UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL

*Desenvolvimento de biossensores enzimáticos
amperométricos para a determinação de
compostos de importância clínica.*

Pablo Alejandro Fiorito

Tese apresentada ao Instituto
de Química, da Universidade
de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do
título de Doutor em Química

ORIENTADORA: *Prof. Dra. Susana Inés Córdoba de Torresi*

São Paulo – novembro de 2005

511.34
F501d

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011194

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Fiorito, Pablo Alejandro

F521d Desenvolvimento de biossensores enzimáticos amperométricos
para a determinação de compostos de importância clínica / Pablo
Alejandro Fiorito. -- São Paulo, 2005.
150p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Torresi, Susana Inés Córdoba de

1. Eléctrodo : Físico-química 2. Biossensores : Instrumentação :
Manufatura I. T. II. Torresi, Susana Inés Córdoba de, orientador.

541.37 CDD

“Desenvolvimento de biossensores enzimáticos amperométricos para a determinação de compostos de importância clínica”

PABLO ALEJANDRO FIORITO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química – Área: Físico-Química.

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. SUSANA INÉS CÓRDOBA DE TORRESI
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. RENATO SANCHES FREIRE
IQ – USP

Prof. Dr. ORLANDO FATIBELLO FILHO
UFSCar

Prof. Dr. LAURO TATSUO KUBOTA
IQ – UNICAMP

Profa. Dra. HIDEKO YAMANAKA
IQ – UNESP – Araraquara

SÃO PAULO
29 DE NOVEMBRO 2005

T
541,32
F501d

A meus pais Aldo e Mirta

A meu irmão Sebastian

A minha esposa Nora

Pelo amor e incentivo

Dedico

Agradecimentos

À minha chefe, orientadora, professora, mentora e amiga, Profa. Dra. Susana Inês Córdoba de Torresi, pela oportunidade, ensinamentos e excelente convívio ao longo de todos estes anos;

Ao Prof. Dr. Roberto Torresi, pela amizade e os ensinamentos transmitidos;

Ao Eduardo, pela aquisição das imagens de microscopia eletrônica;

Aos colegas do Laboratório de Materiais Eletroativos, pela agradável convivência;

Aos funcionários do IQ-USP;

À agência financiadora FAPESP, sem a qual este trabalho não poderia ser realizado.

Índice

Agradecimentos	ii
Índice	iii
Resumo	v
Abstract	vi
INTRODUÇÃO	1
1.1 - Introdução geral	1
1.2 - Azul da Prússia e análogos	9
1.3 - Biossensores para oxalato e para glicose	13
1.4 - Nanopartículas e biossensores	16
1.5 – Objetivos	22
PARTE EXPERIMENTAL	23
2.1 - Materiais	23
2.2 - Eletrodeposição do azul da Prússia (AP)	24
2.3 - Imobilização da enzima oxalato oxidase	25
2.4 - Deposição da poli(anilina-sulfonada) (SPAN)	25
2.5 - Deposição dos filmes automontados	25
2.6 - Hexacianoferrato de níquel (HCNFeNi) e híbrido hexacianoferrato de níquel/polipirrol (HCNFeCu/PPy)	26
2.7 - Hexacianoferrato de cobre (HCNFeCu) e híbrido hexacianoferrato de cobre/polipirrol (HCNFeCu/PPy)	26
2.8 – Síntese das nanopartículas de azul da Prússia	27
2.9 - Técnicas e instrumentação	28
2.10 - Eletrodos	29
RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
3.1 - Biossensores para oxalato. Imobilização de oxalato oxidase em eletrodos de platina	30
3.1.1 - Desempenho analítico	30
3.1.2 - Dependência do potencial aplicado	32

3.1.3 - Efeito do pH	33
3.1.4 - Estudo dos interferentes	34
3.2 - Biossensores para oxalato com azul da Prússia	37
3.2.1 - Azul da Prússia	37
3.2.2 - Biossensor para oxalato. Sistema CV/AP/SPAN	41
3.2.3 - Influência do potencial de trabalho	43
3.2.4 - Comportamento do sensor com azul da Prússia frente aos interferentes	44
3.2.5 - Influência do valor de pH no desempenho do sensor com azul da Prússia	50
3.3 - Hexacianoferrato de níquel	54
3.3.1 - Deposição do filme	54
3.3.2 - Comportamento eletroquímico	55
3.3.3 - Detecção de H ₂ O ₂	58
3.4 - Composto híbrido HCNFeNi/polipirrol	61
3.4.1 - Eletrodeposição	61
3.4.2 - Propriedades eletrocatalíticas do HCNFeNi/PPy	63
3.4.3 - Eletroatividade do polipirrol vs desempenho analítico	66
3.4.4 - Estrutura do híbrido HCNFeNi/PPy	72
3.4.5 - Biossensor para oxalato baseado em HCNFeNi/PPy	76
3.5 - Compósito híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre (PPy/HCNFeCu)	79
3.5.1 - Síntese eletroquímica	79
3.5.2 - Detecção de H ₂ O ₂	82
3.5.2 – Eletroatividade do polipirrol vs desempenho analítico	87
3.5.3 - Biossensor de glicose baseado no híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre	87
3.6 - Filmes automontados	92
3.6.1 - Filmes automontados em eletrodos de ITO modificados com Azul da Prússia	96
3.6.2 - Estudo dos interferentes	97
3.6.3 - Influência do número de bicamadas no desempenho analítico	99
3.6.4 - Estabilidade	100
3.7 - Nanopartículas de azul da Prússia	102
3.7.1 - Síntese sem ultra som	102
3.7.1.1 - Síntese	102
3.7.1.2 - Imobilização das partículas de azul da Prússia	106
3.7.1.3 - Detecção de H ₂ O ₂	114
3.7.2 - Síntese com ultra som	115
3.7.2.1 – Síntese das nanopartículas	115
3.7.2.2 - Imobilização das nanopartículas	119
3.7.2.3 - Comportamento eletroquímico	120
3.7.2.4 - Detecção de H ₂ O ₂	121
3.7.2.5 - Imobilização por casting	123
CONCLUSÕES	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
CURRICULUM VITAE	146

Resumo

Este trabalho descreve a preparação e caracterização de eletrodos modificados com azul da Prússia e materiais relacionados e a sua aplicação na construção de biossensores enzimáticos amperométricos para a detecção de oxalato e de glicose.

Os materiais utilizados na modificação dos eletrodos foram azul da Prússia e compostos híbridos formados por hexacianoferrato de níquel e polipirrol ou hexacianoferrato de cobre e polipirrol. Os materiais híbridos mostraram-se capazes de mediar na eletroredução de peróxido de hidrogênio, mesmo em eletrólitos contendo Na^+ , apresentando melhor desempenho analítico quando comparados aos respectivos hexacianoferratos sem a presença do polímero condutor. Estes materiais foram utilizados com êxito na construção de biossensores para oxalato e para glicose, imobilizando as enzimas Oxalato Oxidase e Glicose Oxidase, respectivamente.

Também foi estudada a preparação de um biossensor para a detecção de glicose utilizando a técnica de automontagem eletrostática camada por camada. Esta técnica permite otimizar o processo de imobilização da enzima, obtendo excelente desempenho analítico com pouca quantidade de enzima.

Finalmente, são apresentadas a síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de azul da Prússia na determinação de peróxido de hidrogênio. Foi possível preparar nanopartículas com um diâmetro médio de 5 nm, as quais foram imobilizadas em eletrodos mediante a técnica de automontagem eletrostática camada por camada, a fim de estudar seu comportamento eletroquímico.

Abstract

This work describes the preparation and characterization of modified electrodes with Prussian blue and some analogues and their application in the development of amperometric enzymatic biosensors for the detection of glucose and oxalate.

The materials used in electrode modification were Prussian blue and hybrid compounds, formed by nickel hexacyanoferrate and polypyrrole or copper hexacyanoferrate and polypyrrole. These materials were able to mediate the hydrogen peroxide electroreduction even in electrolytes containing Na^+ , showing better analytical performance than the hexacyanoferrates without polypyrrole. These materials were successfully used to build up oxalate and glucose biosensors.

We also have studied the preparation of glucose biosensors using the layer by layer self assemble technique (LBL), which has optimized the enzyme immobilization process, obtaining good analytical performances even loading small amounts of enzyme.

Finally, we have described the synthesis and characterization of Prussian blue nanoparticles by a sonochemical method. It was possible to synthesize nanoparticles with a diameter around 5 nm, which were immobilized by the LBL technique, in order to study their electrochemical behavior.

1.1 - Introdução geral

Nos últimos anos, tem havido um aumento remarcável de trabalhos na área de desenvolvimento de biossensores, com aplicações nas mais variadas áreas. O interesse neste campo é evidenciado pela grande quantidade de artigos publicados nos últimos anos. Em diversas áreas, tais como química ambiental, controle de qualidade, análises clínicas, indústrias de alimentos, etc., surgiu a necessidade de processos de monitoramento sensíveis, precisos, e que permitam a determinação de substâncias em matrizes complexas, fato que estimulou o interesse na pesquisa e desenvolvimento de novos sensores. Este estímulo é devido tanto pela necessidade de desenvolver novos dispositivos com a capacidade de medir novos parâmetros, como pela necessidade de prover melhoras no desempenho de sensores já existentes.

Um sensor químico é definido como um dispositivo que transforma informações químicas ou bioquímicas em um sinal analítico¹. A informação codificada no sensor inclui aspectos qualitativos e quantitativos, ambos originados pela reação química do analito. A definição de sensor químico recomendada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) é um dispositivo formado por dois componentes básicos, um receptor (também denominado elemento de reconhecimento) e um transdutor físico-químico². Entretanto, outros componentes do sensor envolvidos no processo de geração do sinal

(amplificador, processador e sistema de exibição dos dados, esquematizados na Fig. 1) são igualmente importantes.

Figura 1: Representação esquemática do funcionamento de um biossensor, envolvendo o reconhecimento do analito, a transdução e o processamento do sinal.

O termo biossensor apareceu na literatura científica no final da década dos 70, embora o conceito básico e até a sua comercialização começou alguns anos antes. O primeiro biossensor foi um dispositivo para a análise de glicose, desenvolvido por Clark e Lyons³ no ano 1962 e comercializado a partir de 1975 pela “Yellow Springs Instrument Company”. Este biossensor foi denominado “enzyme electrode” e consistia na enzima glicose oxidase acoplada a um eletrodo para a determinação de oxigênio. Como consequência da reação entre a enzima e a glicose ocorre uma diminuição da concentração de O₂ dissolvido na amostra, a qual é detectada pelo eletrodo, proporcional à concentração de glicose na amostra. Nos anos subsequentes foram desenvolvidos eletrodos enzimáticos

para a detecção e quantificação de diferentes tipos de substâncias de interesse clínico mediante a combinação de enzimas apropriadas com sensores eletroquímicos.

O termo biossensor começou a ser utilizado a partir de 1977⁴, quando foi desenvolvido o primeiro dispositivo utilizando microorganismos vivos imobilizados na superfície de um eletrodo sensível a amônio. O dispositivo, que era utilizado para a detecção do aminoácido arginina, foi denominado por seus criadores “sensor bio-seletivo”. Posteriormente começaram a utilizar a palavra “biossensor”, termo que permanece até a atualidade, para designar a união entre um material biológico e um transdutor físico. A partir deste momento, o desenho e as aplicações dos biossensores em diferentes campos da química analítica continuaram crescendo. Em um biossensor, o elemento de reconhecimento molecular é um elemento de origem biológica, entre os quais podemos citar enzimas, fragmentos de ADN, anticorpos, organelas e até organismos vivos.

Os biossensores podem ser classificados em função do tipo de interação que se estabelece entre o elemento de reconhecimento e o analito, o método utilizado para detectar dita interação, a natureza do elemento de reconhecimento ou do sistema de transdução. Esta categorização está resumida na Tabela 1.

Tabela 1: *Crterios de classificao dos biossensores*

Tipo de interação	Detecc��o da interação
<ul style="list-style-type: none">• Biocatal�tica• Bioafinidade	<ul style="list-style-type: none">• Direta• Indireta
Elemento de reconhecimento	Sistema de transdução
<ul style="list-style-type: none">• Enzima.• Organela, tecido ou célula• Receptor biológico• Anticorpo• �cidos nucle�icos	<ul style="list-style-type: none">• Eletroquímico• �tico• Piezoelétrico• Termom�trico• Nanomec�nico

Existem mltiplos elementos de reconhecimento e sistemas de transduo. Teoricamente, estes componentes admitem diversas combinaes. Na prtica, a eleio do material biolgico depende das caractersticas do composto a analisar. A eleio do transdutor est condicionada pelo tipo de elemento de reconhecimento utilizado, j que este determina quais sero as variaes das propriedades fisico-qumicas que ocorrero como consequncia da interao. O transdutor dever cumprir com os seguintes requisitos: ser especfico ao analito de interesse e responder no intervalo apropriado de concentrao, possuir tempo de resposta rpido (1 a 60 s), ser facilmente adaptvel a dispositivos miniaturizados, ter capacidade de suportar mudanas no meio tais como temperatura e pH e, principalmente, poder ser utilizado em aplicaes prticas.

Entre os transdutores ticos podemos citar as fibras ticas^{5, 6} e as guias de onda⁷⁻¹⁰, os quais medem variaes em transmitncia, absorvncia, fluorescncia ou refletncia dos biocomponentes imobilizados nas suas superfcies.

Os transdutores eletroquímicos transformam o sinal produzido pela interação entre o sistema de reconhecimento e o analito num sinal elétrico, proporcionando informação analítica quantitativa. Podem ser subdivididos em potenciométricos, amperométricos, condutimétricos ou transistores de efeito de campo (FET).

Os eletrodos potenciométricos operam em condições de equilíbrio. Tipicamente, uma enzima ou um fragmento de tecido é imobilizado na superfície de um eletrodo (de pH, carbono vítreo, platina, eletrodo para a detecção de gases ou um óxido), onde o produto formado como consequência do evento de reconhecimento molecular é monitorado como uma diferença de potencial, usualmente relativo a um eletrodo de calomelanos ou prata-cloreto de prata. O tempo de resposta de um biossensor potenciométrico está diretamente relacionado com a espessura da membrana enzimática sobre o transdutor. O tempo necessário para atingir o equilíbrio pode variar entre 1 e 15 minutos, chegando em alguns casos a ser ainda maior¹¹⁻¹⁵.

Nos biossensores amperométricos é observada uma corrente elétrica quando as espécies são eletroquimicamente oxidadas ou reduzidas. A Magnitude da corrente produzida é diretamente proporcional à concentração da espécie eletroativa que está sendo medida. Neste tipo de arquitetura são utilizadas enzimas que produzem ou consomem espécies eletroativas, tais como H_2O_2 , O_2 ou $NADH$ ^{16, 17}. Entre as enzimas disponíveis comercialmente, as mais utilizadas são as oxidoreduktases, que são enzimas muito estáveis e catalisam fenômenos de oxidação ou redução utilizando oxigênio ou cofatores. Por ex., no caso da glicose oxidase (E.C. 1.1.3.4) e da oxalato oxidase (E.C. 1.2.3.4), é formado H_2O_2 durante a oxidação da glicose ou do oxalato, respectivamente. O H_2O_2 formado durante a reação enzimática pode ser detectado eletroquimicamente, aplicando uma diferença de potencial entre o transdutor (eletrodo de trabalho) e um eletrodo de referência, levando à

oxidação ou redução do H_2O_2 , produzindo uma corrente que será proporcional à concentração do analito. O tempo de resposta para um biossensor amperométrico pode ser da ordem de segundos.

Os biossensores com transdução condutimétrica aproveitam o fato de algumas enzimas produzir compostos iônicos a partir de compostos neutros, como por ex. a urease, que produz NH_4^+ e HCO_3^- a partir de uréia, com o concomitante aumento na condutividade da solução. Um modelo generalizado de biossensor condutimétrico enzimático consiste em enzimas imobilizadas entre dois eletrodos metálicos (platina ou ouro), entre os quais é monitorada a mudança de condutância quando aplicado um sinal alternado com frequências da ordem dos kHz¹⁸⁻²¹.

Os Transistores de Efeito de Campo (FET) são dispositivos de estado sólido que exibem altos valores de impedância de entrada e baixos valores de impedância de saída. A imobilização de um receptor no FET permite a detecção direta e a amplificação de fenômenos que envolvem a modificação das propriedades da superfície que ocorrem durante o reconhecimento do analito²². Estes "chips" sensores são similares aos utilizados nos microprocessadores, com a diferença que a porta metálica que controla a corrente do transistor é substituída pelo material biológico. O material sensível responde a uma mudança no meio, a resposta exerce um efeito de campo sobre a corrente que circula entre a fonte e o dreno no FET. Usualmente, esta corrente é mantida constante enquanto se registra o potencial necessário para manter essa corrente constante.

Para que um dispositivo possa ser considerado um biossensor, o elemento biológico – responsável pelo reconhecimento molecular – deve estar em íntimo contato com o transdutor, ou seja, imobilizado de maneira adequada sobre a sua superfície. O método de imobilização deve ser compatível com a biomolécula que está sendo imobilizada, a

superfície do sensor ou matriz na qual está sendo imobilizada e com o meio onde o sensor vai ser utilizado. Os antecedentes de imobilização de enzimas se remontam ao ano 1916, quando Nelson e Griffin imobilizaram a enzima invertase em carvão e alumina²³. Eles observaram que a enzima imobilizada conservava sua atividade catalítica e podia ser utilizada por longos períodos de tempo.

Existem vários métodos de imobilização de enzimas, entre os quais podemos citar microencapsulação, formação de ligações covalentes cruzadas, oclusão em gel ou filmes poliméricos, adsorção e, formação de ligações covalentes.

A microencapsulação consiste em prender a enzima sobre o transdutor com uma membrana inerte, como por ex. acetato de celulose, Nafion[®], policarbonato, colágeno ou Teflon[®]. Este foi o primeiro método utilizado na construção de biossensores.

No método da formação de ligações covalentes cruzadas, ou entrecruzamento, são utilizados reagentes multifuncionais²⁴, tais como glutaraldeído e 2-isocianato-4-isotiocianato. Este método se baseia na formação de uma rede polimérica, em decorrência da formação de ligações covalente cruzadas entre as moléculas do agente funcional e da enzima, tal como é esquematizado na Fig. 2.

Figura 2: Ligação cruzada envolvendo a reação entre glutaraldeído e os grupos amina residuais livres de enzimas ²⁵

A adsorção de enzimas é o procedimento de imobilização mais simples. Para tal, a superfície sobre a qual se pretende imobilizar a enzima é mantida em contato com uma solução aquosa da biomolécula para que ocorra a adsorção. A seguir o material é lavado para remover a enzima não adsorvida. A principal vantagem deste método é a sua simplicidade. Entretanto, no processo de adsorção estão envolvidas interações fracas entre as moléculas de enzima e a superfície, tais como forças de Van der Waals, interações dipolo-dipolo e ponte de hidrogênio, motivo pelo qual a natureza reversível do equilíbrio de adsorção pode ser facilmente influenciada por variações de pH, força iônica, hidrofobicidade da superfície e temperatura, dentre outros fatores, levando a uma pobre estabilidade operacional do biossensor. Uma forma de melhorar este aspecto é, uma vez adsorvida a enzima, a utilização de glutaraldeído para a formação de ligações cruzadas.

1.2 - Azul da Prússia e análogos

O Azul da Prússia (AP) é o hexacianoferrato ferroso hidratado. A origem da cor azul do AP deve-se à transição eletrônica entre os íons Fe^{2+} de baixo spin, coordenados a átomos de carbono, e os íons Fe^{3+} de alto spin, coordenados a átomos de nitrogênio, com um máximo de absorção em torno de 680nm.

Figura 3: Célula unitária da estrutura cristalina do AP.

A célula unitária do AP cristalino possui uma simetria cúbica hexagonal compacta²⁶ (Fig. 3), onde os átomos de Fe(III) ocupam os vértices e os centros das faces do cubo, todos eles coordenados a átomos de nitrogênio provenientes do íon cianeto. O grupo hexacianoferrato, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, ocupa os centros das arestas e a posição central do cubo. As moléculas de água completam a esfera de coordenação dos átomos de Fe(III). Ao longo da estrutura, encontra-se uma série de vacâncias aleatórias na célula unitária provocadas pela distribuição não estatística das mesmas e à inclusão de cátions na estrutura do polímero inorgânico. Estes íons provêm dos produtos de partida utilizados no processo de síntese do AP.

Os depósitos eletroquímicos de AP têm sido amplamente estudados nos últimos anos devido as suas interessantes propriedades eletroquímicas e eletrocromáticas²⁷⁻³⁰. Estudos de difração de raios X e de nêutrons têm revelado uma estrutura zeolítica, com canais com um diâmetro aproximado de 3,2 Å^{26, 30}. Estes canais são o caminho pelo qual se produz o movimento de solvente e de íons através do filme eletroativo²⁹.

Os filmes de AP apresentam duas formas diferentes em função de seu conteúdo de íons potássio; o AP insolúvel, Fe₄[Fe(CN)₆]₃, e o AP solúvel, KFe[Fe(CN)₆]. Esta classificação está relacionada unicamente com a incorporação dos íons potássio na estrutura do AP, não tendo nenhuma relação com a verdadeira solubilidade do material, uma vez que ambas as estruturas são essencialmente insolúveis em água.

Quando se aplica um potencial da ordem de +0,4 V vs. Ag/AgCl num eletrodo mergulhado em uma solução aquosa (meio ácido, uma vez que em meio alcalino ocorre a hidrólise do filme) contendo íons Fe³⁺ e [Fe(CN)₆]³⁻, se observa a formação do filme de AP na superfície do eletrodo. Desta maneira, na presença de [Fe(CN)₆]⁴⁻ (formado *in-situ*) e íons Fe³⁺, há a formação do filme de azul da Prússia na superfície do eletrodo.

