Tony Rogério de Lima Dadamos

Desenvolvimento de uma superfície bifuncional Pt/Au modificada com glicose oxidase para determinação de glicose em amostras alimentícias

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Antônio Spínola Machado

São Carlos

2013

Aos meus pais, Odair e Alzaira pelo apoio em todas

as etapas de minha vida....

Aos meus tios e avós por sempre me apoiarem....

Agradecimentos

Aos meus pais Odair e Alzaira, pelo carinho, compreensão e por saber que sempre posso contar com eles quando eu precisar.

Aos meus avós Orlando (*In memoriam*), Tereza (*In memoriam*), José Antônio (*In memoriam*) e Helena, pelo apoio durante toda minha vida.

Aos meus tios Lúcia, Valtir, José Claudinei, Rosa, Marta, Ilda e Odenir (*In memoriam*) pelo apoio e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Antônio Spínola Machado, pela orientação, além de todo o conhecimento fornecido, ideias e oportunidades.

Aos técnicos João Tiengo e Marcelo Calegaro pela ajuda durante todo este tempo.

Aos amigos Daniely, Samirys, Gustavo, Alan, Tiago, pelo apoio durante todo esse tempo.

Aos companheiros de GMEME, Ana, Claudia, Codorna, Diego, Dyovani, Érica, Fernanda, Fernando, Ivana, Jaqueline, Livia, Naiza, Paulo Leão, Paulo Raymundo, Pollyana, Sara, Tiaguinho, Tiagão, Vanessa, Vivian, pela amizade e ajuda profissional em todos os momentos.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Obrigado!

“O crepúsculo de um homem é a aurora de outro”

(autor desconhecido)

Resumo

A glicose é um açúcar redutor importante na dieta humana, sendo abundante em diversos alimentos, como sucos de frutas, mel, iogurtes e refrigerantes e pode ser facilmente ingerido e metabolizado. Ela fornece a energia para o corpo humano, entretanto, diversos desequilíbrios metabólicos estão associados com variações no teor de glicose no sangue, saliva ou urina. Sendo assim é preciso desenvolver métodos de baixo custo, simples e rápidos que permitam o monitoramento deste metabólito. Portanto, no presente trabalho foi desenvolvido e caracterizado um eletrodo composto por uma superfície bifuncional de Pt/Au, onde a superfície de Au foi modificada com uma monocamada auto-organizada de cistamina na qual foi ancorada a enzima glicose oxidase e a superfície da Pt com ferroceno, para determinação de glicose em amostras alimentícias. O eletrodo foi construído utilizando-se um eletrodo de platina, sobre o qual foram eletrodepositado nanoestruturas de ouro, através de voltametria linear em uma solução contendo o ânion tetracloroáurico. As nanoestruturas de ouro foram modificadas com o alcanotiol cistamina, formando uma camada auto-organizada, para servir de plataforma para ancoragem da glicose oxidase. O peróxido de hidrogênio, que é um dos produtos da reação enzimática foi determinado na platina modificada com ferroceno. Sendo assim, as nanoestruturas de ouro serviriam de sítios específicos para as enzimas, e a platina modificada com ferroceno servirá para quantificar o produto da reação enzimática. Para a detecção da glicose foram construídos três eletrodos, o eletrodo embutido (EE) para detecção de glicose em refrigerantes, o eletrodo por evaporação de platina (EEP) para detecção de glicose em amostras de iogurte e o ultramicroeletrodo (UME) para futuras aplicações de detecção de glicose por métodos não invasivos. Encontrou-se um limite de detecção de $2,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o eletrodo EE, de $2,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o eletrodo EEP e $0,03 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o UME. Foram realizados diversos tratamentos estatísticos como erro relativo, desvio padrão e incertezas para verificar a resposta do eletrodo. Por fim, os eletrodos desenvolvidos foram aplicados na detecção de glicose em amostras de refrigerantes, chás e iogurtes, e obteve-se uma resposta satisfatória para a detecção do analito nestas amostras.

