q.B. (2009) Quím. Nova, 32, 75.

81. Barsan, M.M., Carvalho, R.C., Zhong, Y., Sun, X., & Brett, C.M.A. (2012) Electrochim. Acta, Electrochim. Acta, 85, 203.

82. Thermo Scientific Pierce (2006) Crosslinking Technical Handbook, USA

83. Cabral, J.M.S., Barros, M.R.A., & Gama, M, (2003). Engenharia Enzimática,Lidel Edições Técnicas Lousã, Tipografia Lousanense.

84. Webb, J.L., (1966). Enzyme and metabolic inhibitors, New York, Academic Press.

85. Van Loon, G.W., & Dufft, S.J., (2000). Enviromental Chemistry. A Global perspective, Oxford, Oxford University Press.

86. Serra, P.A., (2011) Biosensors – Emerging Materials and Applications, Croatia, InTech.

87. Uo, M., Numata, M., Suzuki, M., Tamiya, E., Karube, I., & Makishima, A., (1992). J. Ceram. Soc. Jpn.,100, 430.

88. Evtugyn, G.A., Budnikov, H.C., & Nikolskava, E.B., (1998). Talanta, 46, 465.

89. Chiang, C., Fincher, C., Park, Y., Heeger, A., Shirakawa, H., & Louis, E., (1977). Phys. Rev. 39, 1098.

90. Diaz, A., Kanazawa, K., & Gardini, G. (1979). J. Chem. Soc., Chem. Commun., 635.

91. Diaz, A., & Logan, J. (1980). J. Electroanal. Chem., 111, 111.

92. Abruña, H. (1988). Electroresponse of Molecular and Polymeric Systems, New York, Marcel Dekker.

93. Karyakin, A. (2010). Electropolymerized Azines: A New Group of Electroactive Polymers, in Electropolymerization: Concepts, Materials and Applications., Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