O AP apresenta três estados de oxidação, os quais se diferenciam pela sua cor. Assim, o estado de oxidação mais reduzido é conhecido como branco da Prússia (BP) e é incolor, enquanto que o estado de oxidação intermediário é o próprio Azul da Prússia. O estado de máxima oxidação é conhecido como verde de Berlim.

A redução do AP num eletrólito aquoso contendo cloreto de potássio pode expressar-se mediante a seguinte reação eletroquímica reversível²⁹:

Por outro lado, o AP insolúvel se transforma em AP solúvel mediante a ciclagem voltamétrica em solução de cloreto de potássio. O processo de redução de AP solúvel a BP solúvel está representado na Eq. 2:

O transporte eletrônico através dos filmes de AP pode ser descrito mediante o mecanismo conhecido como “electron hopping”. Feldman y Murray ³¹ postularam que a etapa determinante da velocidade de transferência eletrônica é o salto dos elétrons entre átomos de ferro contíguos, sendo independente da natureza do contra-íon. Por outro lado, Crumbliss e col. ³² e Vicente e col. ^{33, 34}, sugeriram que a cinética eletrônica está controlada pela transferência eletrônica ou pela difusão dos íons através do sistema, dependendo das condições experimentais.

Contudo, a característica que torna o azul da Prússia de interesse na construção de biossensores amperométricos enzimáticos é a sua capacidade de catalisar a eletro-redução do H₂O₂, possibilitando sua detecção seletiva em baixos potenciais. Este fato permite contornar a principal desvantagem dos biossensores amperométricos, isto é, a interferência produzida pela descarga não seletiva de materiais redutores sobre o eletrodo, tais como ascorbato, urato e paracetamol. O BP apresenta atividade catalítica para a redução de peróxido de hidrogênio em meio ácido; atuando como um mediador para a redução do peróxido de hidrogênio gerado durante o curso da reação enzimática ³⁵. Desde que este processo eletrocatalítico ocorre a um potencial da ordem de -0,0 V vs. Ag/AgCl, é possível eliminar a influência de espécies interferentes citadas anteriormente. Na Fig. 4 é apresentada

uma representação esquemática do funcionamento de um biossensor amperométrico enzimático baseado na detecção do H_2O_2 mediada por AP.

Figura 4: Representação esquemática de um biossensor amperométrico enzimático baseado na detecção de H_2O_2 mediada por azul da Prússia.

Entretanto, a utilização do azul da Prússia apresenta uma severa limitação, devido à sua incapacidade de mediar na eletroredução do peróxido de hidrogênio na presença de cátions Na^+ ³⁶. Este é um problema grave quando se pretende aplicar o azul da Prússia na construção de biossensores para a detecção de diferentes metabolitos em amostras clínicas, onde o Na^+ está normalmente presente. Esta incapacidade pode ser explicada a partir do mecanismo de oxido-redução e da estrutura do azul da Prússia. As reações de oxidação e de redução do azul da Prússia são possíveis devido à estrutura zeolítica que permite o fluxo de cátions através dos canais e buracos do sólido. Esse fluxo de cátions é necessário para a compensação de cargas durante os processos de oxidação e redução, como foi mostrado na Eq. 2.

A perda de eletroatividade do AP em eletrólitos contendo Na^+ pode ser explicada em função dos raios dos íons hidratados. Os raios calculados para Na^+ e K^+ são 1,83 e 1,25 Å respectivamente. Portanto, os íons Na^+ hidratados não podem atuar na compensação de cargas durante os processos de oxidação e redução, uma vez que não podem penetrar na estrutura do azul da Prússia devido a que, tal como dito anteriormente, o diâmetro dos canais na estrutura zeolítica do AP é de aproximadamente 3,2 Å.

Este problema pode ser contornado com a utilização de análogos do AP na construção de biossensores amperométricos, tais como hexacianoferrato de níquel, hexacianoferrato de cobre e hexacianoferrato de cobalto. Estes compostos não só apresentam eletroatividade em eletrólitos contendo K^+ , como assim também em eletrólitos contendo outros cátions metálicos, tais como Li^+ , Na^+ , Rb^+ e Cs^+ ³⁷⁻³⁹, devido a que suas estruturas, tanto no estado oxidado como no reduzido, são, ao contrario do azul da Prússia, o suficientemente abertas para permitir o fluxo de íons metálicos de diferentes tamanhos.

1.3 - Biossensores para oxalato e para glicose

A determinação de oxalato presente na urina é de importância clínica, uma vez que o excesso deste composto no organismo pode causar sérios transtornos. O oxalato, que pode ser ingerido na dieta ou ser produto final do metabolismo do ácido ascórbico, forma complexos insolúveis com cátions divalentes, levando à formação de cálculos renais ^{40, 41}. A determinação de oxalato também apresenta importância no campo da medicina reprodutiva, uma vez que concentrações elevadas de oxalato presentes em plasma seminal estão associadas a problemas de fertilidade ⁴².

Entre os métodos de determinação de oxalato podemos citar os de titulação e colorimetria ⁴³ e aqueles que requerem aparelhos especializados tais como eletroforese capilar, HPLC ou cromatografia gasosa ⁴⁴⁻⁴⁶. A maioria destas metodologias é complicada e requerem o pré-tratamento das amostras como parte da determinação. A utilização de biossensores enzimáticos é uma boa estratégia para a determinação de oxalato devido à sua seletividade, simplicidade de uso e à possibilidade de trabalhar diretamente sobre as amostras reais, sem a necessidade de pré-tratamento. Neste tipo de sensores a enzima Oxalato Oxidase (OXO) é imobilizada sobre um eletrodo e a transdução é produzida pela oxidação do H₂O₂ formado na reação enzimática.

O crescente interesse em biossensores se vê refletido na enorme quantidade de trabalhos publicados nesta área, embora, encontra-se uma quantidade insuficiente de publicações referidas a biossensores de oxalato, considerando a importância clínica que esse analito apresenta.

Reddy e col. têm reportado a elaboração de eletrodos enzimáticos, imobilizando OXO e monitorando a oxidação do H₂O₂ gerado na reação enzimática ⁴⁷⁻⁴⁹. Nestes casos, a enzima é imobilizada entre duas membranas, onde a membrana interna é permeável só a H₂O₂, evitando a oxidação direta do próprio oxalato sobre o eletrodo e também impedindo que os possíveis interferentes cheguem até o eletrodo. A membrana externa cumpre várias funções, tais como eliminar parte dos interferentes presentes na amostra, como por ex. partículas coloidais e macromoléculas, ou limitando a entrada de analito diminuindo a

concentração de substrato no micro-ambiente da enzima, o que se traduz num incremento do intervalo de linearidade na resposta.

No Brasil, Kubota e colaboradores têm trabalhado em diferentes alternativas para a detecção de oxalato, tais como a construção de um microreator enzimático para a detecção potenciométrica, a utilização de dois reatores enzimáticos em um sistema de análise por injeção em fluxo monitorando espectrofotometricamente o CO_2 formado na reação enzimática e a elaboração de biossensores amperométricos⁵⁰⁻⁵². Os sensores amperométricos de oxalato requerem o monitoramento da corrente de oxidação do H_2O_2 a potenciais elevados, o que causa problemas de interferências como já discutido anteriormente. Recentemente, Kubota e colaboradores⁵² apresentaram uma elegante estratégia para a transdução do sinal, onde imobilizam duas enzimas, Oxalato Oxidase (OXO) e Peroxidase (HRP). A OXO foi imobilizada sobre sílica gel modificada com óxido de Ti (IV) através da formação de ligações cruzadas com glutaraldeído e a HRP foi imobilizada em pó de carbono por ligação covalente utilizando carbodiimida. Neste biossensor, é a HRP quem atua como transdutor: a HRP se oxida ao reduzir o H_2O_2 gerado na reação enzimática, e posteriormente, é reduzida a -100 mV vs SCE, gerando o sinal amperométrico.

No desenvolvimento da presente tese foram estudadas, além dos biossensores para a determinação de oxalato, diferentes arquiteturas para biossensores de glicose. Os biossensores para a determinação de glicose são, de longe, os mais estudados na literatura. Este fenômeno se deve ao fato de que a produção deste tipo de biossensores tornou-se um objetivo comercial primário, uma vez que são utilizados por pacientes diabéticos no controle rotineiro da glicemia. Estudos têm mostrado que o monitoramento contínuo pode reduzir os problemas associados a diabetes. A simplicidade de uso deste tipo de sensores, que podem ser operados pelo próprio paciente, é a principal causa do seu êxito comercial.

Por outro lado, a maioria dos biossensores para a determinação de glicose é baseada na imobilização da enzima Glicose Oxidase. A possibilidade de utilizar esta enzima apresenta um atrativo adicional, uma vez que se trata de uma enzima relativamente barata e muito robusta. Este fato a torna de interesse no estudo de novas arquiteturas que, uma vez definidas e testadas, podem ser adaptadas a outras enzimas mais difíceis de manipular.

1.4 - Nanopartículas e biossensores

O surgimento da nanotecnologia tem criado novas possibilidades no campo do desenvolvimento de sensores e biossensores. Em particular, as nanopartículas tem despertado interesse, tanto na sua aplicação em sensores como em outras diversas áreas, devido a que apresentam um comportamento único, mostrando propriedades eletrônicas ⁵³, óticas ⁵⁴⁻⁵⁷ e catalíticas ⁵⁸⁻⁶⁰ que não são exibidas pelos correspondentes materiais massivos. Historicamente, a maioria dos estudos de materiais nanoestruturados na aplicação de sensores se refere a nanopartículas esféricas de ouro ou prata. Mais recentemente, têm surgido trabalhos sobre a aplicação de diversos tipos de nanopartículas na construção de biossensores, tais como o uso de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 para a detecção simultânea de glicose e lactato ⁶¹, nanopartículas de SiO_2 no desenvolvimento de transistores de efeito de campo enzimáticos (ENEFTs) ⁶², a utilização de nanopartículas de polianilina (PANI), sintetizadas utilizando ácido dodecilbenzenosulfônico como dopante, como mediadores não-difusionais em biossensores enzimáticos amperométricos baseados em oxidases ⁶³.

Um excelente candidato para aplicações no desenvolvimento de biossensores é o azul da Prússia nanoparticulado. Como discutido anteriormente, o azul da Prússia foi utilizado com êxito como mediador em biossensores enzimáticos amperométricos. Além disso, as propriedades de troca iônica do AP tornam-o um candidato para sensores potenciométricos.

Na literatura existem alguns trabalhos sobre a síntese de nanopartículas de azul da Prússia com tamanhos em torno aos 5 nm. Podemos citar, por exemplo, o trabalho realizado por Dominguez-Vera e col., que utilizam a apoferritina como molde nanométrico para a síntese do azul da Prússia nanoparticulado ⁶⁴. A apoferritina é uma proteína com forma esférica, composta por 24 subunidades circundando uma cavidade aquosa de aproximadamente 8 nm de diâmetro. Os autores utilizaram as cavidades de apoferritina como nanorreatores para a síntese de azul da Prússia, obtendo nanopartículas com uma distribuição de tamanho entre 3,5 e 8 nm. Os autores também identificaram partículas cúbicas de maior tamanho (aprox. 60 nm) o que sugere que também deve ocorrer a formação de azul da Prússia fora das cavidades de ferritina.

Figura 5: Representação esquemática da síntese de nanopartículas de azul da Prússia utilizando apoferritina como molde. Esta figura foi adaptada da referência ⁶⁴.

Um outro procedimento citado na literatura é a síntese de nanopartículas de azul da Prússia controlada por poli(vinilpirrolidona) (PVP) ⁶⁵. Para isso, os autores misturaram quantidades equimolares de FeCl_2 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ na presença de 200 nmol L^{-1} de PVP. O procedimento resultou em nanopartículas com um diâmetro médio de 16 nm. O PVP desempenha uma dupla função, o grupo amida se coordena a um íon Fe, dando lugar ao início da nucleação, e as moléculas de PVP acabam estabilizando as nanopartículas de azul da Prússia, formando uma espécie de camada externa, tal como mostrado na Fig. 6.

Figura 6: Formação de nanopartículas de AP protegidas por poli(vinilpirrolidona). Figura adaptada da referência ⁶⁵.

Contudo, nenhum dos trabalhos citados acima utiliza as nanopartículas de azul da Prússia na construção de sensores ou biossensores, fato que nos encorajou a investir tempo e esforço na síntese, caracterização e imobilização de nanopartículas de azul da Prússia, visando aplicações na área de biossensores.

O nosso interesse na diminuição do tamanho radica fundamentalmente em duas razões: por um lado, essa diminuição permitiria obter uma maior área efetiva e conseqüentemente um melhor rendimento na detecção do H_2O_2 ; por outro lado, investigar se a diminuição no tamanho das partículas influencia de alguma maneira as propriedades eletrocatalíticas do azul da Prússia, como acontece, por exemplo, com o ouro. É sabido que o ouro possui uma atividade catalítica muito menor que outros metais de transição. Entretanto, quando o ouro é depositado sobre diferentes substratos na forma de nanopartículas, exibe uma extraordinária capacidade na catálise a baixas temperaturas de reações de combustão, hidrogenação parcial de hidrocarbonetos e de redução de óxidos de nitrogênio¹⁰⁶. As propriedades catalíticas das nanopartículas de ouro dependem

marcadamente do tamanho das mesmas, por exemplo, a atividade para a oxidação de CO a baixas temperaturas manifesta um marcado incremento quando o diâmetro das nanopartículas é menor que 3,5 nm¹⁰⁷.

Para a obtenção de nanopartículas com tamanho reduzido e com boa distribuição de tamanhos o principal evento físico necessário é formação de uma cavidade de dimensões nanométricas, onde possa ser sintetizado o azul da Prússia. Os materiais utilizados para a formação dessa cavidade também jogam um papel fundamental na estabilização das nanopartículas. Desde o ponto de vista da construção de biossensores, onde é necessário o intercâmbio de elétrons entre as nanopartículas, este fato pode significar uma séria desvantagem na hora de realizar experimentos eletroquímicos. Frente a este panorama surge a pergunta: existe alguma metodologia que permita a formação das cavidades necessárias para a síntese de nanopartículas sem a utilização de nenhum tipo de estabilizante? A resposta é sim, a sonoquímica.

A sonoquímica é a área de pesquisa que estuda as reações químicas quando as moléculas são submetidas a radiação de ultra-som (20 KHz-10 MHz)¹⁰⁸. O fenômeno físico responsável pelos processos sonoquímicos é a cavitação acústica. Existem várias teorias acerca do efeito da radiação ultrassônica nos processos sonoquímicos; entretanto todas coincidem em que o principal evento é a criação, crescimento e colapso de bolhas formadas no líquido¹⁰⁹.

A primeira pergunta é como se formam as bolhas, uma vez que é conhecido o fato que para separar duas moléculas de água a uma distância correspondente a dois raios de Van-der-Waals se requer uma potência de 10^5 W cm^{-1} . Então, por que em um banho de ultra-som com uma potência de $0,3 \text{ W cm}^{-1}$ não só se formam estas bolhas, senão que a água pode ser convertida a H_2O_2 ? Diferentes explicações têm sido dadas, todas baseadas na

existência de pequenas partículas ou de bolhas de gás que diminuem as forças intermoleculares, permitindo a formação das bolhas.

A segunda etapa do processo é o crescimento das bolhas, que ocorre através da difusão de vapor do soluto até o interior da bolha. Durante o colapso da bolha são produzidas temperaturas extremamente elevadas (entre 5000 e 25000 K)¹¹⁰. O colapso ocorre em tempos muito curtos (na ordem de nanossegundos), razão pela que altíssimas taxas de resfriamento (10^{11} K s^{-1}) são obtidas, provocando a organização e cristalização dos produtos. Por esta razão, em todos os casos que são utilizados precursores voláteis, onde reações de fase gasosa são predominantes, são obtidas nanopartículas amorfas. Enquanto a formação de nanoestruturas amorfas é bem compreendida, o mecanismo que dá lugar a nanopartículas cristalinas não é muito claro. Uma explicação é que a rápida cinética não permite o crescimento do núcleo. Além disso, quando os precursores são substâncias não voláteis, a reação ocorre na periferia da bolha em colapso, a uma distância de aproximadamente 200 nm, ou seja, em fase líquida¹⁰⁹.

Embora o mecanismo da formação de nanopartículas por aplicação de ultra-som ainda seja um tema de debate uma coisa é certa, na maioria dos casos em que reações sonoquímicas são utilizadas para produzir compostos inorgânicos, o produto é uma nanoestrutura.

A sonoquímica foi utilizada para a síntese de diferentes tipos de nanopartículas. Nanopartículas de metais tais como Fe¹¹¹, Ni¹¹² e Co¹¹³, ligas metálicas nanoestruturadas¹¹⁴ (por ex. Fe/Co), óxidos de metais de transição¹¹⁵ e nanopartículas de hidróxidos (por ex α -hidróxido de níquel)¹¹⁶ são só alguns exemplos da larga lista de compostos nanoestruturados sintetizados com procedimentos sonoquímicos. Entretanto, não existe na literatura nenhuma

referencia à síntese sonoquímica de nanopartículas de azul da Prússia, fato este que nos encorajou ainda mais a utilizar este tipo de metodologia. Para isso, utilizamos o método de Liu e col. porém colocando o becker de reação num banho ultrassônico¹¹⁷.

1.5 – Objetivos

O presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento e caracterização de novos materiais que possam ser utilizados como mediadores na construção de biossensores enzimáticos amperométricos, visando a construção de biossensores para a detecção de glicose e oxalato. Os biossensores serão avaliados quanto a seu desempenho analítico, estudando sua sensibilidade, seletividade e estabilidade. Também serão estudadas a síntese e caracterização de nanopartículas de azul da Prússia assim como também a imobilização de enzimas por automontagem eletrostática camada por camada (LBL).

2.1 - Materiais

Materiais	Procedência
Oxalato oxidase (E.C. 1.2.3.4), 0,72 U mg ⁻¹	Sigma
Glicose oxidase (E.C. 1.1.3.4), 162.000 U mg ⁻¹	Sigma
Anilina	Sigma
Pirrol	Sigma
Ácido metanílico	Sigma
Ácido ascórbico	Sigma
Ácido úrico	Sigma
Acetominofenol	Sigma
Glutaraldeido	Fluka
Ferricianeto de potássio	Synth
Cloreto de ferro(III)	Synth
Hidróxido de sódio	Synth
Hidróxido de potássio	Synth
Ácido clorídrico	Synth
Cloreto de Potássio	Synth
Cloreto de sódio	Synth
Fosfato dibásico de potássio	Synth
Cloreto de cobre	Synth
Cloreto de níquel	Synth
Oxalato	Synth
Glicose	Synth
Ácido succínico	Synth
Nafion (sol. Alcoólica 25 % v/v)	Aldrich

Materiais	Procedência
Peróxido de hidrogênio, 30%	Sigma
Poli(hidrocloreto de alilamina) (PAH)	Sigma
Ácido cítrico	Synth

Todos os reagentes foram utilizados tal como recebidos, afora o pirrol e a anilina, que foram destilados antes da sua utilização. Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultra- pura (Elga System UHQ, $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). As soluções de glicose permaneceram em repouso por uma noite antes da sua utilização, para se alcançar o equilíbrio mutarrotacional.

2.2 - Eletrodeposição do azul da Prússia (AP)

O AP foi depositado potencioestaticamente, aplicando-se 0,4 V (vs Ag/AgCl) a um eletrodo submerso numa solução contendo: $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de FeCl_3 , $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl. Após a deposição, o filme de azul da Prússia foi ativado em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ciclando entre $-0,2$ e $0,6 \text{ V}$, durante 50 ciclos.

2.3 - Imobilização da enzima oxalato oxidase

A enzima oxalato oxidase foi imobilizada com glutaraldeído; para isso colocou-se 6 μL de solução de enzima ($2,4 \text{ mg mL}^{-1}$), seguidos de 3 μL de solução de glutaraldeído (2,5%). O eletrodo foi deixado a temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente.

2.4 - Deposição da poli(anilina-sulfonada) (SPAN)

A polianilina “auto-dopada” foi depositada potenciodinamicamente sobre um eletrodo de platina, por varreduras lineares de potencial entre 0,2 - 0,9 V (exceto para o primeiro ciclo onde o potencial final foi de 1,0 V) a uma velocidade de 50 mV s^{-1} em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, contendo $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de anilina e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido metanílico.

2.5 - Deposição dos filmes automontados

Para a imobilização da enzima glicose oxidase pelo método de automontagem eletrostática camada por camada (LBL) utilizou-se com substrato um eletrodo de óxido de estanho dopado com índio (ITO) modificado com azul da Prússia.

Os filmes foram preparados mergulhando os eletrodos alternativamente em soluções $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ do polieletrólito catiônico poli(hidrocloreto de alilamina) (PAH) e glicose oxidase, ambas a pH 7. Os substratos foram mantidos 4 minutos em cada solução (começando com o polication). Logo após a deposição de cada camada, o eletrodo foi imerso em tampão fosfato (pH 7), sob agitação, durante 1 minuto e seco com N_2 .

2.6 - Hexacianoferrato de níquel (HCNFeNi) e híbrido hexacianoferrato de níquel/polipirrol (HCNFeCu/PPy)

Os filmes de HCNFeNi foram depositados sobre carbono vítreo por voltametria cíclica (10 ciclos). Para este fim, os eletrodos foram submersos na solução modificadora ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5,0 mmol L⁻¹ + FeCl_3 5,0 mmol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹ + HCl 0,1 mol L⁻¹) e ciclados entre -0,3 e 0,9 V (vs Ag/AgCl) a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Para a deposição do híbrido de hexacianoferrato de níquel e polipirrol foi utilizado o mesmo procedimento que para a deposição do HCNFeNi, porém adicionando-se ao eletrólito 0,5 mmol L⁻¹ de pirrol.