Abstract

Glucose is a reducing sugar very important in the human diet and is abundant in many foods, such as fruit juices, honey, yogurt and soft drinks and can be easily ingested and metabolized. It provides the energy for the human body perform its healthy functioning. However, many metabolic imbalances associated with variations in the level of glucose in the blood, urine or saliva. Therefore it is necessary to develop methods cheap, simple and quick to allow the monitoring of this metabolite. Therefore, in the present work was developed and characterized an electrode composed of a bifunctional surface Pt/Au, where Au surface was modified with a self-organized monolayer of cystamine which was anchored in the enzyme glucose oxidase and the surface of Pt with ferrocene for the determination of glucose in food samples. The electrode was constructed using a platinum electrode, which was electrodeposited gold nanostructures, using the technique of linear voltammetry in a solution containing the anion tetrachloroauric. The gold nanostructures were modified with cystamine alkanethiol forming a self-organized layer to serve as a platform for anchoring the glucose oxidase. Hydrogen peroxide, which is a product of the enzyme reaction, was determined in the platinum modified with ferrocene. Therefore, the gold nanostructures serve as sites for specific enzymes, and platinum modified with ferrocene serve to quantify the product of the enzymatic reaction. For detection of glucose were built three electrodes, the electrode embedded (EE) for detecting glucose in soft drinks, the electrode by evaporating platinum (EEP) for detection of glucose in samples of yogurt and ultramicroelectrode (UME) for future sensing applications glucose through non-evasive. We found a detection limit of $2.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ to the electrode EE, $2.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ to the electrode EEP and $0.03 \mu\text{mol L}^{-1}$ for UME. Various statistical treatments were performed as relative error, standard deviation and uncertainties to check the response of the electrode. Finally, the electrodes developed were applied to the detection of glucose in samples of soft drinks, teas and yogurts, which gave a satisfactory response to the detection of the analyte in food samples.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Representação das monocamadas auto-organizadas de alcanotióis sobre um substrato metálico.....	21
Figura 2 - Principais propriedades das monocamadas auto-organizadas utilizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.....	23
Figura 3 - Modelo esquemático do funcionamento de um biossensor.....	28
Figura 4 - Eletrodo Embutido para detecção de glicose em alimentos.....	36
Figura 5 - Eletrodo por Evaporação de Platina para detecção de glicose em alimentos. (A) e (B) EEP; (C) máscara para o EEP e (D) alvo de platina.....	37
Figura 6 - Modelo esquemático da superfície do eletrodo bifuncional modificado.....	40
Figura 7 – Voltamograma cíclico do eletrodo de platina EE em ácido sulfúrico 0,1 mol L ⁻¹ com velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹	50
Figura 8 – Voltamogramas de varredura linear do eletrodo de Pt em H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ + H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ . (A) EE a 100 mV s ⁻¹ ; (B) EEP a 100 mV s ⁻¹ e (C) UME a 25 mV s ⁻¹	54
Figura 9 - Porcentagem de recobrimento da superfície com nanoestruturas de ouro em função da velocidade de varredura de potenciais em ácido sulfúrico 0,1 mol L ⁻¹ utilizando-se o eletrodo EE.....	55
Figura 10 - Voltamogramas em H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , utilizando-se um eletrodo de Pt (—); Au (—) e Pt/Au (—) com velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹	56
Figura 11 - Imagem topográfica realizada por AFM modo contato do eletrodo de Pt e Pt/Au.....	57
Figura 12 – Histogramas da quantidade de partículas em função da altura e largura das nanoestruturas de ouro.....	58
Figura 13: Voltamograma cíclico em ferrocianeto e ferricianeto de potássio 0,01 mol L ⁻¹ em ácido sulfúrico 0,1 mol L ⁻¹ nos eletrodos de Au (—), eletrodo de Pt (—),	

eletrodo de Pt/Au (—) e eletrodo de Pt/Au/Cys (—) com velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$. (A) EE; (B) EEP e (C) UME.....61

Figura 14 – Espectros de plano complexo obtidos para o eletrodo de Au (○); eletrodo de Pt (○); eletrodo Pt/Au (○) e eletrodo Pt/Au/Cys (○). Faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, onda senoidal de 10 mV aplicada no E_{pa} observado com a voltametria cíclica. As linhas ultrapassando os identificadores são os resultados de simulação com software empregando o circuito de Randles modificado.....64

Figura 15 - Modelo de circuito equivalente utilizado para análise dos dados obtidos com os gráficos de plano complexo obtidos com a EIE.....64