94. Karyakin, A., Karyakina, E., & Schmidt, H. (1999). Electroanal., 11, 149.

95. Guttenberger, M. (2000). Plant Soil, 226, 211.

96. Cardona, P., Soto, C., Martín, C., Giquel, B., Augustí, G., & Guirado, E., (2006). Microbes Infect., 8, 183.

97. Ricci, V., Sommi, P., Fiocca, R., Necchi, V., Romano, M., & Solcia, E. (2002). Biochem. Res. Comm, 292, 167.

98. Ni, Y., Lin, D., & Kokot, S. (2006). Anal. Biochem., 352, 231.

99. Zhang, F., Wan, Q., Li, C., Wang, X., Zhu, Z., & Xian, Y. (2004). Anal. Bioanal. Chem., 380, 637.

100. Bartels, P. (1956). Z. Phys. Chem., 9, 74.

101. Halliday, C., & Matthews, D. (1983). Aust. J. Chem., 36, 507.

102. Choi, J., & Bard, J. (2004). J. Electroanal. Chem, 573, 215.

103. Chen, S., & Lin, K. (2001). J. Electroanal. Chem. 511, 101.

104. Barsan, M.M., Pinto, E.M.,& Brett, C.M.A. (2011). Phys. Chem. Chem. Phys., 13, 5462.

105. Yang, R., Ruan, C., & Deng, J. (1998) J. Appl. Electrochem., 28, 1269**.**

106. Dilek, K., Pauliukaite, R, & Brett, C.M.A. (2011). J. Electroanal. Chem., 662, 328.

107. Xia, L., Qingjuan, N., & Guangjiu, L. (2011). J. Braz. Chem. Soc., 22, 422.

108. Selvaraju, T., Ramaraj, R., (2003) Electrochem. Comm., 5, 667.

109. Periasamy, A.P., Umasankar, Y., &Chen, S.-M. (2011). Talanta, 83, 930.

110. Yang, T., Hu, Y., Li, W., & Jiao, K. (2011). Colloid Surface B, 83, 179.

111. Benito, D., Garcia-Jareño, J., Navaro-Laboulais, J., & Vincente, F. (1998). J. Electroanal. Chem., 446, 47.

112. Bauldreay, J., & Archer, M. (1983). Electrochim. Acta, 28, 1515

113. Schleret, D., & Karyakin, A. (1995). J. Electroanal. Chem., 395, 221.

114. Ghica, M., & Brett, C.M.A. (2006). Electroanal., 18, 748.

115. Carvalho, R.C., Gouveia-Caridade, C., & Brett, C.M.A. (2010). Anal. Bioanal. Chem., 398, 1675.

116. Karyakin, A., Bobrova, O., & Karyakina, E. (1995). J. Electroanal. Chem., 399, 179.

117. Groenendaal, L., Zotti, G., Aubert, P., Waybright, S., & Reynolds, J. (2003). Adv. Mater., 15, 855.

118. Richardson-Burns, S., Hendricks, J., Foster, B., Povlich, L., Kim, D., & Martin, D. (2007). Biomaterials, 28, 1539.

119. Zhang, F., Johansson, M., Andersson, M., Hummelen, J., & Inganäs, O. (2002). Adv. Mater., 14, 662.

120. Kulkarni, A., Tonzola, C., Babel, A., & Jenekhe, S. (2004). Chem. Mater., 16, 4556.

121. Aradilla, D., Azambuja, D., Estrany, F., Iribarren, J., Ferreira, C., & C. (2011). Polym. Chem., 8, 2548.

122. Rahman, M., Kumar, P., Park, D., & Shim, Y. (2008). Sensors, 8, 118.

123. Kakhki, S., Barsan, M., Shams, E., & Brett, C.M.A. (2012). Synth. Met., 161, 2718.

124. Seo, K., & Chung, J. (2000). Polymer, 41, 4491.

125. Yagci, Y., Jockush, S., & Turro, N. (2007). Macromolecules, 40, 4481.

126. Abou-Elenien, G., El-Maghraby, A., & El-Abdallah, G. (2004). Synth. Met., 146, 109.

127. Tamburri, E., Orlanducci, S., Toschi, F., Terranova, M., & Passeri, D. (2009). Synth. Met., 159, 406.

128. Qi, Z., & Pickup, P. (1998). Chem. Commun, 21, 2299.

129. Downard, A., & Pletcher, D. (1986). J. Electroanal. Chem., 206, 139.

130. Sotzing, G., Reddinger, J., Reynolds, J., & Steel, P. (1997). Synth. Met., 84, 199.

131. Randriamahazaka, H., Noe, V., & Chevrot, C. (1999). J. Electroanal. Chem., 472, 103.

132. Sakmeche, N., Aeiyach, S., Aaron, J., Jouini, M., Lacroix, J., & Lacaze, P. (1999). Langmuir, 15, 2566.

133. Manisankar, P., Vedhi, C., Selvanathan, G., & Prabu, H. (2007). J. Appl. Polym. Sci., 104, 3285.

134. Tsakova, V., Winkels, S., & Schultze, J. (2000). Electrochim. Acta, 46, 759.

135. Crispin, X., Jakobsson, F., Crispin, A., Grim, P., Andersson, P., Volodin, A. (2006). Chem. Mater., 18, 4354.

136. Breiby, D., Samuelsen, L., Groenedaal, B., & Struth, B. (2003). J. Polym. Sci. Polym. Phys., 41, 945.

137. Han, D., Yang, G., Song, J., Niu, L., & Ivaska, A. (2007). J. Electroanal. Chem., 602, 24.

138. Heras, M., Lupu, S., Pigani, L., Pirvu, C., Terzi, F., Seeber, R. (2005). Electrochim. Acta, 50, 1685.

139. Pigani, L., Musiani, M., Pirvu, C., Terzi, F., Zanardi, C., & Seeber, R. (2007). Electrochim. Acta, 1910.

140. Kok, M., Buechel, M., Vulto, S., van de Weije, P., Meulenkamp, E., de Winter, S. (2004). Phys. Stat. Sol, 201, 1342.