2.7 - Hexacianoferrato de cobre (HCNFeCu) e híbrido hexacianoferrato de cobre/polipirrol (HCNFeCu/PPy)

O hexacianoferrato de cobre foi sintetizado por voltametria cíclica, ciclando um eletrodo de carbono vítreo entre -0,3 e 0,9 V, num eletrólito contendo $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ + CuCl_2 $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹, a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Já o composto híbrido, foi sintetizado com um procedimento envolvendo duas etapas. A primeira etapa consiste em formar um filme de polipirrol dopado com ferrocianeto por voltametria cíclica, ciclando o eletrodo 10 vezes entre -0,3 e 0,9 V, com uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ em uma célula eletroquímica contendo 20 mL de solução aquosa de pirrol $1,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹.

A segunda etapa consiste em introduzir os íons Cu^{2+} na matriz do polímero e a subsequente formação do material híbrido. Para tal, o eletrodo modificado com polipirrol dopado com hexacianoferrato é imerso em uma solução de CuCl_2 $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Passadas duas horas, o eletrodo é ciclado no mesmo eletrólito, transferido a uma solução contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ciclado novamente

2.8 – Síntese das nanopartículas de azul da Prússia

As nanopartículas de azul da Prússia foram sintetizadas por duas vias, uma sem e outra com o auxílio do ultra-som. A síntese sem ultra-som foi feita através do seguinte procedimento: 40,0 mL de uma solução, contendo FeCl_3 $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + excesso de H_2O_2 , foi colocada num becker, ao qual foi adicionada lentamente uma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + 40,0 mL de H_2O_2 $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com a ajuda de uma bureta.

A síntese sonoquímica do azul da Prússia foi feita seguindo o seguinte procedimento: a solução I (40,0 mL de FeCl_3 $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + excesso de H_2O_2) foi colocada num banho de ultra-som (aprox. 40 kHz). A solução II (40,0 mL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + excesso de H_2O_2) foi adicionada lentamente à solução I com a ajuda de uma bureta, tal como ilustrado na Fig. 15.

Figura 15: Representação esquemática da síntese de azul da Prússia assistida com ultra-som.

2.9 - Técnicas e instrumentação

Para a caracterização das nanopartículas de azul da Prússia foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X e espectroscopia UV-Vis.

A análise e tratamento de dados de microscopia eletrônica de transmissão foram realizados utilizando um Microscópio Eletrônico de Transmissão de alta resolução (HRTEM-JEM 3010 URP) operando em 300KV com resolução pontual de 0,17 nm. No caso da microscopia eletrônica de varredura, foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Varredura Baixo Vácuo (LV-SEM JSM 5900LV) operando entre de 1KV a 30KV. Todos

os experimentos foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME), situado no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS-Campinas).

As análises de difração de raios X foram obtidas em um difratômetro Siemens D5000, utilizando radiação monocromática de Cu K α (1,5406 Å).

Os espectros eletrônicos no UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453.

Nos experimentos de cronoamperometria, voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizado um potenciostato/galvanostato AUTOLAB mod. PGSTAT 30 com módulo de impedância, comandado pelo software GPES v. 4.9 para as medidas eletroquímicas e pelo FRA v. 4.9 para as medidas de impedância.

2.10 - Eletrodos

No desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados os seguintes eletrodos:

Eletrodos de trabalho: Carbono vítreo (CV), $A = 0,0707 \text{ cm}^2$; platina (Pt), $A = 0,0707 \text{ cm}^2$ e, óxido de estanho dopado com índio (ITO), $A = 1 \text{ cm}^2$.

Eletrodo auxiliar: chapa de platina, $A = 1 \text{ cm}^2$.

Eletrodos de referência: Ag/AgCl_(sat) e calomelanos_(sat).

Em cada seção estão indicados os tipos de eletrodos utilizados.

3.1 - Biossensores para oxalato. Imobilização de oxalato oxidase em eletrodos de platina

3.1.1 - Desempenho analítico

A imobilização da enzima oxalato oxidase sobre eletrodos de platina foi feita de acordo ao procedimento descrito na seção experimental. Para estudar sua resposta frente ao oxalato, o eletrodo foi mergulhado numa solução eletrolítica contendo solução tampão succinato (pH 3,8), polarizado a 0,65 V, fazendo-se adições sucessivas de oxalato de 0,05 mmol L⁻¹. A solução eletrolítica foi mantida sob agitação. Neste caso, o sensor mostrou-se capaz de detectar o oxalato na faixa de concentrações de 0,05 a 0,4 mmol L⁻¹. Na Fig. 7 são mostradas as repostas exibidas pelo sensor, onde podemos observar o tempo de resposta de aproximadamente 8 s, considerado como o tempo transcorrido desde injeção da amostra até a estabilização da resposta amperométrica. Este valor é dependente da velocidade de agitação utilizada durante o experimento, mostrando que o funcionamento do sensor é rápido e o tempo de resposta determinado pela velocidade de homogeneização da amostra.

Figura 7: Resposta típica do biossensor para adições sucessivas de oxalato. Potencial de operação: 0,65 V vs Ag/AgCl_(sat). Meio: tampão succinato (pH 3,8; 0,1 mol L⁻¹)

Na Fig. 8 pode observar-se uma curva analítica obtida com o sensor para concentrações de oxalato variando entre 0,05 e 0,4 mmol L⁻¹, onde o incremento na corrente é causado pela oxidação do H₂O₂ gerado durante a reação enzimática. Nestas condições o sensor mostrou uma sensibilidade de 12,5 μA mmol⁻¹ L cm⁻².

Figura 8: Curva analítica para sensor operando a 0,65 V. vs. Ag/AgCl Sensibilidade: 12,5 μA mmol⁻¹ L cm⁻². Meio: tampão succinato pH 3,8

Também foram feitos ensaios com concentrações maiores de oxalato ($0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ por adição), onde o sensor mostrou-se eficiente até concentrações de 3 mmol L^{-1} , tal como pode ser observado na Fig 9, demonstrando sua capacidade de operação em concentrações maiores. Considerando que o intervalo de concentrações importante desde o ponto de vista clínico varia de $0,05$ a $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$, todos os ensaios posteriores foram realizados dentro deste intervalo de concentrações.

Figura 9: Curva analítica para sensor operando a $0,65 \text{ V}$ vs Ag/AgCl com adições de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de oxalato por injeção.

3.1.2 - Dependência do potencial aplicado

O potencial aplicado tem uma grande influência no desempenho do biossensor, tal como mostra a Fig. 10. A sensibilidade aumenta a medida que o potencial aplicado é mais positivo, chegando a um valor ótimo quando o potencial aplicado é $0,75 \text{ V}$, valor acima do qual diminui.

Figura 10: Dependência da sensibilidade do sensor com o potencial aplicado.

Meio: tampão succinato pH 3,8.

3.1.3 - Efeito do pH

Para estudar o efeito do pH no desempenho do sensor utilizou-se solução tampão succinato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ onde o valor de pH foi ajustado com solução de KOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A escolha do tampão foi realizada considerando que em vários trabalhos citados na literatura utilizam solução tampão succinato para os testes dos biossensores de oxalato.

Como pode ser observado na Fig. 11, o pH para o funcionamento ótimo do sensor foi de 3,8. Esta enzima mostrou-se muito sensível às variações de acidez do meio, não apresentando nenhuma resposta para valores de pH maiores que 5, indicando que o valor do pH do meio é um dos fatores de operação mais importantes. Para todos os experimentos subsequentes foi utilizado tampão succinato pH 3,8.

Figura 11: Dependência da sensibilidade do sensor com o valor de pH. Medidas feitas em tampão succinato; o ajuste do pH foi feito com KOH 0,1 mol L⁻¹. Pot. aplicado: 0,75 V vs Ag/AgCl_(sat)

3.1.4 - Estudo dos interferentes

Devido ao elevado potencial requerido para o funcionamento do sensor, substâncias redutoras presentes nas amostras em estudo podem oxidar-se diretamente sobre o eletrodo, causando interferência positiva na determinação de oxalato. Estudou-se o efeito da adição de ascorbato e urato nas amostras de oxalato sobre o funcionamento do sensor. A Fig. 12(a) exhibe as respostas do sensor para as seguintes soluções: 0,3 mmol L⁻¹ de oxalato; 0,3 mmol L⁻¹ de oxalato + 1 mmol L⁻¹ de ascorbato e 0,3 mmol L⁻¹ de oxalato + 0,1 mmol L⁻¹ de urato. Tal como pode ser observado, ambos os íons geraram interferência positiva na determinação de oxalato.

Figura 12: Estudo dos efeitos causados pelos interferentes ascorbato e urato sobre o desempenho dos biossensores com diferentes arquiteturas: a) enzima/glutaraldeído sobre eletrodo de platina (OXO); b) enzima/glutaraldeído sobre eletrodo de platina modificado com SPAN (SPAN/OXO). Pot. de aeração: 0,75 V vs Ag/AgCl_(sat)

Com o intuito de diminuir a interferência foi introduzido na construção do biossensor o polímero poli(anilinasulfonada) (SPAN). A SPAN é um derivado da polianilina, cuja estrutura é mostrada na Fig. 13. Uma característica muito interessante deste polímero condutor é que durante os processos de oxidação-redução, a eletroneutralidade é mantida unicamente pela entrada e saída de cátions, independentemente do ânion presente no eletrólito; isto é, impermeável a ânions⁶⁶. Este comportamento é atribuído à presença dos grupos SO₃⁻ na cadeia polimérica. Por este motivo, decidimos incluí-la na construção do biossensor, com o intuito de explorar suas propriedades permseletivas para evitar a entrada dos interferentes.

Figura 13: Estrutura da SPAN.

A SPAN foi sintetizada por voltametria cíclica, conforme detalhado na secção experimental, e sobre este polímero procedeu-se à imobilização da enzima. O sensor resultante mostrou sensibilidades comparáveis às obtidas com o sensor sem SPAN, no entanto com tempos de resposta um pouco mais elevados (~15s); isto é devido, provavelmente, à dificuldade para o transporte de massa provocado pela presença da camada polimérica. Quando estudado o efeito dos interferentes, constatou-se que foi eliminada a interferência causada pelo urato, enquanto o ascorbato continuou afetando o desempenho do sensor, sendo este resultado mostrado na Fig. 12(b).

Este comportamento pode ser explicado pelo fato da SPAN ser capaz de mediar na oxidação do ascorbato. A Fig. 14 mostra voltamogramas cíclicos de um eletrodo de carbono vítreo modificado com SPAN na presença e ausência de ascorbato. Comparado com o voltamograma obtido na ausência de ascorbato, o pico da onda anódica a 0,1 V, correspondente à oxidação da SPAN, aumenta gradativamente com a concentração de ascorbato.

Figura 14: Voltamogramas cíclicos de um eletrodo de carbono vítreo modificado com SPAN, na ausência e presença de ascorbato. v: 50 mV s⁻¹. Meio: tampão succinato pH 3,8.

Em vista deste resultado, partimos na procura de uma nova arquitetura que permitiria eliminar a interferência causada pelo ascorbato, abordando o problema desde uma perspectiva diferente: em lugar de construir uma barreira seletiva que impeça a entrada dos anions decidiu-se modificar a superfície do eletrodo, de forma que o biossensor trabalhe numa região de potenciais onde não ocorre a descarga destes compostos interferentes.

3.2 - Biossensores para oxalato com azul da Prússia

3.2.1 - Azul da Prússia

Como foi discutido na introdução, o azul da Prússia permite a detecção eletroquímica do H₂O₂ a potenciais relativamente baixos, o que permitiria o funcionamento de um biossensor enzimático amperométrico sem a interferência causada pela oxidação de espécies redutoras.

Para a construção do novo biossensor, a enzima oxalato oxidase foi imobilizada num eletrodo de platina modificado com azul da Prússia, utilizando o mesmo procedimento que na secção 3.1.1. Contudo, o eletrodo resultante não foi capaz de detectar oxalato no intervalo de concentrações de interesse. Este problema foi atribuído às elevadas correntes de fundo exibidas pelo eletrodo de platina modificado com azul da Prússia. Quando polarizado a 0,0 V, o eletrodo exibiu correntes em torno aos 20 μA . Esse comportamento se deve à adsorção de hidrogênio na platina. O fato de estas correntes serem muito maiores que as obtidas durante o funcionamento do biossensor acaba mascarando o sinal correspondente à detecção do oxalato.

Uma forma de tentar contornar esse problema foi a utilização de eletrodos de carbono vítreo (CV) em lugar da platina. Entretanto, a utilização de carbono vítreo acarretou uma complicação adicional. Enquanto o azul da Prússia forma um filme aderente sobre a superfície de Pt, sobre o carbono vítreo este é facilmente removido, fato atribuído à lixiviação do azul da Prússia. Este fato foi confirmado ao observar a resposta gerada pela única adição de H_2O_2 durante tempos prolongados. A Fig. 15 mostra a resposta do eletrodo CV/AP após a adição de H_2O_2 (aumento em 1 mmol L^{-1} na concentração final) para tempos longos, onde podemos observar uma queda progressiva no sinal de detecção.

Figura 15: Perda de sinal observada para o eletrodo de carbono vítreo modificado com azul da Prússia a tempos longos. Potencial de trabalho: 0,0 V vs Ag/AgCl. Meio KCl 0,1 mol L⁻¹ / HCl 0,1 mol L⁻¹.

Uma maneira de incrementar a estabilidade do azul da Prússia consiste no recobrimento do eletrodo modificado com algum tipo de membrana, como por exemplo, a utilização de Nafion^{67, 68}. Este polímero é depositado colocando uma gota de uma solução do mesmo e deixando evaporar o solvente.

Uma alternativa interessante é a possibilidade de cobrir o azul da Prússia com polímeros gerados eletroquimicamente, devido à simplicidade do processo de deposição, a possibilidade de controlar a espessura do polímero e, fundamentalmente, a reprodutibilidade que a deposição eletroquímica oferece. Para tal, tentou-se polimerizar SPAN sobre um eletrodo de carbono vítreo modificado com azul da Prússia por voltametria cíclica. Como mostra a Fig. 16, foi observado o comportamento típico do crescimento de um polímero condutor por voltametria cíclica, onde a corrente aumenta progressivamente com o decorrer dos ciclos.

Figura 16: Crescimento de SPAN sobre um eletrodo de carbono vítreo modificado com azul da Prússia. v : 50 mV s^{-1} .

Depois da deposição de SPAN o eletrodo continuou exibindo atividade catalítica para a eletroredução do H_2O_2 , indicando que o azul da Prússia não lixívia durante o processo de deposição da SPAN. Além disso, a presença do polímero melhora sua estabilidade, tal como pode ser observado na Fig. 17, onde são mostradas as respostas de ambos os eletrodos durante a detecção amperométrica de H_2O_2 . A presença do polímero resultou num aumento da estabilidade do AP, denotada por uma melhor resposta para concentrações elevadas de peróxido.

Figura 17: Respostas para a detecção amperométrica de H_2O_2 obtidas com (A) eletrodo de CV modificado com azul da Prússia e (B) eletrodo de CV modificado com azul da Prússia e SPAN. Pot. de operação: 0,0 V vs $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$. Meio: KCl 0,1 mol L^{-1} / KCl 0,1 mol L^{-1}

3.2.2 - Biossensor para oxalato. Sistema CV/AP/SPAN

Considerando os resultados apresentados no item anterior, foi construído um biossensor para a detecção de oxalato imobilizando a enzima oxalato oxidase com glutaraldeído, sobre um eletrodo de carbono vítreo modificado com azul da Prússia e SPAN⁶⁹. Desta vez, o biossensor mostrou resposta frente a oxalato no intervalo de concentrações desejado, tal como pode ser observado na Fig. 18.

Figura 18: Resposta exibida pelo sensor com azul da Prússia/SPAN/oxalato oxidase frente a oxalato. Meio: tampão succinato pH 3,8. Potencial de trabalho: 0,0 V vs Ag/AgCl. Cada patamar de corrente corresponde a um aumento de 0,05 mmol L⁻¹ na concentração de oxalato

O sensor com azul da Prússia apresentou resposta linear no intervalo de concentrações de 0,05 a 0,40 mmol L⁻¹ de oxalato. A sensibilidade neste intervalo foi de 131,3 μA mmol⁻¹ L cm⁻². Este valor é uma ordem de magnitude maior que o valor observado para o biossensor sem azul da Prússia contendo a mesma quantidade de enzima e operando a 0,65 V. Na Fig. 19 são comparadas as curvas analíticas para o eletrodo enzimático com azul da Prússia e SPAN e o biossensor sem azul da Prússia.

Figura 19: Curvas analíticas para sensor sem azul da Prússia operando a 0,65 V (□), e para sensor com azul da Prússia e SPAN operando a 0,0 V (○). As sensibilidades obtidas foram de 12,5 e 131,3 de $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$ respectivamente.

3.2.3 - Influência do potencial de trabalho

Outro parâmetro importante que deve ser otimizado é o potencial de trabalho. Para o azul da Prússia (AP) poder mediar na redução do H_2O_2 , deve encontrar-se no estado reduzido (BP); o H_2O_2 é reduzido, levando à oxidação do BP para AP, o qual é novamente reduzido no eletrodo gerando o sinal amperométrico. Todos estes processos dependem do potencial aplicado. Na Fig. 20 são mostradas tanto as sensibilidades como as correntes de fundo obtidas a diferentes potenciais de trabalho. Podemos observar que a sensibilidade atinge um valor máximo, enquanto que a corrente de fundo diminui gradativamente conforme aumenta o potencial aplicado. Em função destes resultados, escolhemos 0,05 V como o potencial de trabalho ótimo, uma vez que representa a melhor combinação entre sensibilidade e corrente de fundo.

Figura 20: Influência do potencial aplicado na sensibilidade (○) e na corrente de fundo (+) exibidas pelo biossensor.

3.2.4 - Comportamento do sensor com azul da Prússia frente aos interferentes

O sensor com azul da Prússia mostrou-se totalmente inerte à presença de urato, mas continuou respondendo à adição de ascorbato. A Fig. 21 exibe a resposta do sensor com azul da Prússia, para $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de oxalato; $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de oxalato + 1 mmol L^{-1} de ascorbato e $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de oxalato + $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de urato; para fins comparativos são mostrados na mesma figura os resultados obtidos anteriormente para os sensores sem azul da Prússia. Como se pode observar, a interferência causada pelo ascorbato é positiva, ou seja, provoca um aumento no sinal. Isto significa que a interferência do ascorbato deve ser causada pela redução de alguma outra espécie além do H_2O_2 gerado na reação enzimática durante o funcionamento do biossensor.

Figura 21: Estudo dos efeitos causados pelos interferentes ascorbato e urato sobre o desempenho dos biossensores com diferentes arquiteturas: a) enzima/glutaraldeído sobre eletrodo de platina (OXO); b) enzima/glutaraldeído sobre eletrodo de platina modificado com SPAN (SPAN/OXO) e c) enzima/glutaraldeído sobre um eletrodo de CV modificado com AP e SPAN (AP/SPAN/OXO).

O ascorbato pode interferir de quatro maneiras na detecção amperométrica de oxalato:

- reduzir o H_2O_2 formado na reação enzimática;
- descarregar-se diretamente sobre o eletrodo;
- sofrer decomposição oxidativa, onde um dos produtos finais é o próprio oxalato ⁷⁰.
- oxidação do ácido ascórbico pelo oxigênio molecular, produzindo ácido dehidroascórbico, com a formação concomitante de H_2O_2 .

A primeira possibilidade pode ser descartada, já que a remoção de H_2O_2 levaria a uma diminuição do sinal e a interferência observada é positiva. Portanto, restam três possíveis mecanismos para a interferência do ascorbato. Com o objetivo de elucidar se a interferência

é causada pela descarga direta do ascorbato, foram feitos voltamogramas de um eletrodo de carbono vítreo modificado com azul da Prússia, na presença e na ausência de ascorbato (Fig. 22)

Figura 22: Voltamogramas cíclicos de um eletrodo de carbono vítreo modificado com azul da Prússia, na ausência e na presença de diferentes concentrações de ascorbato. v : 50 mV s^{-1}

Como pode ser observado, a adição de ascorbato provoca um aumento na corrente anódica a partir de $0,25 \text{ V}$, porém, não é observada modificação na corrente catódica a potenciais por volta de $0,0 \text{ V}$. Uma outra possibilidade para a descarga do ascorbato poderia ser a mediação da SPAN na descarga do ascorbato, tal como acontece com o sensor sem azul da Prússia operando a $0,65 \text{ V}$. Esta possibilidade também foi descartada, já que comprovou-se que o ascorbato interfere da mesma maneira para um sensor com SPAN que para outro sem o filme do polímero condutor, tal como é mostrado na Fig. 23. Desta forma, é descartada a possibilidade da descarga direta do ascorbato sobre o eletrodo.

Interferência do ascorbato no sensor sem SPAN.

Interferência do ascorbato no sensor com SPAN.

Figura 23: Interferência causada pela adição do ascorbato nos sensores com azul da Prússia. (A) Adições de ascorbato (1 mmol L^{-1} por adição) depois de duas de oxalato, sensor com SPAN. (B) Adições de ascorbato depois de uma injeção de oxalato, sensor sem SPAN.

Portanto, ficam só duas possibilidades para explicar a interferência provocada pelo ascorbato, o aumento na concentração de oxalato, resultado da degradação oxidativa do ascorbato e, aumento na concentração de H_2O_2 , provocado pela oxidação aeróbia do ácido ascórbico. Se o mecanismo responsável pela interferência fosse a degradação oxidativa do ascorbato a oxalato, o sinal de interferência seria observado somente na presença da enzima, enquanto que no segundo mecanismo o sinal poderia ser detectado apenas pela presença do azul da Prússia, tal com é esquematizado na Fig. 24.