Figura 16 - Representação 3D da enzima glicose oxidase (GOx).....67

Figura 17 – Estrutura molecular do ferroceno.....68

Figura 18 - Voltamogramas cíclicos obtidos a 100 mV s^{-1} para o eletrodo EE em solução de PBS 0,1 mol/L (pH = 7) sem glicose (—) e com adição de 20 mmol L^{-1} de glicose (—). (A) Pt/Au/Cys/Glu/GOx; (B) Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc e (C) Au/Cys/Glu/GOx/Fc.....70

Figura 19 - Voltamogramas cíclicos obtidos a 100 mV s^{-1} para o eletrodo EEP em solução de PBS 0,1 mol/L (pH = 7) sem glicose (—) e com adição de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose (—). (A) Pt/Au/Cys/Glu/GOx; (B) Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc e (C) Au/Cys/Glu/GOx/Fc.....71

Figura 20 - Voltamogramas cíclicos obtidos a 100 mV s^{-1} para o eletrodo UME em solução de PBS 0,1 mol/L (pH = 7) sem glicose (—) e com adição de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose (—). (A) Pt/Au/Cys/Glu/GOx; (B) Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc e (C) Au/Cys/Glu/GOx/Fc.....72

Figura 21 - Microscopia ótica realizada em um microscópio HIROX KH-7700 com lente OL-350II da superfície do eletrodo de (A) Pt, (B) Pt/Au/Cys/Glu/GOx e (C) Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc.....74

Figura 22 - Imagem topográfica realizada por AFM no modo não contato do eletrodo de Pt/Au/Cys/Glu/GOx.....75

Figura 23 - Cronoamperograma em tampão fosfato utilizando-se o eletrodo EE com potencial fixo aplicado de 0,25 V vs. Ag/Ag^+76

Figura 24 - Curva analítica obtida para glicose empregando-se o eletrodo bifuncional EE modificado com Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc em PBS (pH = 7) com potencial constante de 0,25 V vs. Ag/Ag ⁺	77
Figura 25 - Curva analítica obtida para glicose empregando-se o eletrodo bifuncional EEP modificado com Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc em PBS (pH = 7) com potencial constante de 0,35 V vs. Ag/Ag ⁺	79
Figura 26 - Curva analítica obtida para glicose empregando-se o eletrodo bifuncional UME modificado com Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc em PBS (pH = 7) com potencial constante de 0,25 V vs. Ag/Ag ⁺	81
Figura 27 – Eletrodo EE para detecção de glicose em amostras de chá e refrigerantes.....	84
Figura 28 - Eletrodo EEP para detecção de glicose na amostras de iogurte.....	84

Lista de tabelas

Tabela 1 – Procedência e pureza dos reagentes utilizados.....	34
Tabela 2 – Caracterização da eletroatividade dos eletrodos de platina.....	53
Tabela 3 – Valores de potencial e corrente de pico para as modificações do eletrodo de platina.....	62
Tabela 4 – Dados obtidos com os espectros de plano complexo da Figura 14.....	65
Tabela 5 – Valores de potenciais e correntes para os experimentos de voltametria cíclica.....	73
Tabela 6 – Erros, desvio padrão e incertezas das medidas eletroquímicas para o eletrodo EE.....	78
Tabela 7 – Erros, desvio padrão e incertezas das medidas eletroquímicas para o eletrodo EEP.....	80
Tabela 8 – Erros, desvio padrão e incertezas das medidas eletroquímicas para o eletrodo UME.....	82
Tabela 9 – Limites de detecção para os eletrodos propostos e alguns trabalhos na literatura.....	83
Tabela 10 – Determinação de glicose em amostras de refrigerantes, chá e iogurtes empregando-se os sensores propostos (EE e EEP) e o eletrodo comercial.....	85
Tabela 11 – Estudo estatístico na detecção de glicose em amostras alimentícias.....	86
Tabela 12 – Resultados para o teste T para o eletrodo desenvolvido e para o eletrodo comercial.....	87

Lista de abreviaturas e siglas

σ_0	Desvio Padrão
μ	Valor Tabelado das Amostras
θ	Recobrimento da Superfície
σ	Grau de Polidispersividade
AFM	Microscopia de Força Atômica
C_{exp}	Concentração Detectada com o Eletrodo Proposto
C_i(x_i)	Coeficiente de Sensibilidade do Mensurando
CPE	Elemento Constante de Fase
C_{ref}	Concentração Padrão
CVD	Deposição Química por Vapor
Cys	Cistamina
EE	Eletrodo Embutido
EEP	Evaporação de Platina
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
F	Constante de Faraday
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo

Fc	Ferroceno
f(x_i)	Incerteza do Fator de Diluição
Glu	Glutaraldeído
GOx	Glicose Oxidase
k	Coeficiente de Abrangência
k_{app}	Constante de Velocidade de Transferência Eletrônica Heterogênea Aparente
n	Número de Experimentos
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
PBS	Solução Tampão Fosfato
R_s	Resistência da Solução
R_{tc}	Resistência de Transferência de Carga
SAM	<i>Self Assembled Monolayers</i>
QDs	<i>Quantun Dots</i>
U_{cy}	Incerteza Padrão Combinada
U	Incerteza Expandida
U(F)	Incerteza pelo Fator de Correção
UME	Ultramicroeletrodos

UPD	<i>Underpotential Deposition</i>
U(x_i)	Incerteza Padrão Tipo A
U_y(x_i)	Incerteza das Grandezas de Mensuração
var	Variância
Ve_{ff}	Grau de Liberdade Efetivo
$\bar{x}$	Média de Corrente
Z	Impedância de Warburg

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 NANOESTRUTURAS.....	18
1.2 SUPERFÍCIES BIFUNCIONAIS.....	20
1.3 MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS.....	21
1.3.1 SAMs e suas Aplicações em Eletroanalítica.....	23
1.3.2 SAMs e suas Aplicações em Biossensores.....	25
1.4 ELETRODOS MODIFICADOS.....	27
1.4.1 Biossensores.....	28
1.5 SENSORES PARA GLICOSE.....	30
1.6 ULTRAMICROELETRODOS (UME).....	32
2 OBJETIVOS.....	33
3 METODOLOGIA.....	34
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	34
3.2 PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS.....	35
3.2.1 Eletrodo Embutido (EE).....	35
3.2.2 Eletrodo por Evaporação de Platina (EEP).....	36
3.2.3 Ultramicroeletrodo (UME).....	37
3.3 MATERIAIS E INSTRUMENTOS PARA MEDIDAS ELETROQUÍMICAS.....	37
3.3.1 Medidas Eletroquímicas.....	37
3.3.2 Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	38
3.3.3 Medidas com Microscopia de Força Atômica.....	38
3.3.4 Medidas com Microscopia Ótica.....	38
3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	38
3.4.1 Limpeza da Superfície dos Eletrodos.....	38
3.4.2 Obtenção da Superfície Bifuncional.....	39
3.4.3 Cálculo das Áreas Superficiais do Eletrodo Bifuncional Pt/Au.....	39
3.4.4 Preparação das Monocamadas Auto-Organizadas de Alcanotióis.....	39
3.4.5 Imobilização da Enzima (Glicose Oxidase) e do Mediador de Elétrons (Ferroceno).....	40
3.4.6 Estabelecimento de uma Rotina Eletroanalítica para Detecção de Glicose.....	41
3.5 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS.....	41

3.5.1 Preparo da Amostra de Refrigerante e Chá.....	42
3.5.2 Preparo da Amostra de Iogurte.....	42
3.6 ESTUDO ESTATÍSTICO DO MÉTODO.....	42
3.6.1 Limite de Detecção e Quantificação Pelo Tratamento Estatístico.....	42
3.6.2 Erros, Incertezas e Desvio Padrão da Curva Analítica.....	45
3.6.2.1 Incerteza Padrão tipo A.....	45
3.6.2.2 Incerteza do Fator de Diluição.....	46
3.6.2.3 Incerteza pelo Fator de Correção.....	46
3.6.2.4 Incerteza das Grandezas de Mensuração.....	46
3.6.2.5 Incerteza Padrão Combinada.....	47
3.6.2.6 Incerteza Expandida.....	47
3.6.2.7 Limite de Confiança.....	48
3.6.3 Tratamento Estatístico das Amostras Analisadas.....	48
3.6.3.1 Erro Relativo, Desvio Padrão e Incerteza da Mensuração.....	48
3.6.3.2 Índice Z.....	49
3.6.3.3 Teste t.....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
4.1 DEPOSIÇÃO DAS NANOESTRUTURAS DE OURO.....	50
4.1.1 Caracterização Eletroquímica das Nanoestruturas de Ouro por Voltametria Cíclica.....	50
4.1.2 Caracterização Topográfica das Nanoestruturas de Ouro por Microscopia de Força Atômica.....	57
4.2 MODIFICAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS DE OURO COM MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS.....	60
4.2.1 Caracterização Eletroquímica das Nanoestruturas de Ouro Modificadas com as Monocamadas Auto-Organizadas por Voltametria Cíclica.....	60
4.2.2 Caracterização Eletroquímica das Nanoestruturas de Ouro Modificadas com as Monocamadas Auto-Organizadas por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	63
4.3 IMOBILIZAÇÃO DA GLICOSE OXIDASE E FERROCENO SOBRE A SUPERFÍCIE DO ELETRODO BIFUNCIONAL.....	66
4.3.1 Caracterização Eletroquímica do Eletrodo Bifuncional Modificado com Glicose Oxidase e Ferroceno por Voltametria Cíclica.....	66