141. Scientiarum, M. B. (1710). Berlin.

142. American Cyanamid Company. (1953). The Chemistry of the Ferrocyanides. New York: Beacon Press.

143. Neff, V. (1978). J. Electrochem. Soc., 125, 886.

144. Jiang, M., & Zhao, Z. (1990). J. Electroanal. Chem., 292, 281.

145. Dostal, A., Shroeder, U., & Scholtz, F. (1995). Inorg. Chem., 34, 1711.

146. Koncki, R. (2002). Crit. Rev. Anal. Chem., 32, 79.

147. Tacconi, N., Rajeshwar, K., & Lezna, R. (2003). Chem. Mater., 15, 3046.

148. Jin, Z., & Dong, S. (1990). Electrochim. Acta, 35, 1057.

149. Gao, Z., Bobacka, J., & Ivaska, A. (1993). Electrochim. Acta, 38, 379.

150. Itaia, K., Uchida, I., & Neff, V. (1986). Acc. Chem. Res., 19, 162.

151. Zhang, D., Wang, K., Xia, X., & Chen, H. (2003). J. Solid State Electrochem., 7, 561.

152. Buser, H., Schwarzenbach, D., Petter, W., & Ludi, A. (1977). Inorg. Chem., 16, 2704.

153. Wessells, C., Huggins, R., & Cui, Y. (2011). Nature Commun., 2,11.

154. Ricci, F., Amine, A., Palleschi, G., & Moscone, D. (2003). Biosens. Bioelectron., 18, 165.

155. Miecznikowski, K., Cox, J., Lewer, A., & Kulesza, P. (2000). J. Solid State Electrochem., 4, 199.

156. Yu, H., & Zheng, J. (2007). Chin. J. Chem., 25, 503.

157. Kulesza, P., Malik, M., Shmidt, R., Smolinska, A., Miecznikowski, K., Zamponi, S. (2000). J. Electroanal. Chem., 487, 57.

158. Horanyi, G., Inzelt, G., & Kulesza, P. (1990). Electrochim. Acta, 35, 811.

159. Liu, C., Wang, Y., Zhu, G., & Dong, S. (1997). Electrochim. Acta, 42, 1795.

160. Tabrizivand, G., Sabzi, R., & Farhadi, K. (2006). J. Solid State Electrochem., 11, 103.

161. Shankaran, D., & Narayanan, S. (1999). Sens. Actuators B, 55, 191.

162. Malik, M., & Kulesza, P. (1996). Electroanal., 8, 113.

163. Pauliukaite, R.C., Ghica, M.E., & Brett, C.M.A. (2005). Anal. Bioanal. Chem., 381, 972.

164. Chen, S., Wu, M., & Thangamuthu, R. (2008). Electroanal., 20, 178.

165. Castro, S., Mortimer, R., Oliveira, M., & Stradiotto, N. (2008). Sensors, 8, 1950.

166. Yon, H., & Lowe, C. (1987). Anal. Chem., 59, 2111.

167. Florescu, M., & Brett, C.M.A. (2004). Anal. Lett., 37, 871.

168. Karyakin, A., Karyakina, E., & Gorton, L. (1996). Talanta, 43, 1597.

169. Milardovic, S., Grabaric, Z., Tkalcec, M., & Rumenjak, V. (2000). AOAC Int., 83, 1212.

170. Chi, Q., & Dong, S. (1995). Anal. Chim. Acta, 310, 429.

171. Butler, J. (1924). Trans. Faraday Soc., 19, 729.

172. Erdey-Gruz, T., & Volmer, M. (1930). Phys. Chem., 19, 203.

173. Reinmuth, W. (1972). J. Electroanal. Chem., 34, 297.

174. Brett, C.M.A., & Oliveira-Brett, A. (1998). Electroanalysis. Oxford: Oxford University Press.

175. Randles, J. (1948). Trans. Far. Soc., 44, 327.

176. Sevcik, A. (1948). Collect. Czech. Chem. Commun., 13, 349.

177. Gileadi, E., Kirowa-Eisner, E., & Penciner, J. (1975). Interfacial Chemistry: An Experimental Approach. U.S.A.: Addison-Wesley.

178. Bard, A., & Faulkner, L. (2000). Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications. New York: John Wiley and Sons.

179. Parsons, R. (1990). Surf. Sci., 90, 813.

180. Bockris, J., & Khan, S. (1993). Surface Electrochemistry: A Molecular Level Approach. New York: Plenum Press.

181. Nicholson, R. (1965). Anal. Chem., 37, 1351.

182. Diculescu, V., Vivan, M., & Oliveira Brett, A. (2006). Electroanal., 18, 1808.

183. Cottrell, F. (1903). Z. Physik. Chem., 42, 385.

184. Barker, G., & Jenkins, I. (1952). Anal. Chim, 24, 1519.

185. Barker, G., & Jenkins, I. (1958). Anal. Chim. Acta, 18, 118.

186. Odea, J., Ribes, A., & Osteryoung, J. (1993). J. Electroanal. Chem., 345, 287.

187. Osteryoung, J., & Osteryoung, R. (1985). Anal. Chem., 57, 101.

188. Lorenz, W., & Shulze, K. (1975). J. Electroanal. Chem, 65, 141.

189. Benito, D., Gabrielli, C., García-Jareño, J.J., Keddam, M., Perrot, H. & Vicente, F. (2002) Electrochem. Commun., 4, 613.