Figura 24: Representação esquemática dos possíveis mecanismos da interferência do ascorbato no sensor de oxalato baseado em azul da Prússia.

A fim de se elucidar o mecanismo de interferência foram efetuados os seguintes experimentos: dois eletrodos foram modificados com azul da Prússia e sobre um deles (Eletrodo 1) foi imobilizada a enzima oxalato oxidase, por entrecruzamento com glutaraldeído. No segundo eletrodo (Eletrodo 2) repetiu-se o experimento, só que sem colocar a enzima. A seguir, estudou-se a resposta amperométrica de ambos os eletrodos (a 0,05 V vs Ag/AgCl) frente a adições sucessivas de ascorbato, onde cada adição levou a um incremento de 1 mmol L^{-1} na concentração de ascorbato. Na Fig. 25 é apresentado o cronoamperograma obtido com o eletrodo 1, onde pode se observar claramente a interferência causada pelo aumento sucessivo na concentração de ascorbato. Por outro lado, ao repetir o procedimento com o Eletrodo 2, o incremento na concentração de ascorbato não produziu nenhuma mudança no valor de corrente observado, tal como é mostrado na Fig. 26.

Figura 25: Comportamento do biossensor CV/AP/OXO (eletrodo 1) frente a adições sucessivas de ascorbato. Cada seta indica o incremento de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ na concentração de ascorbato. Pot. de trabalho: $0,05 \text{ V vs Ag/AgCl}$.

Figura 26: Comportamento do sensor CV/AP (eletrodo 2) frente a adições sucessivas de ascorbato. Cada seta indica o incremento de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ na concentração de ascorbato. Pot. de trabalho: $0,05 \text{ V vs Ag/AgCl}$.

Desta forma, podemos concluir que a interferência observada se deve ao aumento na concentração de oxalato, causada pela degradação oxidativa do ascorbato. Embora a interferência causada pelo ascorbato não possa ser eliminada, a utilização do azul da

Prússia leva a uma diminuição na interferência relativa causada por esse composto. Podemos identificar dois fatores como os responsáveis pela diminuição da interferência relativa, por um lado, a corrente gerada pela degradação de ascorbato a oxalato é menor que a descarga direta do ascorbato no sensor sem azul da Prússia e operando a 0,65 V e, por outro lado, as correntes resultantes durante a detecção de oxalato são maiores, devido às propriedades catalíticas do azul da Prússia.

3.2.5 - Influência do valor de pH no desempenho do sensor com azul da Prússia

Como foi demonstrado anteriormente, o pH para o desempenho ótimo da enzima oxalato oxidase é 3,8; todavia, a inclusão do azul da Prússia exige um novo estudo da influência do pH, uma vez que as propriedades catalíticas do composto inorgânico também podem ser afetadas por variações na concentração de prótons no meio. Para isso, fizeram-se curvas de calibração para o sensor com azul da Prússia a diferentes valores de pH. Na Fig. 27 é observado que o pH ótimo continua sendo 3,8, o que demonstra que a enzima imobilizada continua sendo a principal responsável pela dependência do desempenho do sensor com o pH.

Figura 27: Influência do pH na sensibilidade do sensor com azul da Prússia. Medidas feitas em tampão succinato + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; o ajuste do pH foi feito com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Pot. de operação: $-0,05 \text{ V}$ vs $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$

Até aqui, os testes amperométricos dos biossensores foram efetuados em tampão succinato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,8). A escolha foi baseada no fato deste tampão ser utilizado em vários trabalhos descritos na literatura. No entanto, existe uma divergência sobre qual seria o melhor tampão a ser utilizado junto à enzima oxalato oxidase. Em alguns casos o succinato é reportado como a melhor alternativa^{47, 48, 71}, enquanto outros apontam ao citrato como o meio onde são obtidos os melhores resultados⁵². Por este motivo, foram construídos diversos biossensores e testados em tampões succinato e citrato, ambos com pH 3,8 e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Na Fig. 28 são mostrados alguns resultados.

Figura 28: Influência do tampão utilizado na resposta amperométrica do biossensor. (Δ) tampão succinato pH 3,8 e ($\circ$) tampão citrato pH 3,8. Potencial aplicado: -0,05 V vs Ag/AgCl.

Na Fig. 29 são mostradas as curvas analíticas, onde claramente se observa que as respostas nos dois tampões são muito similares. O biossensor operou em tampão succinato com uma sensibilidade levemente maior que no caso do citrato ($79,91$ e $75,95 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$, respectivamente). Em virtude de todas as medidas anteriores estarem feitas em tampão succinato, foi decidido continuar a trabalhar neste meio, por uma mera questão de praticidade.

Figura 29: Influência do tampão utilizado na sensibilidade do biossensor. (□) tampão succinato pH 3,8 e (○) tampão citrato pH 3,8. Potencial aplicado: -0,05 V vs Ag/AgCl.

3.3 - Hexacianoferrato de níquel

3.3.1 - Deposição do filme

Tal como foi discutido na introdução, embora o azul da Prússia apresente excelentes resultados do ponto de vista do desempenho analítico, ele apresenta uma séria desvantagem, uma vez que perde sua eletroatividade em eletrólitos contendo o cátion Na^+ . Para contornar este problema decidiu-se utilizar um análogo do azul da Prússia como mediador na detecção de H_2O_2 , o hexacianoferrato de níquel.

Têm sido reportados vários procedimentos para a preparação do hexacianoferrato de níquel, tanto químicos como eletroquímicos. Entre eles podemos citar a anodização de eletrodos de Ni em soluções contendo ferricianeto⁷², a precipitação direta do HCNFeNi ao misturar soluções de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e NiCl_2 em condições de excesso de íons níquel⁷³ e, finalmente, a deposição catódica, via a redução do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ na presença de íons níquel⁷⁴.⁷⁵. Este último foi o método escolhido, uma vez que a eletrodeposição permite um fácil controle do processo e a formação de filmes com excelente reprodutibilidade. Para tal, o eletrodo foi ciclado entre $-0,3$ e $0,9$ V vs. Ag/AgCl numa solução contendo $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, NiCl_2 $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . A Fig. 30 mostra o crescimento do filme, onde pode se observar o aumento da corrente com o decorrer dos ciclos. No intervalo de potencial utilizado, só o ferricianeto é eletroativo, já que a redução do Ni^{2+} requer potenciais mais negativos (aprox. $-1,0$ V). O crescimento do filme ocorre durante a varredura no sentido

negativo, onde o ferricianeto é reduzido a ferrocianeto, o qual reage instantaneamente com o Ni^{+2} para formar o HCNFeNi .

Figura 30: Voltametria cíclica durante a formação eletroquímica do filme de HCNFeNi . Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; eletrólito: $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ NiCl}_2$, $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$.

3.3.2 - Comportamento eletroquímico

A Fig. 31 mostra um voltamograma do eletrodo modificado com HCNFeNi em KCl/HCl . Como pode ser observado, aparecem dois picos de oxidação e dois de redução.

Figura 31: Voltamograma cíclico de um eletrodo de CV modificado com HCNFeNi. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; eletrólito: $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$.

Este comportamento pode ser explicado pelo fato da precipitação do HCNFeNi ocorrer com duas estruturas estáveis: $\text{K}_2\text{Ni}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $\text{KNi}_{1,5}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. A oxidação e redução destas duas formas estruturais é a responsável pela aparição dos quatro picos observados^{29, 76}. As reações envolvidas podem ser escritas como:

Os picos que aparecem a potenciais mais positivos correspondem a reação representada na equação 4, enquanto a equação 5 se refere ao par de picos que aparecem a potenciais mais negativos.

Para comprovar a capacidade do HCNFeNi de intercalar Na^+ , o eletrodo foi transferido a uma célula eletroquímica contendo NaCl e ciclado nas mesmas condições que quando utilizado KCl como eletrólito suporte. Ao contrario do que acontece no caso do azul da Prússia, o HCNFeNi apresenta resposta eletroquímica em eletrólitos contendo sódio e, como pode ser observado na Fig. 32, esta resposta se caracteriza pela aparição de um único processo redox. O fato de o HCNFeNi apresentar um par único de picos redox em eletrólitos com Na^+ , contrariamente ao comportamento em K^+ , é devido a que o sódio não é capaz de formar diferentes fases do HCNFeNi^{77, 78}.

A reação de oxidação e redução do HCNFeNi em eletrólitos contendo sódio pode ser escrita como:

Figura 32: Voltamograma cíclico de um eletrodo de CV modificado com HCNFeNi. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; eletrólito: $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$, $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$.

3.3.3 - Detecção de H_2O_2

Os resultados apresentados no item anterior corroboram a capacidade do HCNFeNi de intercalar íons Na^+ e apresentar eletroatividade em eletrólitos contendo esse cátion.

A próxima etapa foi estudar o comportamento do eletrodo modificado com HCNFeNi na detecção de H_2O_2 a baixos potenciais, tanto em eletrólitos contendo K^+ como também contendo Na^+ . A Fig. 33 mostra duas curvas analíticas, correspondentes à detecção de H_2O_2 com o eletrodo modificado com HCNFeNi, onde uma curva foi obtida na presença de K^+ e a outra em Na^+ . Como pode ser observado, em ambos os casos obtiveram-se sensibilidades da mesma ordem ($9,61$ e $5,80 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$ para o sensor operando em K^+ e Na^+ , respectivamente). Cabe lembrar que, no caso do azul da Prússia, a sensibilidade

exibida em eletrólitos contendo Na^+ foi 200 vezes menor que em eletrólitos com KCl como eletrólito suporte.

Figura 33: Curvas analíticas para a detecção de H_2O_2 com um eletrodo de CV modificado com HCNFeNi em (□) KCl 0,1 mol L⁻¹ e (○) NaCl 0,1 mol L⁻¹. Potencial de operação: 0,05 V vs. Ag/AgCl.

Embora o HCNFeNi seja capaz de reduzir eletrocataliticamente H_2O_2 na presença de íons sódio, apresenta dois inconvenientes se comparado ao azul da Prússia:

1 – A sensibilidade exibida pelo HCNFeNi para a detecção de peróxido de hidrogênio é aproximadamente 50-60 vezes menor que a sensibilidade do azul da Prússia (5,80 e 340,87 $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$, respectivamente).

2 – O filme de hexacianoferrato de níquel apresentou baixa aderência.

Com o intuito de melhorar as propriedades mecânicas da camada eletrocatalítica, foi preparado um composto híbrido baseado numa matriz de um polímero condutor (polipirrol), dentro da qual foi introduzido o HCNFeNi, de forma a produzir um filme robusto e com a capacidade de catalisar a redução de H_2O_2 a baixos potenciais e na presença de Na^+ .

3.4 - Composto híbrido HCNFeNi/polipirrol

3.4.1 - Eletrodeposição

Como exposto anteriormente, pensamos na elaboração de um composto híbrido contendo o HCNFeNi e polipirrol, num intento de conjugar as propriedades eletrocatalíticas do HCNFeNi e a estabilidade e robustez do polipirrol.

A metodologia escolhida para a formação do híbrido foi a eletrodeposição por voltametria cíclica, uma vez que ambos compostos podem ser facilmente sintetizados por esta via. O compósito foi depositado sobre um eletrodo de carbono vítreo, ciclando-o (a 50 mV s^{-1}) numa solução contendo 25 mmol L^{-1} de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 25 mmol L^{-1} de NiCl_2 , 25 mmol L^{-1} de pirrol, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl . O resultado foi um filme homogêneo de cor azul (típico do polipirrol) e com excelente aderência.

A Fig 34 mostra a eletrodeposição por voltametria cíclica do composto híbrido HCNFeNi/PPy (curva c). Com fins comparativos, na mesma figura são mostrados os crescimentos do polipirrol (curva a) e do HCNFeNi (curva b). Como pode ser observado, durante a deposição do híbrido HCNFeNi/PPy aparecem os picos característicos da formação do polipirrol como também a resposta eletroquímica típica durante a eletrodeposição do HCNFeNi, demonstrando que efetivamente está ocorrendo a deposição de ambos os compostos.

Figura 34: Eletrodeposição por voltametria cíclica de: (a) polipirrol; (b) HCNFeNi e (c) composto híbrido HCNFeNi/polipirrol

O mecanismo de deposição do híbrido merece uma atenção especial, já que nos permitirá explicar algumas propriedades eletroquímicas que este composto exhibe, tal como será apresentado mais adiante.

O polímero condutor é formado durante a varredura positiva, já que o processo requer a oxidação do pirrol para formar um cátion radical responsável pela propagação da reação ⁷⁹. Por outro lado, o HCNFeNi é formado quando a varredura é feita no sentido negativo, devido a que a deposição ocorre durante a redução do ferricianeto para ferrocianeto ⁷⁴. Por tanto, as microestruturas do polímero condutor e do HCNFeNi são depositadas em forma alternada durante a voltametria cíclica. É esperada a existência de interações eletrostáticas entre ambos os componentes do híbrido, uma vez que o polipirrol oxidado possui cargas positivas e o HCNFeNi é aniônico.

O fato que os voltamogramas resultantes durante a deposição do híbrido apresentem um aumento regular de todos os picos, tanto do polipirrol como do HCNFeNi, indica uma distribuição homogênea do polipirrol e do HCNFeNi dentro do filme.

3.4.2 - Propriedades eletrocatalíticas do HCNFeNi/PPy

Foi estudada a detecção de H_2O_2 com o híbrido, tanto em eletrólitos contendo Na^+ como na presença de K^+ . Na Fig. 35 são mostradas as curvas analíticas para a detecção de H_2O_2 em Na^+ e em K^+ obtidas com um eletrodo de CV modificado com HCNFeNi/PPy. A deposição foi feita por voltametria cíclica (10 ciclos).

Figura 35: Curvas analíticas para a detecção de H₂O₂ com um eletrodo de CV modificado com o híbrido HCNFeNi/PPy em (○) KCl 0,1 mol L⁻¹ e (□) NaCl 0,1 mol L⁻¹. Potencial de operação: 0,05 V vs. Ag/AgCl.

O eletrodo modificado com HCNFeNi/PPy foi capaz de mediar na eletroredução do peróxido, exibindo sensibilidades da mesma ordem em eletrólitos contendo Na⁺ como também K⁺ (66,54 e 88,33 μA mmol⁻¹ L cm⁻², respectivamente).

A combinação do polipirrol com o HCNFeNi resultou num composto que não só conjuga as propriedades dos precursores –apresentando as propriedades eletrocatalíticas do composto inorgânico e a robustez e aderência do polímero condutor– senão que as melhora. A sensibilidade do híbrido para a detecção de H₂O₂ mostrou-se 10 vezes maior que a do HCNFeNi. Na Fig. 36 são mostradas as curvas analíticas obtidas com o eletrodo modificado com o híbrido e com HCNFeNi na detecção de H₂O₂, onde as sensibilidades foram de 88,33 e 9,61 μA mmol⁻¹ L cm⁻², respectivamente.

Figura 36: Curvas analíticas para a detecção de H₂O₂ com um eletrodo de CV modificado com o híbrido HCNFeNi/PPy (○) e com HCNFeNi (□). Eletrólito KCl 0,1 mol L⁻¹; HCl 0,1 mol L⁻¹. Potencial de operação: 0,05 V vs. Ag/AgCl.

Para explicar este incremento de sensibilidade devemos levar em consideração dois fatores: (a) a condutividade do polipirrol e, (b) a estrutura do composto híbrido.

O transporte de cargas através do filme de HCNFeNi pode ser descrito como a transferência dos elétrons entre os íons de ferro vizinhos, acompanhado da movimentação de contra-íons com o objetivo de manter a eletroneutralidade^{31, 80}

Por outro lado, o polipirrol é um polímero intrinsecamente condutor, formado por cadeias carbônicas com ligações duplas conjugadas. A passagem da condição isolante para a condutora ocorre através da oxidação do polímero, processo conhecido como dopagem tipo-p. Essa reação redox tem como consequência a formação de cargas positivas deslocalizadas, as quais são neutralizadas pela incorporação de ânions. No polipirrol, o

processo de dopagem acontece em potências entre $-0,3$ e $-0,2$ V. Portanto, o polipirrol se encontrará no seu estado condutor durante a detecção amperométrica do H_2O_2 . Consequentemente, o mecanismo de transporte de carga entre o eletrodo e o H_2O_2 será favorecido, uma vez que as cadeias de polipirrol oferecem uma rota alternativa para a condução de elétrons.

3.4.3 -Eletroatividade do polipirrol vs desempenho analítico

Como dito anteriormente, a diferença na capacidade eletrocatalítica entre o híbrido e o HCNFeNi poderia estar relacionada com a eletroatividade do polipirrol. Foi utilizada a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, com o intuito de obter provas experimentais que corroborassem esta hipótese. Na Fig. 37 são mostrados os diagramas de Nyquist para um eletrodo modificado com HCNFeNi (Fig. 37a) e do eletrodo modificado com o híbrido HCNFeNi/PPy (Fig. 37b). Em ambos os casos, o diâmetro do semicírculo observado a altas frequências está relacionado com a resistência de transferência de carga (R_{tc}) e com a resistência eletrônica do filme (R_f)^{81, 82}. Como pode ser observado, existe uma grande diferença entre estes valores, sendo de aproximadamente $13\text{ k}\Omega$ para o NiHCNFe (Fig. 37a) e de $40\text{ }\Omega$ para o material híbrido (Fig. 37b). Este comportamento indica que o polipirrol deve estar atuando de forma de interconectar os centros redox do HCNFeNi, levando a um aumento na velocidade de transferência de carga. Além disso, ao analisar os diagramas de impedância na região de baixas frequências podemos observar que o HCNFeNi exibe o comportamento típico de um processo de difusão infinita, com uma reta com inclinação de 45 graus, enquanto o composto híbrido mostra um comportamento

típico de processos de difusão finita ^{81, 82}. Os processos difusionais que ocorrem a baixas frequências estão relacionados com o transporte de íons no interior dos filmes para a compensação de cargas durante a oxido-redução e, o termo difusão finita significa que o frente de reação avança ao longo de todo o filme. Desde que os processos de difusão infinita e finita ocorrem na mesma região de frequências, deduzimos que o transporte iônico é mais rápido no interior do composto híbrido que no HCNFeNi sozinho.

A fim de verificar a influência da eletroatividade do polipirrol na resposta amperométrica para a detecção de H₂O₂ efetuou-se a sobre-oxidação do polipirrol constituinte do híbrido.

A sobre-oxidação do polipirrol ocorre quando o polímero é exposto a elevados potenciais (~1 V) durante tempos prolongados. Durante esse processo o polímero é oxidado até um estado de oxidação maior, no qual é susceptível a ataque nucleofílico e grupos carbonila são introduzidos no esqueleto do polímero ^{83, 84}, tal como é mostrado na Fig. 38. Este processo é irreversível e leva à degradação da condutividade do polímero ⁸⁴.

O eletrodo modificado com o híbrido foi ciclado entre -0,3 e 0,9 V numa solução contendo 0,1 mol L⁻¹ de KCl e HCl, até obter-se um voltamograma estável.

Figura 37: Espectros de impedância de: (a) eletrodo de CV modificado com HCNFeNi e (b) eletrodo de CV modificado com o híbrido HCNFeNi/PPy. E: 0,0 V vs Ag/AgCl; Amplitude (rms): 5 mV.

Figura 38: Mecanismo do processo de sobre-oxidação do polipirrol

Na Fig. 39 são mostrados os voltamogramas obtidos durante a ciclagem do filme do híbrido. Como pode ser observado, nos primeiros ciclos ocorre um decréscimo da corrente de todos os picos que aparecem no voltamograma, tanto dos picos correspondentes ao HCNFeNi como os de polipirrol. Na medida que aumenta o número de ciclos, observa-se uma estabilização nos valores de corrente dos picos de HCNFeNi, enquanto os picos do polipirrol desaparecem completamente, indicando a perda de eletroatividade do polímero. A fim de constatar se o processo resultou na diminuição da condutividade do polímero foi realizado um espectro de impedância eletroquímica do filme ciclado.

Na Fig. 40 é mostrado o espectro de impedância do HCNFeNi/PPy ciclado. Como pode ser observado, o espectro do híbrido após a ciclagem é semelhante ao correspondente ao HCNFeNi puro, com valores de resistência de aproximadamente 15000 ohms e apresentando um comportamento típico de processo de difusão infinita.

Figura 39: Voltamogramas cíclicos obtidos durante a ciclagem do filme de HCNFeNi/PPy. v : 50 mV s^{-1} ; eletrólito: $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$, $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$.

Figura 40: Espectro de impedância do eletrodo de CV modificado com o híbrido HCNFeNi/PPy ciclado em HCl. E : $0,0 \text{ V}$ vs Ag/AgCl ; Amplitude (rms): 5 mV .

A seguir, utilizou-se o eletrodo ciclado para a detecção amperométrica de H_2O_2 . A curva analítica resultante é mostrada na Fig. 41. Para fins comparativos, na mesma figura é mostrada a curva analítica obtida com o mesmo eletrodo antes da ciclagem. Como pode ser observado, a queda da condutividade do polipirrol levou à diminuição nas propriedades eletrocatalíticas do híbrido, uma vez que houve um decréscimo na sensibilidade para a detecção de peróxido. A sensibilidade exibida pelo eletrodo com o híbrido ciclado foi de $5,79 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$. Desta maneira, fica demonstrada a influencia da condutividade do polipirrol na capacidade do híbrido de mediar a eletroredução do H_2O_2 .

Figura 41: Curvas analíticas para a detecção de H_2O_2 com um eletrodo de CV modificado com (○) e com o híbrido $\text{HCNFeNi/PPy}_{\text{ox}}$ depois de ciclar em HCl (Δ). Eletrólito KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Potencial de operação: $0,05 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl .

3.4.4 - Estrutura do híbrido HCNFeNi/PPy

Se considerarmos o mecanismo de deposição, onde o polipirrol é depositado nas varreduras no sentido positivo, enquanto o HCNFeNi é depositado nas varreduras no sentido negativo, podemos pensar na formação de duas possíveis estruturas:

- (1) Uma rede tridimensional com uma distribuição homogênea do polímero condutor e do composto inorgânico (Fig. 42a) e,
- (2) Camadas alternadas de polipirrol e HCNFeNi, formadas nas varreduras em sentido positivo e negativo respectivamente (Fig 42b).

Figura 42: Representações esquemáticas das duas possíveis estruturas do composto híbrido HCNFeNi/PPy.

Como dito anteriormente, quando o eletrodo modificado com o híbrido HCNFeNi/PPy foi ciclado em HCl, observou-se o desaparecimento dos picos característicos do polipirrol, enquanto os picos referentes aos processos redox do HCNFeNi continuam a aparecer (Fig. 39), mesmo depois da perda total de eletroatividade por parte do polipirrol. Esse resultado implica que as microestruturas do HCNFeNi estão interconectadas, corroborando a estrutura do híbrido colocada na Fig. 42(a), correspondente a uma rede tridimensional com uma distribuição homogênea do polipirrol e do HCNFeNi dentro do filme.

Com o intuito de obter evidências extras sobre a estrutura do híbrido foi realizado um experimento adicional. Para tal, foi sintetizado um filme híbrido com uma estrutura de tipo multicamada, o qual foi submetido ao processo de sobre-oxidação. Para isso, foram depositados sobre um eletrodo camadas alternadas de polipirrol e de HCNFeNi. Num primeiro passo, eletrodepositou-se o polipirrol por voltametria cíclica, varrendo o potencial entre -0,3 e 0,9 V vs. Ag/AgCl durante três ciclos. A seguir, o eletrodo foi lavado com água destilada e transferido para outra célula eletroquímica, onde se realizou a deposição do HCNFeNi, também por voltametria cíclica e com os mesmos parâmetros que os utilizados no caso do polipirrol. Os procedimentos foram repetidos até obter um filme formado por três bicamadas. O voltamograma do filme resultante é mostrado na Fig.43. No voltamograma podemos observar dois picos bem definidos, um de oxidação em aproximadamente 0,6 V e um de redução em torno de 0,4 V, correspondentes aos processos de oxidação e redução do HCNFeNi.

A seguir, o eletrodo foi ciclado entre -0,3 e 0,9 V numa solução contendo HCl 0,1 mol L⁻¹ e KCl 0,1 mol L⁻¹, até totalizar 50 ciclos. Tal como pode ser observado na Fig 44, durante este processo ocorre um decréscimo nos valores de corrente dos picos de oxidação

e redução do HCNFeNi conforme diminui a condutividade do polipirrol, até seu desaparecimento. Por tanto, mesmo que depois do processo de sobreoxidação o polipirrol exiba uma condutividade residual, esta não é suficiente para permitir o transporte de elétrons entre as camadas de HCNFeNi.

Figura 43: Voltamograma cíclico do filme híbrido formado por camadas de HCNFeNi e PPy. v : 50 mV s^{-1} ; eletrólito: $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 44: Voltamogramas cíclicos obtidos durante a ciclagem do filme híbrido formado por camadas de HCNFeNi e PPy. v : 50 mV s^{-1} ; eletrólito: HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Com base nas evidências apresentadas pode-se concluir que o composto híbrido possui uma estrutura tridimensional com uma distribuição homogênea do polipirrol e do HCNFeNi dentro do filme. O polipirrol atua como um fio condutor, facilitando o transporte de elétrons entre os sítios ativos do HCNFeNi e o eletrodo, o que se traduz num aumento da atividade eletrocatalítica do composto inorgânico.

A distribuição homogênea e a conexão entre os micro-domínios do HCNFeNi podem ser explicados em função do mecanismo de eletropolimerização do polipirrol. Durante as varreduras de potencial no sentido positivo, o polipirrol se oxida, formando cargas positivas que são compensadas pela entrada de ânions na matriz polimérica. Dentre esses ânions encontramos o $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, que se reduzir-se-á durante a varredura em sentido

negativo, formando centros de HCNFeNi distribuídos uniformemente dentro da rede tridimensional do polipirrol.

3.4.5 - Biossensor para oxalato baseado em HCNFeNi/PPy

Foi construído um biossensor para oxalato, imobilizando a enzima oxalato oxidase sobre um eletrodo de CV modificado com o composto híbrido HCNFeNi/PPy. Para tal, colocou-se 6 μL de solução de enzima ($2,4 \text{ mg mL}^{-1}$), seguidos de 3 μL de solução de glutaraldeído (2,5% v/v) sobre um eletrodo de CV modificado com o híbrido HCNFeNi/PPy. O eletrodo foi deixado a temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente.

O desempenho do eletrodo para a detecção de oxalato foi estudado a 0,05 V vs. Ag/AgCl. Utilizaram-se dois tipos de eletrólito, tampão succinato pH 3,8 contendo K^+ e tampão succinato pH 3,8 contendo Na^+ .

A Fig. 45 mostra as curvas analíticas do biossensor em ambos os eletrólitos. Como pode ser observado, o biossensor apresenta resposta linear no intervalo de concentrações compreendido entre 0,05 e 0,35 mmol L^{-1} de oxalato, tanto operando em meio contendo K^+ como também contendo Na^+ . As sensibilidades obtidas foram de $39,03 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$ para o sensor operando em solução de eletrólito contendo K^+ e de $21,78 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$ quando o eletrólito suporte contém Na^+ .

Portanto, obteve-se sucesso na utilização do híbrido HCNFeNi/PPy como transdutor na elaboração de um biossensor amperométrico para oxalato, uma vez que o sensor

apresenta boa sensibilidade e pode trabalhar em eletrólitos contendo Na^+ , permitindo, em princípio, a sua utilização na determinação de oxalato em urina.

Figura 45: Curvas analíticas para a detecção de oxalato obtidas com o biossensor baseado no híbrido HCNFeNi/PPy. Respostas obtidas em (○) solução tampão succinato contendo K^+ e em (□) solução tampão succinato contendo Na^+ . Potencial de operação: 0,05 V vs. Ag/AgCl.

Para fins comparativos, foi elaborado um sensor utilizando azul da Prússia como mediador e testou-se o desempenho do mesmo em eletrólitos contendo K^+ e Na^+ , seguindo o mesmo procedimento que o utilizado com o sensor com HCNFeNi/PPy. Neste caso, quando o sensor foi testado em eletrólito contendo K^+ apresentou maior sensibilidade que o sensor com o híbrido ($76,94 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$, Fig. 46), porém quando utilizado num meio contendo Na^+ a sensibilidade caiu drasticamente, diminuindo mais de dez vezes ($4,66 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$, Fig. 46).

Figura 46: Curvas analíticas para a detecção de oxalato obtidas com o biosensor que utiliza azul da Prússia como mediador. Respostas obtidas em (Δ) solução tampão succinato contendo K^+ e em ($\diamond$) solução tampão succinato contendo Na^+ . Potencial de operação: 0,05 V vs. Ag/AgCl.

3.5 - Compósito híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre (PPy/HCNFeCu)

3.5.1 - Síntese eletroquímica

Embora os análogos do azul da Prússia apresentem menor sensibilidade na detecção de peróxido de hidrogênio, continuam a ser uma alternativa muito estudada, devido à capacidade de operar em meios contendo Na^+ . Entretanto, é necessário pesquisar a forma de aumentar o desempenho analítico deste tipo de composto. Como foi demonstrado anteriormente, uma forma eficaz de conseguir esse aumento consiste em formar estruturas híbridas de hexacianoferratos com polipirrol. Na procura de melhores desempenhos, decidimos sintetizar um híbrido de polipirrol e hexacianoferrato de cobre.

A primeira escolha foi sintetizar o híbrido com um procedimento similar ao utilizado no caso do HCNFeNi/PPy. Entretanto, não foi possível aplicar essa metodologia, devido à impossibilidade de formar uma solução estável contendo $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, CuCl_2 e pirrol. Contudo, foi possível preparar soluções estáveis de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e pirrol ou CuCl_2 e pirrol; permitindo propor um procedimento de deposição em duas etapas: sintetizar o polímero condutor dopado com hexacianoferrato e incorporar o Cu^{2+} numa segunda etapa.

O primeiro passo consiste na eletrodeposição do polipirrol dopado com $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$; a incorporação deste ânion na matriz de polipirrol é um fato bem estudado e documentado na literatura⁸⁵⁻⁸⁷. O polímero foi depositado sobre um eletrodo de carbono vítreo por voltametria cíclica, em uma célula eletroquímica contendo 20 mL de solução aquosa de pirrol $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ciclando 10 vezes entre

-0,3 e 0,9 V, com uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Na Figura 47 são mostrados os voltamogramas registrados durante o processo de deposição.

Figura 47: Voltamogramas cíclicos obtidos durante a deposição do polipirrol dopado com hexacianoferrato. Eletrólito: $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ + pirrol $1,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; v : 50 mV s^{-1} ; 10 ciclos.

A segunda etapa consiste em mergulhar o eletrodo modificado com polipirrol dopado com hexacianoferrato numa solução de CuCl_2 $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ durante 2 horas, de modo que os íons Cu^{+2} difundam para o interior da matriz polimérica. Passadas as duas horas, o eletrodo é ciclado no mesmo eletrólito, transferido a uma solução contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ciclado novamente. Na Figura 48 são mostrados os voltamogramas do eletrodo modificado com polipirrol dopado com hexacianoferrato em CuCl_2 , onde pode observar-se a aparição e o crescimento dos picos característicos do hexacianoferrato de cobre, em aproximadamente 0,7 V, quando este eletrodo é ciclado em

KCl. Estes picos continuam a crescer , até estabilizar-se depois de alguns ciclos (entre o sétimo e o décimo ciclo), tal como é mostrado na Fig. 49.

Figura 48: Voltamogramas cíclicos do polipirrol dopado com hexacianoferrato em CuCl_2 $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. v: 50 mV s^{-1} ; 20 ciclos.

Figura 49: Voltamogramas cíclicos do polipirrol modificado com hexacianoferrato de cobre em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. v: 50 mV s^{-1} ; 20 ciclos.

Depois do processo de deposição e lavagem dos eletrodos com água ultra-pura pode-se observar o polímero recobrando o eletrodo, apresentando boa aderência.

3.5.2 - Detecção de H_2O_2 .

A seguir, testou-se a capacidade do novo composto para a detecção de peróxido de hidrogênio. Os resultados obtidos foram excelentes. Na Fig. 50 é mostrada a resposta amperométrica de um eletrodo de carbono vítreo modificado com o híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre na detecção de peróxido de hidrogênio a 0,0 V. O gráfico está dividido em três regiões, a região (A), onde cada aumento na corrente corresponde a um incremento de $0,025 \text{ mmol L}^{-1}$ na concentração de peróxido de hidrogênio, a região (B), onde os incrementos de H_2O_2 são de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e, finalmente, a região (C), com incrementos de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$. A curva analítica resultante é mostrada na Fig. 51, onde se pode observar um intervalo de comportamento linear entre 0,025 e $1,000 \text{ mmol L}^{-1}$. Para concentrações maiores que 1 mmol L^{-1} se observa um decréscimo nos valores de corrente. Em princípio, este comportamento foi atribuído à degradação do material ao ser exposto a concentrações mais elevadas de H_2O_2 . Entretanto, esta hipótese foi abandonada, uma vez que na repetição da determinação com um eletrodo utilizado anteriormente, a resposta é a mesma, chegando em alguns casos a aumentar ligeiramente, tal como será mostrado posteriormente. A sensibilidade obtida com este eletrodo foi de $899,41 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$, ou seja, o híbrido sintetizado em duas etapas mostrou uma sensibilidade 6000 vezes maior que o hexacianoferrato de níquel sozinho. O fato mais interessante é que a sensibilidade exibida por este tipo de composto foi maior que a do azul

da Prússia eletrodepositado, chegando a duplicar este valor. Estes dados estão resumidos na Tabela 2.

Figura 50: Detecção amperométrica de H_2O_2 com um eletrodo modificado com o híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre. E_{apl} : 0,0 V.

Figura 51: Curva analítica para a detecção amperométrica de H_2O_2 com um eletrodo modificado com o híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre. E_{apl} : 0,0 V.

Tabela 2: Sensibilidades na detecção de peróxido de hidrogênio obtidas com eletrodos modificados com os compostos estudados.

Composto	Sensibilidade / $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2} *$
HCNFeCu	0,14
PPy/HCNFeCu	899,41
Azul da Prússia	340,00

* Todos os dados foram medidos com o eletrodo operando a 0,0 V vs ECS, num eletrólito aquoso contendo KCl 0,1 mol L⁻¹.

Com o intuito de estudar com mais detalhes o comportamento analítico dos eletrodos decidiu-se testar o eletrodo num intervalo de concentrações compreendido no intervalo de resposta linear. Os experimentos que serão apresentados a seguir foram realizados adicionando alíquotas de peróxido de hidrogênio de modo a produzir um incremento na concentração de 0,025 mmol L⁻¹ por cada adição. Em cada teste fizeram-se 20 adições, ou seja, examinando o comportamento do eletrodo entre 0,025 e 0,500 mmol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio. Na Fig. 52 é mostrada o cronoamperograma para a detecção de peróxido de hidrogênio neste intervalo de concentrações.

Figura 52: Detecção amperométrica de H_2O_2 com um eletrodo modificado com o híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre. E_{apl} : 0,0 V.

A curva analítica correspondente é mostrada na Fig. 53. Neste caso, a sensibilidade foi menor que a obtida anteriormente, apresentando um valor de $606,73 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$ com um limite de detecção –calculado como três vezes o desvio padrão da inclinação– de $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 . Depois da primeira determinação, o eletrodo foi lavado com água ultra-pura e o experimento foi repetido. Surpreendentemente, o eletrodo melhorou a sensibilidade em relação ao experimento anterior, mostrando um valor de $726,39 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$, com um limite de detecção de $13 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 . Este experimento também é mostrado na Fig. 53.

Figura 53: Curvas analíticas para a detecção amperométrica de H_2O_2 com um eletrodo modificado com o híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre, obtidas em forma consecutiva: (○) primeiro, (□) segundo e, (△) terceiro experimento. E_{apl} : 0,0 V.

O mesmo eletrodo foi mergulhado em uma solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e conservado a 4°C durante 2 dias, período após o qual repetiu-se o experimento de detecção de H_2O_2 . Este experimento também é mostrado na Fig. 53, onde podemos observar que o comportamento do eletrodo continua sendo muito bom, em termos de linearidade. A sensibilidade continuou crescendo, mostrando um valor de $832,91 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$, com um limite de detecção de $6 \mu\text{mol L}^{-1}$. Aparentemente, ocorre um processo de estabilização do hexacianoferrato de cobre quando é deixado em repouso dentro do eletrólito.

3.5.2 – Eletroatividade do polipirrol vs desempenho analítico

No caso do polipirrol/hexacianoferrato de níquel (Seção 3.4), foi demonstrado que a melhora no desempenho analítico do híbrido, quando comparado com o composto inorgânico sozinho, se deve ao incremento nas condutividades eletrônicas e iônicas do filme provocado pela presença do polímero condutor. No caso do compósito híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre, a melhora no desempenho analítico também pode ser atribuída à eletroatividade do polipirrol, uma vez que experimentos de espectroscopia de impedância eletroquímica mostraram resultados semelhantes aos obtidos com o híbrido HCNFeNi/PPy⁸⁸. No caso do HCNFeCu, esse aumento é mais drástico que para o híbrido polipirrol/hexacianoferrato de níquel, mostrando valores de sensibilidade inclusive maiores que o azul da Prússia. Assim, foi encontrado um material que permite detectar H₂O₂ com sensibilidades similares ao azul da Prússia, mas que também permite trabalhar em eletrólitos contendo Na⁺. Desafortunadamente, o novo material também apresenta uma desvantagem que deve ser levada em conta do ponto de vista prático, uma vez que exibe um comportamento linear só até 1,0 mmol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio.

3.5.3 - Biossensor de glicose baseado no híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre

Finalmente, o híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre foi utilizado na construção de biossensores.

A enzima foi imobilizada com glutaraldeído, sobre um eletrodo de carbono vítreo modificado com o híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre. Para tal, foi preparada uma

solução contendo glicose oxidase 5 mg mL^{-1} + albumina 20 mg mL^{-1} ; seguidamente, $10 \text{ }\mu\text{L}$ desta solução foram misturados com $5 \text{ }\mu\text{L}$ de glutaraldeído 2,5 % para formar a solução modificadora. Logo, $10 \text{ }\mu\text{L}$ desta solução modificadora foram depositados sobre um eletrodo de carbono vítreo o qual foi deixado a temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente. Seguidamente, o eletrodo foi lavado com água ultra pura e utilizado nos testes de detecção amperométrica de glicose. Os testes amperométricos foram feitos em eletrólito contendo tampão fosfato pH 7 + NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, polarizando o eletrodo a $0,0 \text{ V vs ECS}$.

Na Fig. 54 é mostrada a curva analítica para a detecção de glicose, onde pode ser observado um comportamento linear até $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. A sensibilidade obtida neste caso foi $34,92 \text{ }\mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$. Este valor é muito satisfatório, como veremos na secção seguinte.

Este valor é muito satisfatório uma vez que é maior que os valores obtidos com os biossensores baseados na imobilização de glicose oxidase por automontagem camada por camada (LBL) sobre eletrodos de ITO modificados com azul da Prússia ⁸⁹, que serão descritos na secção seguinte. Ainda comparando com os biossensores obtidos por LBL, também é possível observar uma melhora significativa no limite de detecção, uma vez que o valor obtido com o presente biossensor é de $5,4 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose, ou seja, um valor quase 40 vezes menor que os $200 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ exibidos pelos biossensores elaborados por montagem eletrostática camada por camada. Entretanto, o biossensor baseado no híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre apresenta uma limitação: o pequeno intervalo de comportamento linear. Enquanto biossensores para glicose elaborados por LBL apresentam um intervalo de comportamento linear entre $0,1$ e $6,0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose⁸⁹, o biossensor

aqui apresentado se comporta linearmente só até $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, tal como pode ser observado na Figura 54.

Figura 54: Curva analítica obtida com um biossensor baseado no híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre. $E_{ap} = 0,0 \text{ V}$. Tampão fosfato pH 7 + NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

O comportamento observado na Fig. 54 é típico de uma reação enzimática, onde é atingido o valor de V_{max} . Entretanto, como foi demonstrado na secção 3.5.3, o híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre apresenta comportamento linear só até $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ na detecção de peróxido de hidrogênio, portanto, o comportamento observado na Figura 54 pode ser devido à cinética enzimática, como também ao desempenho do compósito polipirrol/hexacianoferrato de cobre na detecção de peróxido de hidrogênio. O próximo passo foi elucidar se o comportamento observado na Fig. 54 é causado pelo mecanismo da reação enzimática ou por uma limitação do mediador na detecção do

peróxido de hidrogênio. Para tal, foram construídos mais dois biossensores modificando a quantidade de enzima imobilizada. Se a responsável pelo comportamento observado fosse a reação enzimática, ao variar a quantidade de enzima imobilizada deveria se observar uma modificação no valor de $V_{\max}$, uma vez que este valor depende da concentração total de enzima. Para tal, foi preparada uma nova solução modificadora, misturando duas partes de uma solução de Glicose Oxidase 10 mg mL^{-1} + albumina 20 mg mL^{-1} com uma parte de solução aquosa de glutaraldeído 2,5 %. Para a preparação dos biossensores foram utilizados 10 e 20 μL da solução modificadora, da mesma forma que no caso anterior, produzindo um biossensor com o dobro (biossensor 2) e outro com 4 vezes a quantidade de enzima utilizada no primeiro caso (biossensor 3). Os três sensores apresentaram comportamento linear até $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose, independentemente da quantidade de enzima imobilizada, ou seja, o compósito híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre utilizado como mediador é o responsável pela limitada faixa de comportamento linear. As sensibilidades obtidas foram de $47,88 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$ para o biossensor 2 e de $31,64 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$ para o biossensor 3; a melhora na sensibilidade do biossensor 2 com relação ao primeiro caso é devida à imobilização de maior quantidade de enzima, enquanto que o decréscimo na sensibilidade observada pelo biossensor 3 pode ser explicado em função da dificuldade no transporte de massa, causada pela presença de um filme polimérico muito espesso.

Por último, foi testada a estabilidade do sensor desenvolvido. Para isso, utilizou-se a mesma metodologia que no caso do biossensor 2, uma vez que essa configuração apresentou os melhores resultados. Realizou-se uma determinação com o biossensor logo

após sua preparação e depois foi mantido em tampão fosfato pH 7 e a 4°C. Repetiram-se as determinações após três e quatro dias de armazenamento.

Logo após da preparação do biossensor, observou-se um intervalo de resposta linear entre 0,1 e 1,0 mmol L⁻¹ de glicose e uma sensibilidade de 40,14 µA mmol⁻¹ L cm⁻².

As sensibilidades obtidas depois de dois e três dias de armazenamento foram similares, observando-se valores de 40,14; 38,70 e 40,84 µA mmol⁻¹ L cm⁻², para o sensor logo após a sua preparação e depois de três e quatro dias de armazenagem, respectivamente. Entretanto, o intervalo de comportamento linear diminuiu gradativamente; logo após a sua preparação o sensor mostrou um intervalo linear entre 0,1 e 1,0 mmol L⁻¹ de glicose, enquanto para as determinações feitas depois de três e quatro dias o valor máximo do intervalo diminuiu para 0,8 e 0,6 mmol L⁻¹, respectivamente. Este comportamento pode ser atribuído à perda da enzima causada por uma ineficiente imobilização da enzima, uma vez que, tal como foi demonstrado no item 3.5.3, o híbrido polipirrol/hexacianoferrato de cobre é estável e não exhibe perda de atividade quando armazenado de um dia para outro.