<i>4.3.2 Caracterização do Eletrodo Bifuncional Modificado com Glicose Oxidase e Ferroceno por Microscopia Ótica e Microscopia de Força Atômica.....</i>	<i>73</i>
<i>4.4 CURVA ANALÍTICA E REPRODUTIBILIDADE.....</i>	<i>75</i>
<i>4.5 APLICAÇÃO DOS ELETRODOS EM AMOSTRAS COMERCIAIS.....</i>	<i>83</i>
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
Anexo 1 – Coeficiente de Abrangência (V_{eff}).....	107
Anexo 2 – t de Student.....	108

1 INTRODUÇÃO

A sacarose que possui forma molecular ($C_{12}H_{22}O_{11}$), que é um tipo de glicídio constituído por uma molécula de glicose e uma de frutose que quando hidrolisada liberam os produtos independentes como apresentado na reação abaixo.

Devido a este fato, a sacarose é um α -glicosídeo e um β -frutosídeo. O átomo de carbono C2 da frutose e o átomo de carbono C1 da glicose participam da ligação formando a molécula de sacarose.

A glicose é um açúcar redutor presente em diversos nutrientes na dieta humana. A glicose é abundante em vários alimentos, como sucos de frutas e mel, e pode ser facilmente e diretamente assimilados pelo corpo humano. Ela fornece a energia para o corpo humano para realizar seu metabolismo de forma saudável.

A regulação da glicose é feita no pâncreas, sendo que quando os níveis de glicose estão altos o pâncreas libera insulina para que seja feita sua quebra e eliminação em forma de energia, e quando os níveis estão baixos o pâncreas libera glucagon para que a glicose seja transformada em glicogênio no fígado.

Após a ingestão de alimentos ricos em carboidratos, estes são transformados em glicose e absorvidos pelo intestino delgado. A glicose é levada, então, ao sangue e, com a ação da insulina, transportada para o interior das células, onde será convertida em energia pelas mitocôndrias. Entretanto, para as pessoas portadoras de diabetes este processo é significativamente dificultado. Neles, a insulina deixa de agir e a glicose perde a capacidade de permear a membrana celular. Com isto, sua conversão em energia é minimizada e o organismo encara escassez de energia para o seu metabolismo.

Quando é ingerida uma alta quantidade de glicose, o organismo utiliza o que necessita e o excesso é transformado pelo fígado em glicogênio, que fica

armazenado. Quando o nível de glicogênio fica alto, o fígado começa a quebrar o glicogênio excedente, mandando-o para a corrente sanguínea, aumentando a concentração de glicose no sangue.

Assim, com a diminuição do consumo de alimentos ricos em glicose, diminui-se a concentração de glicose no sangue e também a taxa de triglicérides.

Pessoas diabéticas devem optar por alimentos com baixo índice de glicose, para terem um controle melhor da sua concentração no sangue. A maioria dos alimentos que possuem baixos teores de glicose têm maior teor de fibras e pouca gordura, o que os tornam benéficos para quem tem problemas cardiovasculares, como legumes, verduras, alimentos integrais e carboidratos ricos em fibras.