190. Pauliukaite, R., Chiorcea-Paquim, A.-M., Oliveira Brett, A.M., & Brett, C.M.A. (2006) Electrochim. Acta, 52, 1.

191. Cottis, R., & Turgoose, S. (1999). Electrochemical Impedance and Noise, NACE International, Manchester.

192. Barsoukov, E., & Macdonald, J.R. (2005). Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications, USA, Willey-Interscience.

193. Barsan, M.M., Pinto, E.M., Florescu, M., & Brett, C.M.A. (2009). Bioelectrochem., 76, 135.

194. Pinto, E.M., Gouveia-Caridade, C., Soares, D.M., & Brett, C.M.A. (2009). Appl. Surf. Sci., 255, 8084.

195. Randles, J. (1947). Discus, Farad. Soc., 1, 11.

196. Goldstein, J. (1992). Scaning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis - A Text book for Biologists and Geologists. New York: Plenum Press.

197. Goldstein, J., Newbury, D., Echlin, P., D.C., J., Fiori, C., & Lifshin, E. (1981). Scaning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. New York, Plenum.

198. Gooding, J. (2005). Electrochim. Acta., 50, 3049.

199. Male, K., Hrapovic, S., & Luong, J. (2007). Analyst, 132, 1254.

200. Du, D., Huang, X., Cai, J., & Zhang, A. (2007). Biosens. Bioelectron., 23, 285.

201. Lawrence, N., P.D., R., & J., W. (2005). Electroanal., 17, 65.

202. Merckoci, A., Pumera, M., Llopis, X., Perez, B., Dell Valle, M., & Alegret, S. (2005). Trends. Anal. Chem., 24, 826.

203. Oni, J., & Nyokong, T. (2001). Anal. Chim. Acta, 434, 9.

204. Star, A., Han, T., Christophe, J., Gabriel, P., Bradley, K., & Gruner, G. (2003). Nano Lett., 3, 1421.

205. Pauliukaite, R., Ghica, M.E, Barsan, M.M, & Brett, C.M.A. (2010). Anal. Lett., 2010, 43, 1588., 43, 1588.

206. Gupta, S. (2000). Biomed Environ Sci., 13, 117.

207. Barsan, M.M, Pinto, E.M., & Brett, C.M.A. (2008). Electrochim Acta, 53, 3973.

208. Pauliukaite, R., & Brett, C.M.A. (2008). Electroanal., 20, 1275.

209. Pauliukaite, R., Ghica, M.E., Barsan, M.M, & Brett, C.M.A. (2007). J. Solid State Electrochem, 11, 899.

210. Umasankar, Y., & Chen, S. (2007). Electrochim. Acta, 52, 5985.

211. Albery, A., Hillmam, A., Egdell, R., & Nutton, H. (1984). J. Chem. Soc., 80, 111.

212. Yang, C., Yi, J., Tang, X., Zhou, G., & Zeng, Y. (2006). React. Funct. Polym., 66, 1336.

213. Chen, C., & Zhu, H. (2002). Bull. Electrochem., 18, 247.

214. Persson, B., & Gorton, L. (1990). J. Electroanal. Chem, 292, 115.

215. Persson, B. (1990). J. Electroanal. Chem., 287, 61.

216. Arvand, A., Sohrabnezhad, S., Mousavi, M., Shamsipur, M., & Zanhanchi, M. (2003). Anal. Chim. Acta, 491, 193.

217. Pessoa, C., Gushikem, Y., Kubota, L., & Gorton, L. (1997). J. Electroanal. Chem., 431, 23.

218. Munteanu, F., Kubota, L., & Gorton, L. (2001). J. Electroanal. Chem., 509, 2.

219. Inzelt, G., & Csahók, E. (1999). Electroanal., 11, 744.

220. Pournaghi-Azar, M., & Ojani, R. (1995). Talanta, 42, 1839.

221. Hong, J., Ghourchian, H., Rezaei-Zarchi, S., Moosavi-Movahedi, A., Ahmadian, S., & Saboury, A. (2007). Anal. Lett., 40, 483.