3.6 - Filmes automontados

A imobilização da enzima é um dos pontos mais importantes a ser considerado no planejamento de biossensores. O procedimento escolhido para imobilizar a enzima deve ser capaz de estabilizar a macromolécula, permitir a difusão de substratos e produtos como também assegurar uma transferência de elétrons eficiente⁹⁰. Assim sendo, se faz necessário a utilização de técnicas que permitam a otimização da imobilização das biomoléculas, ou seja, imobilizar a maior quantidade de enzima no menor espaço possível, com a possibilidade de se obter resolução espacial e estruturas regulares. Em relação ao isto, a imobilização de enzimas por automontagem de multicamadas se apresenta como uma técnica muito promissora.

O procedimento de automontagem, que foi primeiramente reportado por Decher e col., está baseado nas interações eletrostáticas entre macromoléculas iônicas de diferentes cargas⁹¹⁻⁹⁶.

A estrutura de multicamadas é construída pela intercalação alternada de camadas de polieletrólitos positivos e negativos⁹⁷⁻¹⁰². Os polieletrólitos são polímeros solúveis em água. Esses compostos existem em forma de sal e em água se encontram dissociados em cadeias poliméricas contendo grupos iônicos e contra-íons.

A Fig. 55 ilustra a seqüência de deposição das camadas automontadas de polieletrólitos. O processo começa com a deposição de uma camada positiva (por exemplo) sobre uma superfície carregada negativamente. As cadeias do polímero se fixam na superfície a causa das interações eletrostáticas entre os grupos carregados do polímero e os sítios da superfície com carga negativa (Fig 55 A e 55 B). A continuação se adsorve o

poliânion (Fig 55 C) e os processos são repetidos até obter o número de bicamadas desejadas. O procedimento experimental é extremamente simples e consiste em mergulhar alternadamente o substrato nas soluções do policátion e do poliânion.

Para a elaboração de biossensores enzimáticos pelo método de automontagem um dos polííons é substituído por uma enzima ^{103, 104}. Dependendo do pH do meio e do ponto isoeletrico da enzima, esta poderá apresentar um excesso de carga negativa ou positiva.

Figura 55: Deposição de polieletrólitos por automontagem. (A) Aproximação da primeira camada sobre a superfície carregada negativamente. (B) Adsorção e estabilização do policátion. (C) Adsorção da camada de poliânion.

Decidimos estudar a imobilização da enzima glicose oxidase pelo método de automontagem. O ponto isoeletrico desta enzima é 4,2, ou seja, apresentará carga negativa a valores de pH maiores que 4,2. Por outro lado, o pH ótimo para o funcionamento desta

enzima é 7. Por esses motivos, decidiu-se trabalhar a pH 7, utilizando PAH (Fig 56) como polycation.

Figura 56: Estrutura do polycation poli(hidrocloreto de alilamina) (PAH).

Os estudos foram iniciados utilizando eletrodos de vidro recobertos com ITO (óxido de estanho dopado com índio). Esta escolha se deve a vários motivos: (1) Os eletrodos de ITO são transparentes, o que possibilita o monitoramento do crescimento dos filmes através da espectroscopia UV-Vis. (2) O ITO, da mesma forma que o Al-Al₂O₃ e TiO₂, apresentam um excesso de carga negativa, eliminando a necessidade de qualquer tratamento. (3) O formato do eletrodo facilita o processo de deposição.

Para a deposição utilizaram-se soluções de glicose oxidase e PAH, ambas com concentração 0,5 mg mL⁻¹. Os filmes foram preparados mergulhando os eletrodos alternativamente nas soluções de PAH e enzima durante 4 minutos. Depois de cada deposição, o sistema substrato/filme foi mergulhado na solução de lavagem durante 1 minuto e seco com uma corrente de N₂.

Para monitorar o crescimento foram realizados espectros UV-Vis após a deposição de cada bicamada. Como pode ser observado na Fig. 57, registrou-se um aumento na

intensidade das bandas conforme aumentou o número de bicamadas depositadas, fato que corrobora a formação dos filmes.

Figura 57: Espectros UV-Vis para os filmes automontados de glicose oxidase e PAH.

Foram feitos testes para a detecção de glicose com o eletrodo obtido. Para tal, o eletrodo foi colocado numa célula eletroquímica convencional contendo solução tampão fosfato pH 7, utilizando uma espiral de platina como contra-eletrodo e um eletrodo e Ag/AgCl como referencia. O eletrodo foi polarizado a 0,65 V (mantendo a solução tampão sob agitação constante) e foram adicionadas alíquotas de solução de glicose, de maneira a provocar incrementos de 1 mmol L^{-1} em cada adição.

Embora a imobilização da enzima tenha ocorrido, nas condições, apresentadas o eletrodo não apresentou resposta frente à glicose. Este problema foi atribuído à dificuldade do H_2O_2 formado na reação enzimática se oxidar na superfície do ITO.

A alternativa para resolver o problema foi a modificação da superfície do ITO com azul da Prússia. A Azul da Prússia é um composto aniônico, o que permitiria utilizá-lo como substrato para a montagem das camadas de GOx e PAH, e resolveria o problema da detecção do peróxido, devido as já exploradas propriedades eletrocatalíticas.

3.6.1 - Filmes automontados em eletrodos de ITO modificados com Azul da Prússia

O método de deposição dos filmes automontados de glicose oxidase e PAH foi similar ao utilizado na secção anterior. Neste caso, não foi possível monitorar o crescimento através da espectroscopia UV-Vis, uma vez que a intensa absorção do azul da Prússia não permitiu observar as pequenas variações e absorbância que são provocadas pela deposição dos filmes.

Foi elaborado um eletrodo depositando 10 bicamadas de glicose oxidase e PAH. O eletrodo resultante foi utilizado para a detecção de glicose, utilizando o mesmo arranjo experimental previamente utilizado com o eletrodo sem azul da Prússia e polarizando a 0,05 V ao invés de 0,65 V. Apesar de não se observar a deposição dos filmes por espectroscopia UV-Vis, podemos corroborar a presença da enzima devido à detecção de glicose, como demonstrado na Fig. 58.

Figura 58: Resposta amperométrica na detecção de glicose com um eletrodo automontado de Glicose Oxidase e PAH (10 bicamadas). Cada patamar corresponde a um incremento de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ na concentração de glicose. Meio: tampão fosfato pH 7 (agitado). Potencial de operação: $0,05 \text{ V}$ vs Ag/AgCl.

3.6.2 - Estudo dos interferentes

O biossensor foi exposto aos ácidos ascórbico e úrico, além do paracetamol, para que se pudesse avaliar a extensão da interferência provocada por esses compostos. Para este fim, os compostos foram adicionados durante um teste de detecção e glicose.

Figura 59: Resposta amperométrica do biossensor na presença de (A) ácido ascórbico; (B) paracetamol e, (C) ácido úrico. Cada patamar de corrente corresponde a um incremento de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ na concentração de glicose. As adições dos interferentes estão indicadas por setas. Pot. aplicado: $0,05 \text{ V}$ vs Ag/AgCl .

Na Fig. 59 (A) é mostrado um experimento de detecção de glicose, durante o qual foi adicionado à célula eletroquímica 1 mmol L^{-1} de ácido ascórbico (denotado por setas). Como pode ser observado, o ácido ascórbico não produz nenhum tipo de interferência durante o processo de detecção de glicose. Da mesma forma, foi estudado o comportamento do sensor frente ao agregado de 1 mmol L^{-1} de paracetamol e de 1 mmol L^{-1} de ácido úrico (figuras 59(B) e 59(C) respectivamente), compostos que também não interferiram no desempenho do biossensor.

Portanto, a utilização do azul da Prússia não só permitiu o funcionamento do biossensor, como também elimina a interferência provocada pelos compostos ascorbato, urato e paracetamol, uma vez que permite a operação do sensor em potenciais onde não ocorre a descarga de nenhum destes compostos..

3.6.3 - Influência do número de bicamadas no desempenho analítico

Foi estudado o efeito do número de bicamadas depositadas sobre o desempenho analítico do sensor. Para tal, foram elaborados três eletrodos, com 4, 10 e 14 bicamadas de glicose oxidase e PAH. As respostas amperométricas obtidas com estes eletrodos são mostradas na Fig 60. Como demonstrado, ocorre um aumento na sensibilidade com o incremento do número de bicamadas depositadas, devido ao aumento da quantidade de enzima imobilizada no eletrodo.

Figura 60: Curvas de calibração obtidas com eletrodos automontados de Glicose Oxidase e PAH. (○) 4 bicamadas; (□) 10 bicamadas e, (△) 14 bicamadas. Potencial aplicado: 0,05 V vs Ag/AgCl. Meio: solução tampão fosfato (0,1 mmol L⁻¹, pH 7)

Os três biossensores apresentaram respostas com intervalo de comportamento linear entre 0,05 e 6,00 mmol L⁻¹ de glicose. As sensibilidades obtidas foram 8,20; 16,50 e 23,40 $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$ para os eletrodos com 4, 10 e 14 bicamadas, respectivamente.

3.6.4 - Estabilidade

Como dito anteriormente, a imobilização de enzimas pelo método de automontagem possui a vantagem de que as espessuras dos filmes podem ser controladas a nível molecular. Uma outra vantagem é que este método produz filmes mecanicamente mais estáveis do que outros procedimentos, tais como deposição por Langmuir-Blodgett,

deposição por spin-coating ou técnicas de casting. Isto ocorre devido a que as interações, tanto entre as camadas como entre a primeira camada e a superfície do eletrodo, são de origem eletrostática, enquanto que os outros métodos produzem filmes onde predominam as interações de Van der Waals.

Para os estudos de estabilidade utilizaram-se dois biossensores, um deles foi armazenado em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7) a 4°C , enquanto o segundo eletrodo foi armazenado ao ar e a 4°C .

O sensor que foi mantido na solução reguladora não apresentou nenhuma perda de atividade depois de 18 dias, tal como mostra a Fig. 61, demonstrando a boa estabilidade dos filmes preparados com o método de automontagem eletrostática. Por sua vez, o eletrodo que foi armazenado ao ar sofreu uma queda de 50% na sensibilidade durante este tempo, como também pode ser observado na Fig. 61.

Figura 61: Estabilidade dos sensores automontados. Efeito da armazenagem.
(○) Armazenado em solução tampão fosfato pH 7. (▽) Armazenado ao ar.

3.7 - Nanopartículas de azul da Prússia

Tal como discutido na introdução, as nanopartículas apresentam propriedades que não são exibidas pelos correspondentes materiais massivos, fato que abre um novo e promissor campo na área do desenvolvimento de sensores químicos e biossensores. Além disso, a utilização de nanopartículas permitirá a elaboração de novas arquiteturas na montagem dos biossensores.

Por se tratar de materiais novos e relativamente pouco estudados, se faz necessário o investimento de tempo e esforço na síntese e caracterização destes materiais. Depois de estudar exaustivamente estes pontos, os materiais poderão ser utilizados na construção dos dispositivos. O azul da Prússia se apresenta como um excelente candidato, devido as suas já discutidas propriedades eletrocatalíticas, assim como ao fato de que durante a síntese química do AP são formadas dispersões coloidais, ou seja, se formam partículas de tamanho reduzido, sendo necessário achar um método que permita manipular o tamanho, forma e distribuição de tamanho dessas partículas.

3.7.1 - Síntese sem ultra som

3.7.1.1 - Síntese

Numa primeira tentativa, as nanopartículas foram sintetizadas de acordo com o procedimento descrito na literatura por Liu e col.¹⁰⁵. Assim, 40,0 mL de FeCl_3 $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} são misturados com um leve excesso de H_2O_2 para dar a solução I; analogamente, 40,0

mL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ são misturados com um pequeno excesso de H_2O_2 para dar a solução II. Quando ambas soluções são misturadas sob agitação, é observada a aparição do azul da Prússia acompanhada do desprendimento de bolhas de gás. A formação do azul da Prússia pode ser representada pela Equação 7:

Ao deixar em repouso a suspensão resultante, observou-se a completa sedimentação do azul da Prússia após aproximadamente 10 minutos. Com o intuito de aumentar a estabilidade da suspensão, esta foi submetida a diálise. Para tal, a suspensão foi colocada numa membrana de celofane e submersa num becker com água ultrapura mantida sob agitação. Este procedimento foi seguido durante 5 dias, trocando a água do recipiente uma vez por dia. Depois da diálise, a suspensão mostrou-se mais estável. Quando deixada em repouso a suspensão continuou a sedimentar, embora com uma velocidade muito menor, uma vez que a sedimentação (parcial) só foi observada quando a dispersão foi deixada de um dia para outro.

As partículas resultantes do processo citado acima foram examinadas por microscopia eletrônica de transmissão. Para isso, uma alíquota da suspensão de azul da Prússia (1 mg mL^{-1}) foi colocada sobre uma grade de cobre coberta com carbono amorfo e examinada no microscópio. Os resultados são mostrados na Fig. 62.

Figura 62: Micrografias eletrônicas de transmissão do azul da Prússia sintetizado sem a assistência do ultrasom.

Como pode ser observado, o procedimento resultou em estruturas de forma irregular e com tamanho de aproximadamente 500 nm, contrastando com os resultados apresentados por Liu et al.¹⁰⁵, onde reportam a síntese de partículas esféricas com tamanhos em torno aos 50 nm.

As estruturas mostradas na Fig. 62 na realidade são um conglomerado de partículas menores. Este fato foi comprovado mediante a utilização da técnica de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM).

Através de imagens HRTEM podemos obter visualização direta da estrutura atômica de partículas, mas é necessário que alguns pontos sejam ressaltados quanto à sua interpretação. Quando o feixe de elétrons passa por um cristal fino orientado, o contraste da imagem reproduz, em primeira aproximação, a periodicidade e simetria do potencial da amostra naquela orientação. Esses por sua vez, estão diretamente relacionados com a estrutura do cristal. Num material amorfo ou cristalino desorientado, o potencial projetado não tem periodicidade definida, não sendo possível obter informação estrutural da imagem, devido a que na microscopia eletrônica de transmissão obtém-se só a projeção das colunas de átomos e somente é possível identificar o arranjo atômico de uma dada partícula se ela estiver orientada em relação ao feixe de elétrons. A grade de microscopia é preparada a partir de uma solução coloidal e apresenta partículas aleatoriamente orientadas e, portanto, somente algumas delas contribuirão para um estudo estrutural.

Esta técnica permitiu obter detalhes das estruturas mostradas anteriormente. Na Fig. 63 é mostrada uma micrografia HRTEM, onde podemos observar que o material está constituído por domínios cristalinos (regiões sinalizadas por círculos), ou seja, a estrutura do azul da Prússia formado resulta em nanopartículas que se aglomeram para dar lugar a estruturas de aproximadamente 500 nm.

Figura 63: Micrografia eletrônica de transmissão de alta resolução do azul da Prússia sintetizado sem ultra-som.

3.7.1.2 - Imobilização das partículas de azul da Prússia

Para poder estudar as propriedades eletroquímicas das partículas de azul da Prússia é preciso imobilizá-las sobre algum tipo de eletrodo. Aproveitando o fato de o azul da prússia apresentar um excesso de cargas negativas na sua superfície, as partículas desse material podem ser imobilizadas através da técnica de montagem camada por camada, intercalando-as com algum polycation. O azul da Prússia foi imobilizado intercalando-o com poli(hidrocloreto de alilamina) (PAH) sobre eletrodos de ITO, seguindo o procedimento de automontagem introduzido anteriormente para a imobilização da glicose oxidase.

A cor típica do azul da Prússia é devido à absorção por transferência de carga, representada na seguinte equação:

A banda de absorção do azul da Prússia depositado sobre ITO resultante deste processo apresenta um valor máximo em aproximadamente 700 nm. Na Fig. 64 é mostrado o espectro de absorção UV-Vis de um filme de azul da Prússia formado sobre um eletrodo de ITO, mergulhando o eletrodo alternadamente em soluções contendo íons ferrocianeto e Fe^{3+} , com um máximo de absorção em 710,1 nm.

Figura 64: Espectro UV-Vis de um filme de azul da Prússia formado sobre um eletrodo de ITO. $\lambda_{\text{max}}=710,1$ nm.

Portanto, o crescimento dos filmes de partículas de azul da Prússia e PAH depositados através da técnica de automontagem pode ser monitorado através da variação na absorbância dos filmes a 710,1 nm.

Em primeiro lugar, utilizamos a espectroscopia UV-Vis para o estudo da cinética de absorção de uma monocamada de azul da Prússia sobre um eletrodo previamente modificado com PAH. Para isso, um eletrodo de ITO foi mergulhado durante 5 minutos numa solução $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de PAH, lavado, seco e posteriormente submerso numa dispersão de 10 mg mL^{-1} de azul da Prússia, registrando os espectros UV-Vis a cada 5 minutos. A Fig. 65 mostra a evolução do valor de absorbância registrada a 710,1 nm com o tempo de imersão na suspensão de azul da Prússia. Como pode observar-se, a absorbância aumenta com o tempo de imersão, até alcançar um valor estacionário depois de aproximadamente 45 minutos, indicando a saturação do processo de adsorção.

Figura 65: Variação da absorbância medida a 710,1 nm em função do tempo de imersão na suspensão de azul da Prússia (10 mg mL^{-1}).

Embora o tempo necessário para a saturação da superfície com azul da Prússia seja de aproximadamente 45 minutos, por uma questão de praticidade todos os experimentos subseqüentes foram feitos deixando o substrato imerso na suspensão de azul da Prússia durante 5 minutos. Como será demonstrado a continuação, este tempo é suficiente para formar bom filmes, conseguindo imobilizar a mesma quantidade de azul da Prússia em cada camada, simplesmente controlando cuidadosamente o tempo de deposição.

Devido ao fato do ITO apresentar excesso de carga negativa, a primeira camada foi sempre de PAH. A montagem foi feita da seguinte maneira: (1) imersão do substrato numa solução de PAH $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ durante 5 minutos; (2) lavagem com água ultrapura durante 1 minuto e seco com uma corrente de N_2 ; (3) imersão do substrato numa dispersão de AP 10 mg mL^{-1} durante 5 minutos e; (4) lavagem com água ultrapura durante 1 minuto e seco com uma corrente de N_2 . Estas operações foram repetidas até atingir o número desejado de bicamadas.

Na Fig. 66 são mostrados os espectros de absorção registrados depois da deposição de cada bicamada de AP/PAH, onde pode ser observado o aumento do máximo de absorção conforme aumenta o número de bicamadas depositadas. A relação entre a absorbância medida em $710,1 \text{ nm}$ e o número de bicamadas é mostrado na Fig. 67, onde se pode observar uma relação linear com o numero de bicamadas, o que indica que a quantidade de AP imobilizada em cada camada é aproximadamente a mesma.

Figura 66: Espectros de absorvância registrados depois da deposição de cada bicamada de PAH/AP

Figura 67: Relação entre a absorvância (710,1 nm) em função do número de bicamadas de PAH/AP.

Portanto, partículas de azul da Prússia podem ser imobilizadas sobre eletrodos de ITO utilizando PAH como um “adesivo policationico”.

Foram feitos voltamogramas cíclicos dos filmes de PAH/AP depois da deposição de cada bicamada e os resultados são mostrados na Fig. 68. Como pode ser observado, em todos os casos aparecem um par de picos bem definidos, correspondentes a interconversão entre azul da Prússia e branco da Prússia, com um progressivo aumento da corrente conforme aumenta o número de bicamadas depositadas. Este resultado sugere a existência de conexão elétrica entre as camadas de azul da Prússia.

Figura 68: Voltamogramas cíclicos de filmes de PAH/AP automontados sobre eletrodos de ITO com 1; 3; 5; 7 e 9 bicamadas de PAH/AP. v : 50 mV s^{-1} .

Este comportamento pode ser explicado em função da estrutura dos filmes automontados. É conhecido o fato dos filmes automontados de polieletrólitos apresentarem uma estrutura interpenetrante⁹¹, com uma superposição entre as camadas adjacentes. A interpenetração pode ser definida pela distribuição das camadas ao longo da superfície normal, tal como é mostrado na Fig. 69. Em nosso caso, teríamos a interpenetração das nanopartículas e as camadas do polycation PAH.

Figura 69: Modelo da distribuição em multicamadas de polieletrólitos ao longo da superfície normal. As curvas pontilhadas representam aos policátions e as curvas sólidas os poliânions.

Esta interpretação foi confirmada através da utilização da microscopia eletrônica de varredura. Para isso, tiraram-se micrografias de filmes automontados de PAH e partículas de azul d Prússia em duas condições: (a) quando a última camada é o azul da Prússia e; (b) quando a última camada é o PAH. Na Fig. 70 é mostrada a micrografia de um filme com 10 bicamadas de PAH/AP, sendo a última de azul da Prússia. Como pode ser observado, existe uma distribuição homogênea de partículas de AP em toda a superfície, com regiões em forma de “montanhas” (regiões claras) de partículas de AP e lugares onde não há partículas adsorvidas (regiões lisas, mais escuras), correspondentes à camada de PAH imediatamente debaixo da camada de AP.

Figura 70: Micrografia eletrônica de varredura de um filme composto por 10 bicamadas de PAH/AP, onde a última camada depositada foi a de azul da Prússia.

Por outro lado, a Fig. 71 mostra a micrografia eletrônica de varredura obtida ao examinar um filme onde a última camada depositada é de PAH. Essa micrografia revela uma superfície lisa com algumas estruturas isoladas, similares às mostradas na Fig 70. Estas estruturas correspondem aos picos das “montanhas” de azul da Prússia que emergem na camada de PAH. Portanto, a transferência de elétrons entre as camadas de azul da Prússia ocorre devido à interpenetração das camadas dos filmes automontados, fato que permite o contato entre as camadas subjacentes de azul da Prússia.

Figura 71: Micrografia eletrônica de varredura de um filme composto por 10 bicamadas de PAH/AP, onde a última camada depositada foi PAH.

3.7.1.3 - Detecção de H_2O_2

Como esperado, os filmes mostraram atividade eletrocatalítica na detecção amperométrica de peróxido de hidrogênio. Na Fig. 72 são mostrados voltagromogramas de um filme de dez bicamadas de PAH/AP, registrados na presença e na ausência de 1 mmol L^{-1} de H_2O_2 . Na ausência de H_2O_2 podemos observar um par de picos bem definidos correspondentes à redução de azul a Prússia para dar Branco da Prússia e vice-versa. A introdução de H_2O_2 produz uma mudança drástica no voltamograma, com um obvio incremento na corrente catódica como consequência da redução de H_2O_2 .

Figura 72: Voltamogramas cíclicos de um eletrodo de ITO modificado com 10 bicamadas de PAH/AP registrados na ausência (Δ) e na presença ($\circ$) de 1 mmol L^{-1} de H_2O_2 . $v=50 \text{ mV s}^{-1}$.

3.7.2 - Síntese com ultra som

3.7.2.1 – Síntese das nanopartículas

Como foi demonstrado na seção anterior, foi possível a síntese e caracterização de partículas de azul da Prússia de aproximadamente 500 nm. Entretanto, o nosso objetivo sempre foi a obtenção de nanopartículas menores, com uma melhor distribuição de tamanho e forma, visando a obtenção de novos materiais para a sua aplicação em biossensores.

Da mesma forma que no caso apresentado no item 1.1, a suspensão resultante sedimentou, porém muito mais lentamente, só observando-se precipitado quando a dispersão foi deixada de um dia para outro. Depois do processo de diálise (aplicando o procedimento já mencionado) a suspensão foi estável durante semanas.

O azul da Prússia resultante foi estudado por difração de raios X de pó. Assim, uma alíquota de 2 mL de dispersão foi centrifugada a 14000 RPM durante 5 horas, descartando o sobrenadante e evaporando o resto de água numa estufa de vácuo (30° C, 100 mbar). O difractograma resultante é mostrado na Fig. 73, onde os picos de Bragg observados são consistentes com os picos do azul da Prússia (Joint Committee on Powder Diffraction Standards, Card N° 1-0239). Um padrão de difração como o obtido, com picos largos, é característico de partículas com tamanho nanométrico¹¹⁸; cristais maiores (com tamanhos da ordem de μm) apresentam picos estreitos.

Figura 73: Padrão de difração do AP sintetizado com assistência de ultra-som.

Foram feitas micrografias eletrônicas de transmissão de alta resolução com o intuito de elucidar o tamanho e a forma das partículas de azul da Prússia preparadas sonoquimicamente. Para tal, uma alíquota da suspensão de azul da Prússia (1 mg mL^{-1}) foi colocada sobre uma grade de ouro coberta com carbono amorfo e examinada no microscópio. Os resultados são mostrados na Fig. 74, onde pode ser observada a presença de nanopartículas esféricas com um diâmetro de aproximadamente 5 nm e completamente cristalinas. Ou seja, a utilização do ultra-som permitiu obter partículas 100 vezes menores que no caso da síntese sem a assistência do mesmo.

Podemos afirmar que combinação da síntese sonoquímica com a técnica de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução foi um “casamento” perfeito, uma vez que conseguimos demonstrar que a utilização de ultra-som permite a formação de nanopartículas de azul da Prússia ao mesmo tempo que foi possível mostrar micrografias inéditas destas nanopartículas, evidenciando detalhes estruturais das mesmas. No trabalho de Liu e col., no qual foi baseada a técnica de síntese aqui mostrada, só mostram micrografias eletrônicas de varredura, obviamente não chegando ao nível de detalhes aqui apresentado.

Figura 74: Micrografias eletrônicas de transmissão de alta resolução das nanopartículas de azul da Prússia obtidas com ultra-som.

Todos os experimentos feitos até o momento foram executados com um banho de ultra-som convencional, sem nenhum tipo de controle na frequência e/ou potência da radiação utilizada.

3.7.2.2 - Imobilização das nanopartículas

As nanopartículas sintetizadas pelo método do ultra-som foram imobilizadas através da automontagem camada por camada, com o mesmo procedimento que o utilizado na seção 3.7.12. Na Figura 75 são mostrados os espectros UV-Vis registrados durante o crescimento dos filmes. Como pode ser observado na Fig. 76, os valores de absorbância (medidos a 710,2 nm) representados em função do número de bicamadas apresentam melhor linearidade que no caso das partículas de 500 nm apresentadas anteriormente. Este comportamento pode ser atribuído a uma melhora na distribuição das partículas, obtendo-se filmes mais homogêneos.

Figura 75: Espectros de absorbância registrados depois da deposição de cada bicamada de PAH e AP sintetizado com ultra-som.

Figura 76: Relação entre a absorvância (710,1 nm) em função do número de bicamadas de PAH e AP sintetizado com ultra-som.

3.7.2.3 - Comportamento eletroquímico

Como foi demonstrado no item anterior, as nanopartículas de azul da Prússia de 5 nm de diâmetro também podem ser montadas em estruturas tipo multicamadas através da automontagem eletrostática. Estas nanopartículas foram capazes de formar arquiteturas similares às apresentadas pelas partículas maiores (500 nm), uma vez que também mostraram contato elétrico entre as camadas de azul da Prússia subjacentes. A Fig. 77 mostra os voltamogramas obtidos depois da deposição de cada bicamada. Portanto, as nanopartículas de menor diâmetro também formam estruturas interpenetrantes como o polímero.

Figura 77: Voltamogramas cíclicos de filmes de PAH e AP sintetizado com ultra-som automontados sobre eletrodos de ITO com 1; 2; 3; 4 e 5 bicamadas de PAH/AP. v : 50 mV s^{-1} .

3.7.2.4 - Detecção de H_2O_2 .

Eletrodos de ITO suportando filmes automontados de PAH e nanopartículas de azul da Prússia foram utilizados para detectar H_2O_2 , utilizando o mesmo procedimento que no caso apresentado na seção 1.1. Foram realizadas determinações com filmes compostos por 5, 10 e 15 bicamadas de PAH/AP. Na Fig. 78 são apresentadas as curvas analíticas obtidas.

Figura 78: Curvas analíticas obtidas na detecção de H₂O₂ com: (□) 5; (▽) 10 e; (○) 15 bicamadas de PAH e nanopartículas de AP (5 nm) depositadas sobre um eletrodo de ITO.

Como pode ser observado, a sensibilidade do eletrodo na detecção de H₂O₂ variou com a quantidade de AP depositado, mostrando valores de 35,4; 76,8 e 103,5 μA mmol⁻¹ L cm⁻² para filmes com 5, 10 e 15 bicamadas, respectivamente. Devido ao fato da sensibilidade aumentar com o número de bicamadas de PAH/AP, ou mais especificamente com a quantidade de AP imobilizado, a sensibilidade do eletrodo de PAH/AP pode ser ajustada ao valor desejado simplesmente variando a quantidade de bicamadas depositadas. Isto pode ser apresentado como a principal vantagem dos eletrodos produzidos por automontagem de nanopartículas sobre aqueles onde o azul da Prússia é eletrodepositado, já que neste último caso não é possível “ajustar” a sensibilidade dos mesmos. Para este sistema, não foi possível montar estruturas com mais de 15 bicamadas, uma vez que a partir deste valor os filmes deixam de crescer.

A dependência da sensibilidade com o número de bicamadas evidencia a participação de todas as camadas de nanopartículas na eletroredução do peróxido de hidrogênio. Este fato pode ser atribuído à geometria das nanopartículas, o que permite uma difusão de tipo esférica do peróxido de hidrogênio. Já no caso do azul da Prússia eletrodepositado não se observam mudanças na sensibilidade ao variar a quantidade de material ativo imobilizado, mostrando que a redução do H_2O_2 ocorre fundamentalmente na superfície do eletrodo modificado, onde a difusão será do tipo planar. Esses dois processos estão esquematizados na Figura 79.

Figura 79: Representação esquemática dos processos difusionais do H_2O_2 em: (a) um eletrodo modificado com AP eletrodepositado e; (b) eletrodo modificado com nanopartículas de AP.

3.7.2.5 - Imobilização por casting

O valor de sensibilidade exibido pelos eletrodos é um pouco menor que a sensibilidade do azul da Prússia depositado eletroquimicamente. Como foi descrito anteriormente, um eletrodo de carbono vítreo modificado com azul da Prússia eletrodepositado operou com uma sensibilidade de $340,9 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$. Com o intuito de obter melhores desempenhos na detecção de H_2O_2 , tentamos imobilizar maior quantidade de nanopartículas de AP. Para isso, as nanopartículas foram introduzidas em filmes de

Nafion[®], por meio do seguinte procedimento: 6 μL de uma dispersão de nanopartículas de AP foi colocada sobre um eletrodo de platina junto com 3 μL de uma solução de Nafion (0,5 %); ao deixar evaporar o solvente se forma um filme de Nafion suportando às nanopartículas.

Na Fig. 80 é mostrado o voltamograma de um eletrodo de carbono vítreo, modificado por meio da deposição de 6 μL de uma suspensão 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas de AP e de 3 mL de Nafion 0,5%, onde pode ser observado um par de picos correspondentes a redução do azul da Prússia para branco da Prússia. Esse par de picos mostrou-se estável, permanecendo inalterado depois de ciclar durante 30 minutos a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Figura 80: Voltamograma cíclico de um eletrodo de carbono vítreo onde foram depositados 6 μL de AP 10 mg mL^{-1} e 3 μL de Nafion 0,5%. Eletrólito: KCl 0,1 mol L^{-1} + HCl 0,1 mol L^{-1} ; v: 50 mV s^{-1} .

A Fig. 81 mostra a curva analítica para a detecção de H_2O_2 obtida com um eletrodo modificado com 6 μL de suspensão de azul da Prússia (10 mg mL^{-1}) e 3 μL de Nafion. A sensibilidade obtida neste caso foi de $541,61 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$, ou seja, quase duas vezes mais que com um eletrodo modificado através da eletrodeposição de azul da Prússia ($340,9 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$).

Figura 81: Curva analítica para a detecção de H_2O_2 com um eletrodo de CV modificado com 6 μL de azul da Prússia 10 mg mL^{-1} + 3 μL de Nafion 0,5%. Eletrólito: $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; Potencial de operação: 0,0 V vs. $\text{Ag/AgCl/Cl}^-_{(\text{sat})}$.

Neste tipo de arquitetura, também é possível controlar a sensibilidade do eletrodo através do controle da quantidade de nanopartículas imobilizadas. Para demonstrar isso, foram feitos três eletrodos utilizando diferentes concentrações de nanopartículas (10; 5 e $2,8 \text{ mg mL}^{-1}$). Em todos os casos foram depositados 6 μL da suspensão de azul da Prússia

e 3 μL de Nafion. Na Fig. 82 são mostrados os voltamogramas registrados para cada caso. Os eletrodos mostraram diferentes sensibilidades para a detecção de H_2O_2 , aumentando conforme aumentava a quantidade de nanopartículas imobilizadas. Os valores de sensibilidade foram de 189,06; 228,40 e 462,70 $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$, para os eletrodos modificados com as suspensões de 2,8; 5 e 10 mg mL^{-1} , respectivamente, tal como é mostrado na Figura 83. Este comportamento pode ser apresentado como a principal vantagem da utilização do azul da Prússia nanoparticulado na detecção de peróxido de hidrogênio, conseqüentemente na construção de biossensores enzimáticos amperométricos, já que permite modular a resposta em função da quantidade de nanopartículas imobilizadas. Por outro lado, o fato das nanopartículas poder ser imobilizadas por LBL, que já provou ser útil na imobilização de enzimas, abre um leque de possíveis arquiteturas. A co-imobilização das nanopartículas e de enzimas por LBL permitiria um contato mais íntimo entre o elemento de reconhecimento e o transdutor, levando a uma melhora no desempenho dos dispositivos.

Figura 82: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos de carbono vítreo modificados com 6 μL de nanopartículas de azul da Prússia com concentrações de: (○) 10 mg mL^{-1} , (Δ) 5 mg mL^{-1} e ($\square$) $2,8 \text{ mg mL}^{-1}$. v : 50 mV s^{-1} .

Figura 83: Curvas analíticas obtidas com eletrodos modificados com azul da Prússia ($\square$) 10 mg mL^{-1} ; (○) 5 mg mL^{-1} e (∇) $2,8 \text{ mg mL}^{-1}$. Potencial aplicado: $0,0 \text{ V}$ vs $\text{Ag/AgCl/Cl}^-_{(\text{sat})}$.

No transcurso deste trabalho foram propostas várias alternativas para a construção de biossensores para a determinação de oxalato e de glicose. A maior parte do trabalho foi centrada no estudo de novos materiais para a modificação de eletrodos que permitam aperfeiçoar o desempenho analítico dos sensores, através da minimização de interferências, aumento da sensibilidade e adaptação a diferentes soluções eletrolíticas.

A combinação do azul da Prússia com a polianilina sulfonada (SPAN) na construção do biossensores de oxalato, resultou num dispositivo com elevadas sensibilidades ($131,3 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$) e a eliminação da interferência do urato e a minimização daquela provocada pelo ascorbato. Contudo, este sensor foi incapaz de operar em eletrólitos contendo Na^+ , o que motivou o estudo de novos materiais que permitissem eliminar este problema. Para tal, foram estudados dois análogos do azul da Prússia, o hexacianoferrato de níquel e o hexacianoferrato de cobre. Estes compostos mostraram capacidade de mediar na eletroredução de peróxido, no entanto as sensibilidades obtidas foram muito inferiores aquelas obtidas empregando-se o azul da Prússia. Para melhorar este aspecto, os hexacianoferratos foram combinados com polipirrol, para dar lugar a materiais híbridos, com melhoras surpreendentes no que se refere à eficiência catalítica. Estudos de impedância eletroquímica associaram o aumento de sensibilidade para a detecção de H_2O_2 à eletroatividade do polímero condutor. Estes materiais foram utilizados na construção de biossensores de oxalato e de glicose, em ambos os casos com bom desempenho analítico, que podem operar em eletrólitos contendo elevadas concentrações de Na^+ .

Com o intuito de otimizar o processo de imobilização das enzimas, foi estudado o método de adsorção eletrostática camada por camada (LBL). Esta metodologia foi aplicada na construção de um biossensor para glicose, permitindo obter bom desempenho com pouca quantidade de enzima imobilizada.

Finalmente, foi desenvolvido um método sonoquímico para a síntese de nanopartículas de azul da Prússia com 5 nm de diâmetro. Estas nanopartículas foram imobilizadas através da técnica de automontagem camada por camada, resultando em filmes homogêneos e estáveis, capazes de catalisar a eletroredução de H_2O_2 . Por fim, a técnica de LBL permite sintonizar as propriedades dos biossensores tanto do ponto de vista do reconhecimento molecular, controlando a quantidade de enzima imobilizada, como do ponto de vista da transdução, modulando a resposta do mediador através do controle da quantidade de nanopartículas imobilizadas.

A seguir é apresentada uma tabela resumindo as principais características dos eletrodos estudados no presente trabalho.

Eletrodo	Analito	Potencial aplicado / V	Sensibilidade / $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$	Intervalo de resposta linear / mmol L^{-1}	Comentários
Pt/OXO	Oxalato	0,65	12,5	0,05 – 0,40	Interferência de urato e ascorbato
CV/AP/SPAN/OXO	Oxalato	0,05	131,3	0,05 – 0,40	Elimina a interferência do urato e minimiza a do ascorbato
CV/HCNFeNi/PPy	H ₂ O ₂	0,0	66,54*	0,1 – 1,0	Funcional em eletrólitos contendo Na ⁺
CV/HCNFeNi/PPy/OXO	Oxalato	0,0	21,78*	0,05 – 0,35	Funcional em eletrólitos contendo Na ⁺
CV/HCNFeCu/PPy	H ₂ O ₂	0,0 vs ESC	894,41	0,02 – 1,00	Funcional em eletrólitos contendo Na ⁺
CV/HCNFeCu/PPy/GOX	Glicose	0,0 vs ESC	47,88*	0,02 – 1,00	Funcional em eletrólitos contendo Na ⁺
ITO/AP/(PAH/GOX) ₁₄	Glicose	0,0	23,40	0,5 – 6,0	Imobilização da enzima por automontagem camada por camada

Eletrodo	Analito	Potencial aplicado / V	Sensibilidade / $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$	Intervalo de resposta linear / mmol L^{-1}	Comentários
ITO/(PAH/AP _{nano}) ₁₅	H ₂ O ₂	0,0	103,5	0,05 – 0,50	Imobilização de nanopartículas de azul da Prússia por automontagem camada por camada
ITO/AP/Nafion	H ₂ O ₂	0,0	462,70	0,05 – 0,50	Imobilização de nanopartículas de azul da Prússia por casting

Todos os potenciais vs Ag/AgCl_(sat), excepto quando indicado

* operando em eletrólito suporte contendo 0,1 mol L⁻¹ de Na⁺

1. Janata, J.; Chemical sensors. *Analytical Chemistry* **1992**, 64, (12), 196R-219R.
2. Koncki, R.; Hulanicki, A.; Glab, S.; Biochemical modifications of membrane ion-selective sensors. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* **1997**, 16, (9), 528-536.
3. Clark, L. C., Jr.; Lyons, C.; Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1962**, 102, 29-45.
4. Cammann, K., Bio-sensors based on ion-selective electrodes. *Fresenius' Zeitschrift fuer Analytische Chemie* **1977**, 287, (1), 1-9.
5. Luo, S.; Walt, D. R., Avidin-biotin coupling as a general method for preparing enzyme-based fiber-optic sensors. *Analytical Chemistry* **1989**, 61, (10), 1069-72.
6. Dremel, B. A. A.; Schmid, R. D.; Wolfbeis, O. S., Comparison of two fiber-optic L-glutamate biosensors based on the detection of oxygen or carbon dioxide, and their application in combination with flow-injection analysis to the determination of glutamate. *Analytica Chimica Acta* **1991**, 248, (2), 351-9.
7. Laenge, K.; Rapp, M., Signal amplification for surface acoustic wave (SAW) biosensors by acoustic wave guiding layers and additional mass labeling. *Chemical Sensors* **2004**, 20, (Suppl. B), 204-205.
8. Kovacs, B.; Nagy, G.; Dombi, R.; Toth, K., Optical biosensor for urea with improved response time. *Biosensors & Bioelectronics* **2003**, 18, (2-3), 111-118.
9. Chen, G.; Cao, Z.; Li, X.; Shen, Q., High-sensitivity biosensor based on double metal-cladding waveguide. *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering* **2002**, 4904, (Optical Fiber and Planar Waveguide Technology II), 194-200.

10. Gao, H.; Saenger, M.; Luginbuehl, R.; Sigrist, H., Immunosensing with photoimmobilized immunoreagents on planar optical wave guides. *Biosensors & Bioelectronics* **1995**, 10, (3/4), 317-28.
11. Herlem, G. Method and use of a potentiometric biosensor. 2001-FR1133
2001077656, 20010412., 2001.
12. Merkoci, A.; Fabregas, E.; Alegret, S., Consolidated biocomposite membrane technology for production of potentiometric biosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **1999**, B60, (2-3), 97-105.
13. Fernandes, J. C. B.; Kubota, L. T.; de Oliveira Neto, G., Potentiometric biosensor for L-ascorbic acid based on ascorbate oxidase of natural source immobilized on ethylene-vinylacetate membrane. *Analytica Chimica Acta* **1999**, 385, (1-3), 3-12.
14. Adeloju, S. B.; Shaw, S. J.; Wallace, G. G., Polypyrrole-based potentiometric biosensor for urea. Part 2. Analytical optimization. *Analytica Chimica Acta* **1993**, 281, (3), 621-7.
15. Adeloju, S. B.; Shaw, S. J.; Wallace, G. G., Polypyrrole-based potentiometric biosensor for urea. Part 1. Incorporation of urease. *Analytica Chimica Acta* **1993**, 281, (3), 611-20.
16. Csoeregi, E.; Gorton, L.; Marko-Varga, G., Amperometric microbiosensors for detection of hydrogen peroxide and glucose based on peroxidase-modified carbon fibers. *Electroanalysis* **1994**, 6, (11/12), 925-33.
17. Gorton, L.; Jaegfeldt, H.; Torstensson, A.; Johansson, G. Electrode for the electrochemical regeneration of a coenzyme and its use. 82-SE59
8203729, 19820308., 1982.