222. Liu, H., Liu, Y., Qian, J., Yu, T., & Deng, J. (1996). Talanta, 43, 111.

223. Streeter, I., Wildgoose, G., Shao, L., & Compton, R. (2008). Sensors and Actuators B, 133, 462.

224. Keeley, G., & Lyons, M. (2009). Int J Electrochem Sci, 4, 794.

225. Henstridge, M., Dickinson, E., Aslanoglu, M., Batchelor-McAuley, C., & Compton, R. (2010). Sens Actuators B, 145, 417.

226. Kachoosangi, R., Wildgoose, G., & Compton, R. (2008). Analyst, 133, 888.

227. Wring, S., & Hart, J. (1990). Anal. Chim. Acta,, 229, 63.

228. Teixeira, M., Ramos, L. F.-F., & Cavalheiro, E. (2003). Anal. Bioanal. Chem., 376, 214.

229. Jurevičiūtė, I., Brazdžiuvienė, K., Bernotaitė, L., & Šalkus, B. (2005). Sensor Actuat. B-Chem., 107, 716.

230. Brazdžiuvienė, K., Jurevičiūtė, I., & Malinauskas, A. (2007). Electrochim. Acta, 53 (2007) 785, 53, 785.~

231. de Mattos, I., & Gorton, L. (2001). Quim. Nova, 24, 200.

232. Wang, X., Watanabe, H., & Uchiyama, S. (2008). Talanta, 74, 1681.

233. Hoffmann, A.A., Dias, Silvio, L.P., Rodrigues, J.R. Pavan, F.A. & Benvenutti, E.V., & Lima, E.C. (2008) J. Braz. Chem. Soc., 19, 943.

234. Florou, A., Prodromidis, M., Karayannis, M., & Tzouwara-Karayanni, S. (2000). Anal. Chim. Acta, 423, 107.

235. Florou, A., Prodromidis, M., Karayannis, M., & Tzouwara-Karayanni, S. (2000). Anal. Chim. Acta, 409, 113.

236. Kuznetsova, A., Popova, I., Yates, J., Bronikowski, M., Huffman, C., Liu, J., (2002). J. Am. Chem. Soc., 123, 10699.

237. Dumitrescu, I., Unwin, P., & Macpherson, J. (2009). Chem. Commun., 45, 6886.

238. Barsan, M., & Brett, C. (2009). Bioelectrochem., 76, 135.

239. Alegret, S., Céspedes, F., Martínez-Fàbregas, E., Martorell, D., & Morales, A. (1996). Biosens. Bioelectron., 11, 35.