18. Roach, P. C. J.; Ramsden, D. K.; Hughes, J.; Williams, P., Development of a conductimetric biosensor using immobilised *Rhodococcus ruber* whole cells for the detection and quantification of acrylonitrile. *Biosensors & Bioelectronics* **2003**, 19, (1), 73-78.
19. Alocilja, E. C.; Muhammad-Tahir, Z. Conductimetric biosensor device, method and system. 2002-74499
2003153094, 20020213., 2003.
20. Gallardo Soto, A. M.; Jaffari, S. A.; Bone, S., Characterisation and optimisation of AC conductimetric biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* **2001**, 16, (1-2), 23-29.
21. Watson, L. D.; Maynard, P.; Cullen, D. C.; Sethi, R. S.; Brett, J.; Lowe, C. R., A microelectronic conductimetric biosensor. *Biosensors* **1988**, 3, (2), 101-15.
22. Caras, S.; Janata, J., Enzymically sensitive field effect transistors. *Methods in Enzymology* **1988**, 137, (Immobilized Enzymes Cells, Pt. D), 247-55.
23. Nelson, J. M.; Griffin, E. G., Adsorption of invertase. *Journal of the American Chemical Society* **1916**, 38, 1109-15.
24. De Oliveira Neto, G.; Yamanaka, H., Enzymes and immobilized biological materials: biosensors. *Quimica Nova* **1988**, 11, (4), 432-5.
25. Chibata, I.; Editor, *Immobilized Enzymes. Research and Development*. 1978; p 384 pp.
26. Buser, H. J.; Schwarzenbach, D.; Petter, W.; Ludi, A., The crystal structure of Prussian Blue: $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. *Inorganic Chemistry* **1977**, 16, (11), 2704-10.
27. Neff, V. D., Electrochemical oxidation and reduction of thin films of prussian blue. *Journal of the Electrochemical Society* **1978**, 125, (6), 886-7.
28. Ellis, D.; Eckhoff, M.; Neff, V. D., Electrochromism in the mixed-valence hexacyanides. 1. Voltammetric and spectral studies of the oxidation and reduction of thin films of Prussian blue. *Journal of Physical Chemistry* **1981**, 85, (9), 1225-31.

29. Itaya, K.; Ataka, T.; Toshima, S., Spectroelectrochemistry and electrochemical preparation method of Prussian blue modified electrodes. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, 104, (18), 4767-72.
30. Itaya, K.; Shibayama, K.; Akahoshi, H.; Toshima, S., Prussian-blue-modified electrodes: An application for a stable electrochromic display device. *Journal of Applied Physics* **1982**, 53, (1), 804-5.
31. Feldman, B. J.; Murray, R. W., Electron diffusion in wet and dry Prussian blue films on interdigitated array electrodes. *Inorganic Chemistry* **1987**, 26, (11), 1702-8.
32. Crumbliss, A. L.; Lugg, P. S.; Morosoff, N., Alkali metal cation effects in a Prussian blue surface modified electrode. *Inorganic Chemistry* **1984**, 23, (26), 4701-8.
33. Garcia-Jareno, J. J.; Navarro, J. J.; Roig, A. F.; Scholl, H.; Vicente, F., Impedance analysis of Prussian Blue films deposited on ITO electrodes. *Electrochimica Acta* **1995**, 40, (9), 1113-19.
34. Roig, A.; Navarro, J.; Tamarit, R.; Vicente, F., Stability of Prussian Blue films on ITO electrodes: effect of different anions. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1993**, 360, (1-2), 55-69.
35. Karyakin, A. A.; Karyakina, E. E.; Gorton, L., On the mechanism of H₂O₂ reduction at prussian blue modified electrodes. *Electrochemistry Communications* **1999**, 1, (2), 78-82.
36. Karyakin, A. A., Prussian Blue and its analogues: electrochemistry and analytical applications. *Electroanalysis* **2001**, 13, (10), 813-819.
37. Malik, M. A.; Miecznikowski, K.; Kulesza, P. J., Quartz crystal microbalance monitoring of mass transport during redox processes of cyanometalate modified electrodes: complex charge transport in nickel hexacyanoferrate films. *Electrochimica Acta* **2000**, 45, (22-23), 3777-3784.

38. Humphrey, B. D.; Sinha, S.; Bocarsly, A. B., Mechanisms of charge transfer at the chemically derivatized interface: the $\text{Ni}/[\text{NiII}(\text{CN})\text{FeII/III}(\text{CN})_5]^{2-/1-}$ system as an electrocatalyst. *Journal of Physical Chemistry* **1987**, 91, (3), 586-93.
39. Zamponi, S.; Berrettoni, M.; Kulesza, P. J.; Miecznikowski, K.; Malik, M. A.; Makowski, O.; Marassi, R., Influence of experimental conditions on electrochemical behavior of Prussian blue type nickel hexacyanoferrate film. *Electrochimica Acta* **2003**, 48, (28), 4261-4269.
40. Buc, H.; Demaugre, F.; Leroux, J. P., The kinetic effects of oxalate on liver and erythrocyte pyruvate kinases. *Biochemical and biophysical research communications* **1978**, 85, (2), 774-9.
41. Emerson, P. M.; Wilkinson, J. H., Urea and oxalate inhibition of the serum lactate dehydrogenase. *Journal of Clinical Pathology* **1965**, 18, (6), 803-7.
42. Eiss, M.; Schieferstein, G.; Wahl, R., Oxalate in human seminal plasma: possible significance and problems of oxalate determination. *Fertility and sterility* **2000**, 73, (5), 961-6.
43. Baadenhuijsen, H.; Jansen, A. P., Colorimetric determination of urinary oxalate recovered as calcium oxalate. Application of a simple correction factor for incomplete precipitation. *Clinica Chimica Acta* **1975**, 62, (2), 315-24.
44. Wildman, B. J.; Jackson, P. E.; Jones, W. R.; Alden, P. G., Analysis of anion constituents of urine by inorganic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography* **1991**, 546, (1-2), 459-66.
45. Fry, I. D. R.; Starkey, B. J., The determination of oxalate in urine and plasma by high performance liquid chromatography. *Annals of Clinical Biochemistry* **1991**, 28, (6), 581-7.
46. Moye, H. A.; Malagodi, M. H.; Clarke, D. H., Reduction of oxalogenesis in a rapid gas chromatographic procedure for the analysis of oxalate ion in urine. *Clinica Chimica Acta* **1983**, 129, (3), 385-90.

47. Reddy, S. M.; Higson, S. P.; Vadgama, P. M., Amperometric enzyme electrode for the determination of urine oxalate. *Analytica Chimica Acta* **1997**, 343, (1-2), 59-68.
48. Reddy, S. M.; Vadgama, P. M., Ion exchanger modified PVC membranes-selectivity studies and response amplification of oxalate and lactate enzyme electrodes. *Biosensors & Bioelectronics* **1997**, 12, (9-10), 1003-1012.
49. Reddy, S. M.; Higson, S. P. J.; Christie, I. M.; Vadgama, P. M., Selective membranes for the construction and optimization of an amperometric oxalate enzyme electrode. *Analyst* **1994**, 119, (5), 949-52.
50. Fernandes, J. R.; de Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T.; Tubino, M., Use of sorghum seed tissue as a biocatalyst in a stirred reactor for oxalic acid determination. *Analytical Communications* **1996**, 33, (11), 397-399.
51. Fernandes, J. R.; de Oliveira Neto, G.; Tubino, M.; Kubota, L. T., Determination of oxalate in grass by FIA with a spectrophotometric detection system using a two enzyme reactor. *Analytical Sciences* **1996**, 12, (3), 443-447.
52. Perez, E. F.; De Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T., Bi-enzymatic amperometric biosensor for oxalate. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2001**, B72, (1), 80-85.
53. Khairutdinov, R. F., Physical chemistry of nanocrystalline semiconductors. *Colloid Journal* **1997**, 59, (5), 535-548.
54. Mulvaney, P., Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. *Langmuir* **1996**, 12, (3), 788-800.
55. Alvarez, M. M.; Khoury, J. T.; Schaaff, T. G.; Shafigullin, M.; Vezmar, I.; Whetten, R. L., Critical sizes in the growth of Au clusters. *Chemical Physics Letters* **1997**, 266, (1,2), 91-98.
56. Alivisatos, A. P., Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, 100, (31), 13226-13239.

57. Brus, L., Quantum crystallites and nonlinear optics. *Applied Physics A: Solids and Surfaces* **1991**, A53, (6), 465-74.
58. Lewis, L. N., Chemical catalysis by colloids and clusters. *Chemical Reviews* **1993**, 93, (8), 2693-730.
59. Kesavan, V.; Sivanand, P. S.; Chandrasekaran, S.; Kolytyn, Y.; Gedanken, A., Catalytic aerobic oxidation of cycloalkanes with nanostructured amorphous metals and alloys. *Angewandte Chemie, International Edition* **1999**, 38, (23), 3521-3523.
60. Ahuja, R.; Caruso, P. L.; Moebius, D.; Paulus, W.; Ringsdorf, H.; Wildburg, G., Formation of molecular bonds through hydrogen bridges in the gas-water interface: molecular recognition and quantitative hydrolysis of barbituric acid lipids. *Angewandte Chemie* **1993**, 105, (7), 1082-5 (See also *Angew Chem, Int Ed Engl*, 1993, 32(7), 1033-6).
61. Katz, E.; Sheeney-Haj-Idia, L.; Buckmann, A. F.; Willner, I., Dual biosensing by magneto-controlled bioelectrocatalysis. *Angewandte Chemie, International Edition* **2002**, 41, (8), 1343-1346.
62. Luo, X.-L.; Xu, J.-J.; Zhao, W.; Chen, H.-Y., Glucose biosensor based on ENFET doped with SiO₂ nanoparticles. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2004**, B97, (2-3), 249-255.
63. Morrin, A.; Ngamna, O.; Killard, A. J.; Moulton, S. E.; Smyth, M. R.; Wallace, G. G., An amperometric enzyme biosensor fabricated from polyaniline nanoparticles. *Electroanalysis* **2005**, 17, (5-6), 423-430.
64. Dominguez-Vera, J. M.; Colacio, E., Nanoparticles of Prussian Blue Ferritin: A New Route for Obtaining Nanomaterials. *Inorganic Chemistry* **2003**, 42, (22), 6983-6985.
65. Uemura, T.; Kitagawa, S., Prussian Blue Nanoparticles Protected by Poly(vinylpyrrolidone). *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (26), 7814-7815.

66. Mello, R. M. Q.; Torresi, R. M.; Cordoba de Torresi, S. I.; Ticianelli, E. A., Ellipsometric, Electrogravimetric, and Spectroelectrochemical Studies of the Redox Process of Sulfonated Polyaniline. *Langmuir* **2000**, 16, (20), 7835-7841.
67. Karyakin, A. A.; Karyakina, E. E.; Gorgon, L., Prussian-Blue-based amperometric biosensors in flow-injection analysis. *Talanta* **1996**, 43, (9), 1597-1606.
68. Garcia-Jareno, J. J.; Navarro-Laboulais, J.; Vicente, F., Electrochemical study of Nafion membranes/Prussian blue films on ITO electrodes. *Electrochimica Acta* **1996**, 41, (17), 2675-2682.
69. Fiorito, P. A.; Cordoba de Torresi, S. I., Optimized multilayer oxalate biosensor. *Talanta* **2004**, 62, (3), 649-654.
70. Wandzilak, T. R.; D'Andre, S. D.; Davis, P. A.; Williams, H. E., Effect of high dose vitamin C on urinary oxalate levels. *Journal of urology* **1994**, 151, (4), 834-7.
71. Reddy, S. M.; Higson, S. P.; Christie, I. M.; Vadgama, P. M., Selective membranes for the construction and optimization of an amperometric oxalate enzyme electrode. *Analyst* **1994**, 119, (5), 949-52.
72. Milardovic, S.; Kruhac, I.; D, I.; V, R.; Tkalcec, M.; Grabaric, B. S., Glucose determination in blood samples using flow injection analysis and an amperometric biosensor based on glucose oxidase immobilized on hexacyanoferrate modified nickel electrode. *Analytica Chimica Acta* **1997**, 350, (1-2), 91-96.
73. Yamada, S.; Kuwabara, K.; Koumoto, K., Characterization of Prussian Blue analog: nanocrystalline nickel-iron cyanide. *Materials Science & Engineering, B: Solid-State Materials for Advanced Technology* **1997**, B49, (2), 89-94.
74. Jeerage, K. M.; Steen, W. A.; Schwartz, D. T., Correlating Nanoscale Structure with Ion Intercalation in Electrodeposited Nickel Hexacyanoferrate Thin Films. *Chemistry of Materials* **2002**, 14, (2), 530-535.

75. Chen, S. M., Preparation, characterization, and electrocatalytic oxidation properties of iron, cobalt, nickel, and indium hexacyanoferrate. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2002**, 521, (1-2), 29-52.
76. Kulesza, P. J.; Brajter, K.; Dabek-Zlotorzynska, E., Application of chelate-forming resin and modified glassy carbon electrode for selective determination of iron(III) by liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytical Chemistry* **1987**, 59, (23), 2776-80.
77. Amos, L. J.; Duggal, A.; Mirsky, E. J.; Ragonesi, P.; Bocarsly, A. B.; Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Morphological variation at the $[\text{NiFe}(\text{CN})_6]^{2-}$ -derivatized nickel electrode: a technique for the evaluation of alkali cation containing solutions. *Analytical chemistry* **1988**, 60, (3), 245-9.
78. Joseph, J.; Gomathi, H.; Rao, G. P., Electrochemical characteristics of thin films of nickel hexacyanoferrate formed on carbon substrates. *Electrochimica Acta* **1991**, 36, (10), 1537-41.
79. Sabouraud, G.; Sadki, S.; Brodie, N., The mechanisms of pyrrole electropolymerization. *Chemical Society Reviews* **2000**, 29, (5), 283-293.
80. Feldman, B. J.; Melroy, O. R., Ion flux during electrochemical charging of Prussian blue films. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1987**, 234, (1-2), 213-27.
81. Vorotyntsev, M. A.; Daikhin, L. I.; Levi, M. D., Modeling the impedance properties of electrodes coated with electroactive polymer films. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1994**, 364, (1-2), 37-49.
82. Gabrielli, C.; Takenouti, H.; Haas, O.; Tsukada, A., Impedance investigation of the charge transport in film-modified electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1991**, 302, (1-2), 59-89.

83. Foulds, N. C.; Lowe, C. R., Enzyme entrapment in electrically conducting polymers. Immobilization of glucose oxidase in polypyrrole and its application in amperometric glucose sensors. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* **1986**, 82, (4), 1259-64.
84. Schlenoff, J. B.; Xu, H., Evolution of physical and electrochemical properties of polypyrrole during extended oxidation. *Journal of the Electrochemical Society* **1992**, 139, (9), 2397-401.
85. Oubina, A.; Gascon, J.; Barcelo, D., A new amperometric biosensor for salicylate based on salicylate hydroxylase immobilized on polypyrrole film doped with hexacyanoferrate. *Analytica Chimica Acta* **1997**, 347, (1-2), 35-41.
86. Torres-Gomez, G.; Gomez-Romero, P., Conducting organic polymers with electroactive dopants. Synthesis and electrochemical properties of hexacyanoferrate-doped polypyrrole. *Synthetic Metals* **1998**, 98, (2), 95-102.
87. Desimoni, E.; Brunetti, B.; Ugo, P.; Cazzaniga, R., A polypyrrole/Fe(CN)₆^{3-/4-}-coated piezoelectric sensor for Cr(VI). *Synthetic Metals* **2002**, 130, (2), 135-137.
88. Fiorito, P. A.; Cordoba de Torresi, S. I., Hybrid nickel hexacyanoferrate/polypyrrole composite as mediator for hydrogen peroxide detection and its application in oxidase-based biosensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2005**, 581, (1), 31-37.
89. Ferreira, M.; Fiorito, P. A.; Oliveira, O. N.; Cordoba de Torresi, S. I., Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique. *Biosensors & Bioelectronics* **2004**, 19, (12), 1611-1615.
90. Bartlett, P. N.; Cooper, J. M., A review of the immobilization of enzymes in electropolymerized films. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1993**, 362, (1-2), 1-12.
91. Decher, G., Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science (Washington, D. C.)* **1997**, 277, (5330), 1232-1237.

92. Lvov, Y.; Essler, F.; Decher, G., Combination of polycation/polyanion self-assembly and Langmuir-Blodgett transfer for the construction of superlattice films. *Journal of Physical Chemistry* **1993**, 97, (51), 13773-7.
93. Lvov, Y.; Decher, G.; Moehwald, H., Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine). *Langmuir* **1993**, 9, (2), 481-6.
94. Lvov, Y.; Decher, G.; Sukhorukov, G., Assembly of thin films by means of successive deposition of alternate layers of DNA and poly(allylamine). *Macromolecules* **1993**, 26, (20), 5396-9.
95. Decher, G.; Lehr, B.; Lowack, K.; Lvov, Y.; Schmitt, J., New nanocomposite films for biosensors: layer-by-layer adsorbed films of polyelectrolytes, proteins or DNA. *Biosensors & Bioelectronics* **1994**, 9, (9/10), 677-84.
96. Lvov, Y.; Haas, H.; Decher, G.; Moehwald, H.; Mikhailov, A.; Mtchedlishvily, B.; Morgunova, E.; Vainshtein, B., Successive Deposition of Alternate Layers of Polyelectrolytes and a Charged Virus. *Langmuir* **1994**, 10, (11), 4232-6.
97. Lvov, Y.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake, T., Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, (22), 6117-23.
98. Onda, M.; Lvov, Y.; Ariga, K.; Kunitake, T., Sequential actions of glucose oxidase and peroxidase in molecular films assembled by layer-by-layer alternate adsorption. *Biotechnology and Bioengineering* **1996**, 51, (2), 163-167.
99. Hodak, J.; Etchenique, R.; Calvo, E. J.; Singhal, K.; Bartlett, P. N., Layer-by-Layer Self-Assembly of Glucose Oxidase with a Poly(allylamine)ferrocene Redox Mediator. *Langmuir* **1997**, 13, (10), 2708-2716.

100. Laurent, D.; Schlenoff, J. B., Multilayer Assemblies of Redox Polyelectrolytes. *Langmuir* **1997**, 13, (6), 1552-1557.
101. Lvov, Y.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake, T., Formation of Ultrathin Multilayer and Hydrated Gel from Montmorillonite and Linear Polycations. *Langmuir* **1996**, 12, (12), 3038-3044.
102. Calvo, E. J.; Battaglini, F.; Danilowicz, C.; Wolosiuk, A.; Otero, M., Layer-by-layer electrostatic deposition of biomolecules on surfaces for molecular recognition, redox mediation and signal generation. *Faraday Discussions* **2000**, 116, (Bioelectrochemistry), 47-65.
103. Forzani, E. S.; Solis, V. M.; Calvo, E. J., Electrochemical Behavior of Polyphenol Oxidase Immobilized in Self-Assembled Structures Layer by Layer with Cationic Polyallylamine. *Analytical Chemistry* **2000**, 72, (21), 5300-5307.
104. Calvo, E. J.; Etchenique, R.; Pietrasanta, L.; Wolosiuk, A.; Danilowicz, C., Layer-by-layer self-assembly of glucose oxidase and Os(Bpy)2CIPyCH2NH-poly(allylamine) bioelectrode. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (6), 1161-8.
105. Liu, S.-Q.; Xu, J.-J.; Chen, H.-Y., Electrochemical behavior of nanosized Prussian blue self-assembled on Au electrode surface. *Electrochemistry Communications* **2002**, 4, (5), 421-425.
106. Haruta, M., Size- and support-dependency in the catalysis of gold. *Catalysis Today* **1997**, 36, (1), 153-166.
107. Valden, M.; Lai, X.; Goodman, D. W., Onset of catalytic activity of gold clusters on titania with the appearance of nonmetallic properties. *Science* **1998**, 281, (5383), 1647-1650.
108. Hannover, J. C., C. N. R. Rao, A. Mueller, A. K. Cheetham (Ed.): *The chemistry of nanomaterials*. 2005; Vol. 219, p 501-502.

109. Suslick, K. S.; Hammerton, D. A.; Cline, R. E., Jr., Sonochemical hot spot. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, 108, (18), 5641-2.
110. Suslick, K. S.; Choe, S. B.; Cichowlas, A. A.; Grinstaff, M. W., Sonochemical synthesis of amorphous iron. *Nature* **1991**, 353, (6343), 414-16.
111. Koltypin, Y.; Cao, X.; Prozorov, R.; Balogh, J.; Kaptas, D.; Gedanken, A., Sonochemical synthesis of iron nitride nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* **1997**, 7, (12), 2453-2456.
112. Koltypin, Y.; Katabi, G.; Cao, X.; Prozorov, R.; Gedanken, A., Sonochemical preparation of amorphous nickel. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1996**, 201, (1,2), 159-162.
113. Suslick, K. S.; Hyeon, T.; Fang, M.; Cichowlas, A. A., Sonochemical synthesis and catalytic properties of nanostructured molybdenum carbide. *Materials Research Society Symposium Proceedings* **1994**, 351, (Molecularly Designed Ultrafine/Nanostructured Materials), 201-6.
114. Suslick, K. S.; Fang, M.; Hyeon, T.; Cichowlas, A. A., Nanostructured Fe-Co catalysts generated by ultrasound. *Materials Research Society Symposium Proceedings* **1994**, 351, (Molecularly Designed Ultrafine/Nanostructured Materials), 443-8.
115. Cao, X.; Koltypin, Y.; Prozorov, R.; Kataby, G.; Gedanken, A., Preparation of amorphous Fe₂O₃ powder with different particle sizes. *Journal of Materials Chemistry* **1997**, 7, (12), 2447-2451.
116. Zhu, Y.; Li, H.; Koltypin, Y.; Gedanken, A., Preparation of nanosized cobalt hydroxides and oxyhydroxide assisted by sonication. *Journal of Materials Chemistry* **2002**, 12, (3), 729-733.
117. Fiorito, P. A.; Goncales, V. R.; Ponzio, E. A.; Cordoba de Torresi, S. I., Synthesis, characterization and immobilization of Prussian blue nanoparticles. A potential tool for biosensing devices. *Chemical Communications* **2005**, (3), 366-368.

118. Zhu, J.; Koltypin, Y.; Gedanken, A., General Sonochemical Method for the Preparation of Nanophasic Selenides: Synthesis of ZnSe Nanoparticles. *Chemistry of Materials* **2000**, 12, (1), 73-78.