240. Musameh, M., Lawrence, N., & Wang, J. (2005). Electrochem. Commun., 7, 14.

241. Banks, C., Moore, R., Davies, T., & Compton, R. (2004). Chem. Commun., 16, 1804.

242. Shao, L., Tobias, G., Salzmann, C., Ballesteros, B., Hong, S., Crossley, A. (2007). Chem. Commun., 47, 5090.

243. Moore, R., Banks, C., & Compton, R. (2004). Anal. Chem., 76, 2677.

244. Ji, X., Kadara, R., Krussma, J., Chen, Q., & Banks, C. (2010). Electroanal., 22, 7.

245. Pumera, M., & Iwai, H. (2009). Chem. Asian J., 4, 554.

246. Banks, C., Crossley, A., Salter, C., Wilkins, S., & Compton, R. (2006). Angew Chem. Int. Ed., 45, 2533.

247. Pumera, M., & Iwai, H. (2009). J. Phys. Chem, C., 113, 4401.

248. Dai, X., Wildgoose, G., & Compton, R. (2006). Analyst, 131, 901

249. Kolodiazhnyi, T., & Pumera, M. (2008). Small, 4, 1476.

250. Lyon, J., & Stevenson, K. (2007). Langmuir, 23, 11311.

251. Zhang, D., Shi, L., Fang, J., & Dai, K. (2007). J. Mater. Sci., 42, 2471.

252. Bacon, R. (1960). J. Appl. Phys., 31, 283.

253. Fitzer, E. (1989). Carbon, 27, 621.

254. Litster, S., & McLean, G. (2004). J. Power Sources, 130, 61.

255. Buchholz, D., Doherty, S., & Chang, R. (2003). Carbon, 41, 1625.

256. Rajesh, B., Karthik, V., Karthikeyan, S., Thampi, K., Bonard, J.-M., & Viswanathan, B. (2002). Fuel, 2177.

257. Tang, H., Chen, J., Huang, Z., Wang, D., Ren, Z., Nie, L. (2004). Carbon, 42, 191.

258. Hou, H., & Reneker, H. (2004). Adv. Mater., 16, 69.

259. Wang, c., Waje, m., Wang, x., Tang, J., Haddon, R., & Yan, Y. (2004). Nano Lett., 4, 345.

260. Li, W., Liang, C., Qiu, J., Zhou, W., Han, H., Wei, Z. (2002). Carbon, 791.

261. Saha, M., Li, R., Sun, X., & Ye, S. (2009). Electrochem. Commun., 438, 11.

262. Chen, C.-C., Chen, V., Hsu, C.-H., & Li, I.-H. (2005). Diam. Relat. Mater., 14, 770.

263. Rajalakshmi, N., Ryu, H., Shaijumon, M., & Ramaprabhu, S. (2005). J. Power Sources, 150, 250.

264. Jang, J., Lee, C., Lee, T., Lyu, S., & Lee, C. (2006). Curr. Appl. Phys., 6, 141.

265. Lim, S., Elim, H., Gao, X., Wee, A., Ji, W., Lee, J. (2006). Phys. Rev. B, 73, 45402.

266. Shim, M., Wong, N., Kam, S., Chen, R., Li, Y., & Da, H. (2002). Nano Lett., 2, 285.

267. Bhattacharyya, S., Sinturel, C., Salvetat, J.-P., & Saboungi, M.-L. (2005). Appl. Phys. Lett., 86, 113104.

268. Azamian, B., Davis, J., Coleman, K., Bagshaw, C., & Green, M. J. (2002). Am. Chem. Soc., 124, 12664.

269. Erlanger, B., Chen, B.-X., Zhu, M., & Brus, L. (2001). Nano Lett., 1, 465.

270. Sotiropoulou, S., & Chaniotakis, N. (2003). Anal. Bioanal. Chem., 375, 103.

271. Villalpando-Páez, F. (2004). Chem. Phys. Lett., 386, 137.

272. Armstrong, F., Hill, H., & Walton, N. (1988). Acc. Chem. Res., 21, 407.

273. Horng, Y.-Y., Hsu, Y.-K., Ganguly, A., Chen, C.-C., Chen, L.-C., & Chen, L. (2009). Electrochem. Commun., 11, 850.

274. Desriani, I., Hanashi, T., Yamazaki, T., Tsugawa, W., & Sode, K. (2010). The Open Electrochemistry Journal, 2, 6.

275. Liu, H., Zhang, Y., Li, R., Sun, X., Désilets, D., & Abou-Rachid, H. (2010) Carbon, 48, 1498.

276. Ghica, M.E., & Brett, C.M.A. (2005) Anal. Chim. Acta, 532, 145.

277. Guiseppi-Ellie, A., Lei, C., & Baughman, R. (2002). Nanotechnol., 13, 559.

278. Madsen, L., Carneiro, K., Zaba, B., Underhill, A., & Van der Sluijs, M. (1991). Synth. Met., 41, 2931.

279. Guo, D., & Li, H. (2005). J. Solid State Electrochem., 9, 445.

280. Bobacka, J., Lewenstam, A., & Ivaska, A. (2000). J. Electroanal. Chem., 489, 17.

281. Liu, M., Wen, Y., Li, D., Yue, R., Xu, J., & He, H. (2011). Sens. Actuat. B, 159, 277.

282. Carvalho, R.C., Mandil, A., Prathish, K., Amine, A., & Brett, C.M.A. (2012) Electroanalysis, DOI: 10.1002/elan.201200499.

283. Meijer, A., & Dubbelhuis, P. (2004). Biochem. Biophys. Res. Commun., 397.

284. Belitz, H., Grosch, W., & Schieberle, R. (2004). Food Chemistry, 3rd edition. Berlin: Springer.

285. Mohamed, M., & Cordle, C. (2000). Dev. Food Sci., 41, 181.

286. Masuda, H., Odani, A., Yamazaki, T., Yajima, T., & Yamauchi, O. (1993). Inorg. Chem., 32, 1111.

287. Deore, B., & Nagaoka, T. (2001). Anal. Sci., 17, i1691.

288. Deore, B., Shiigi, H., & Nagaoka, T. (2002). Talanta, 58, 1203.

289. Hui, B., & Huber, C. (1992). Anal. Chim. Acta, 134, 211.

290. Ye, J., & Baldwin, R. (1994). Anal. Chem., 66, 2669.

291. Macdonald, S., & Roscoe, S. (1997). Electrochim. Acta, 42, 1189.

292. Zhao, Y., Zhang, B., & Liao, Y. (2003). Sens. Actuator B, 92, 279.

293. Fang-Hui, W., Guang-Chao, Z., Xian-Wen, W., & Zhou-Sheng, Y. (2004). Microchim. Acta. 144, 243.

294. Liu, Y., & Xu, L. (2007). Sensors, 7, 2446.

295. Huang, L., Zia, J., & O'Brian, S. (2007). J. Mater. Chem., 17, 3863.

296. Tsai, Y., Li, S., & Liao, S. (2006). Biosens. Bioelectron., 22, 495.

297. Pedano, M.L., & Rivas, G.A. (2004). Electrochem. Commun., 6, 10.

298. Guo, S., & Dong, S. (2009). Trends Anal. Chem., 28, 96.

299. Guo, S., Li, J., Ren, W., Wen, D., Dong, S., & Wang, E. (2009). Chem. Mater., 21, 2247.

300. Marsh, D., Rance, G., Whitby, R., Giustiniano, F., & Khlobystov, A. (2008). J. Mater. Chem., 18, 2249.

301. Hu, X., Wang, T., Wang, L., Guo, S., & Dong, S. (2007). Langmuir, 23, 6352.

302. Pedrosa, V., Epur, R., Benton, J., Overfelt, R., & Simonian, A. (2009). Sens. Actuators B, 140, 92.

303. Ren, X., Meng, X., Chen, D., Tang, F., & Jiao, J. (2005). Biosens. Bioelectron., 21, 433.

304. Wu, S., Zhao, H., Ju, J., Shi, C., & Zhao, J. (2006). Electrochem.Commun., 8, 1197.

305. Arduini, F., Di Nardo, F., Amine, A., Micheli, L., Palleschi, G., & Moscone, D. (2012). Electroanal., 24, 743.

306. Webster, T. (2009). Nanostructure Science and Technology. In Safety of Nanoparticles: From Manufacturing to Medical Applications. Springer.

307. Hopkins, A., & Lewis, N. (2001). Anal. Chem., 73, 884.

308. Carmo, M., Linardi, M., & Poco, J. (2009). Applied Catalyst A: General, 355, 132.

309. Yang, C.-W., Zen, J.-M., Kao, Y.-L., Hsu, C.-T., Chung, T.-C., Chang, C.-C. (2009). Anal. Biochem., 395, 224.

310. Li, Q., Zhang, X., Wu, G., Xu, S., & Wu, C. (2007). Ultrason. Sonochem., 14, 225.

311. Lahiff, E., Lynam, C., Gilmartin, N., O'Kennedy, R., & Diamond, D. (2010). Anal. Bioanal. Chem., 398, 1575.

312. Zen, J.M., Hsu, C.T., Kumar, A.S., Lyuu, H.J., & Lin, K.Y. (2004). Analyst, 129, 841.

313. Palchetti, I., & Mascini, M. (2006). Top. Curr. Chem., 43, 27.

314. Li, C., Ya, Y., & Zhan, G, (2010). Colloid Surface B, 76, 340.

315. Guo, Y., Guo, S., Fang, Y., & Dong, S. (2010). Electrochim. Acta, 55, 3927.

316. Zhicheng, T., Qiuye, L., & Gongxuan, L. (2006). Carbon, 45, 41.

317. Liu, Y., Qu, X., Guo, H., Chen, H., Liu, B., & Dong, S. (2006). Biosens. Bioelectron., 21, 2195.

318. Shioyama, H., Honjo, K., Kiuchi, M., Yamada, Y., Ueda, A., Kuriyama, N., & Kobayashi, T. (2006). J. Power Sources, 161, 836.

319. Vasjari, M., Merkoçi, A., Hart, J.P., & Alegret, S. (2005) Microchim. Acta, 150, 233.

320. Ghica, M.E., Carvalho, R.C., Amine, A., & Brett, C.M.A. (2013), Sensor Actuat. B-Chem., 10.1016/j.snb.2012.12.113.

321. Chen, C., Xie, Q., Wang, L., Qin, C., Xie, F., & Yao, S. (2011). J. Anal. Chem., 83, 2660.

322. Ilangovan, R., Daniel, D., Krastanov, A., Zachariah, C., & Elizabeth, R. (2006). Biotechnol. Biotechnol. Equip., 20, 184.

323. Amine, A., Mohammadi, H., Bourais, I., & Palleschi, G. (2006). Biosens. Bioelectron., 21 1405.

324. Rodriguez, B.B, Bolbot, J.A., & Tothill, I.E. (2004). Biosens. Bioelectron., 19, 1157.

325. Nomngongo, P.N., Ngila, J.C., Nyamori, V.O., Songa, E.A., & Iwuoha, E.I. (2011) Anal. Lett., 44, 2031.

326. Zhu, M., Yuan, Z., & Li, X. (2001). Biosens. Bioelectron., 16, 9.

327. Compagnone, D., Lupu, A.S., Ciucu, A., Magearu, V., Cremisini, C., & Palleschi, G. (2001). Anal. Lett., 34, 17.

328. Yang, Y., Yang, M., Wang, H., Tang, L.,Shen, G., & Yu, R. (2004) Anal. Chim. Acta, 509, 151.

329. Malitesta, C., & Guascito, M.R. (2005). Biosens. Bioelectron., 20, 1643.

330. Liu, J.-X., Xu, X.-M., Tang, L., & Zeng, G.-M. (2009). Trans. Nonferrrous Met. Soc. China, 19, 235.

331. Alexander, P.W., & Rechnitz, G.A. (2000), Electroanal., 12, 343.

332. Guascito, M.R., Malitesta, C., Mazzota, E., & Turco, A., Sens. Actuat. B, (2008) 131, 394.

333. de Luca, S., Florescu, M., Ghica, M.E., Lupu, A., Palleschi, G., Brett, C.M.A., & Compagnone, D. (2005). Talanta, 68, 171.

334. Courjean, O., & Mano, N.(2011). J. Biotechnol., 151, 122.

335. Ghica, M.E., & Brett, C.M.A. (2008). Microchim. Acta 163, 185.

336. Samphao, A., Rerkchai, H., Jitcharoen, J., Nacapricha, D., & Kalcher, K. (2012). Int. J. Electrochem. Sci., 7, 1001.

337. Jian-Xiao, L., Jiang-Min, X., Lin, T., & Guang-Ming, Z. (2009) Trans. Nonferrous Met. Soc. Chin., 19, 235.

338. E.C. Toren, F.J. Burger, Microchim. Acta (1968) 538-545.

339. Gayet, J.-C., Haouz, A., Geloso-Meyer, A., & Burstein, C. (1993). Biosens. Bioelectron. 8, 177.

340. Stoytcheva, M. (2002). Electroanal., 14, 923.

341. Dixon, M. (1953). Biochem. J., 55. 170.

342. Cornish-Bowden, A. (1974). Biochem. J., 137, 143.

343. Shaolin, M., & Jinqing, K. (1995). Electrochim. Acta. 40, 241.

344. Han, S., Fennouh, S., Casimiri, V., Geloso-Meyer, A., & Burstein, C. (1998). Biosens. Bioelectron., 13, 903.

345. Arduini, F., Amine, A., Moscone, D., & Palleschi, G. (2009). Anal. Lett., 42, 1258.

346. Narli, I., Kiralp, S., &Toppare, L. (2006). Anal. Chim. Acta, 572, 25.

347. Zhylyak, G.A., Dzyadevich, S.V., Korpan, Y.I., Soldatkin, A.P., & El´skaya, A.V. (1995). Sens. Actuat. B, 24, 145.