Os consumidores atualmente estão procurando produtos mais saudáveis e inovadores, que sejam seguros e de utilização prática. Na esteira dessa tendência mundial cresce o consumo de produtos “diet” e “light”, indicados para quem precisa manter dietas restritivas ao açúcar ou está preocupado com a estética e em manter hábitos alimentares saudáveis.

Devido a este fato torna-se importante a detecção de glicose em amostras alimentícias a fim de monitorar esse metabólito, devido à sua ligação com os problemas metabólicos acima.

Com isso o desenvolvimento de métodos robustos e confiáveis para detecção de glicose é muito importante e os novos materiais nanoestruturados desempenham um papel decisivo nos estudos divulgados por diferentes grupos de pesquisas, em todo o mundo.

1.1 NANOESTRUTURAS

Materiais nanoestruturados são os que possuem tamanho na escala de nanômetros geralmente iguais ou inferiores a $100\text{ }\mu\text{m}^1$.

Inicialmente os materiais na escala nanométrica eram obtidos por acaso, mas hoje em dia eles são sintetizados por meio de métodos físicos e químicos específicos permitindo assim projetar estruturas específicas que possuam uma propriedade característica por meio da manipulação intencional de seus átomos e moléculas. Sendo assim o estudo exploratório das propriedades nanométricas é o que alavanca a nanotecnologia².

A nanotecnologia, que começou a ser investigada mais intensamente na década de 90, teve um investimento de mais de 300 bilhões de reais no fim de 2007. Em 2013, este investimento está previsto para chegar a R\$ 1 trilhão².

O principal objetivo da nanotecnologia é usar as propriedades características destes materiais, como o aumento da área superficial. Estes dispositivos muitas vezes não possuem tamanho nanométrico, mas contêm em sua composição diversas estruturas nanométricas, o que resulta nas diversas propriedades e aplicações de interesse. Alguns exemplos muito utilizados nos últimos anos são os *quantum dots* que possuem diferentes características apenas com a variação do tamanho das partículas³.

Alguns materiais nanoestruturados mais destacados na literatura são os nanotubos de carbono, os derivados de fulereno, as membranas poliméricas, o óxido de zinco (ZnO), nanoestruturas de ouro (Au), prata (Ag), óxido de ferro (Fe₃O₄), óxido de titânio (TiO₂), o óxido de silício (SiO₂), os *quantum dots* (QDs), entre outros⁴.

Ao lado destes materiais podem ser destacados os processos no qual eles são obtidos, tais como a deposição química em fase de vapor (CVD), microemulsões, revestimentos poliméricos⁵, redução química⁶, deposições eletroquímicas, síntese por micro-ondas⁷, redução bioquímica⁸, método de precipitação⁹, hidrólise e calcinação¹⁰, método de sol-gel¹¹, entre outras.

Estes materiais e métodos estão sendo desenvolvidos para terem um impacto substancial em uma variedade de setores como no setor de energia (células solares, células a combustível e dispositivo de armazenamento de energia)¹², no setor de eletrônica (fotodiodos e chips de silício)¹³, no setor aeroespacial (materiais mais leves e combustíveis de foguete)¹⁴ e na medicina (diagnóstico por imagem, terapia fotodinâmica e carregadores de fármacos)¹⁵.

As sínteses de nanoestruturas são tão versáteis como os próprios materiais, como por exemplo, o fulereno que é uma forma alotrópica do carbono podem existir como esferas ocas, elipsoides, e podem ser sintetizados utilizando diversos métodos¹⁶.

As nanoestruturas de ouro são frequentemente sintetizadas através da redução química dos sais de ouro em soluções aquosas, orgânicas ou mistas na presença de estabilizadores como citrato e/ou contendo grupos tióis orgânicos.

Outro método de obtenção de nanoestruturas de ouro amplamente utilizado é a deposição eletroquímica a potencial controlado¹⁷.

O grande problema apontado dentro da nanotecnologia é a nanopoluição causada pela síntese ou pelos nanomateriais. Esta poluição, causada pelas nanopartículas em muitos casos são muito perigosas, pois elas migram pelo ar por grandes distâncias¹⁸.

Segundo Maciel *et al.*¹⁹ os materiais nanométricos são classificados em três categorias. A primeira são os materiais com pequenas dimensões formando fios, fitas ou filmes finos. A segunda categoria são os materiais onde a estrutura é limitada por uma região superficial fina (nanométrica) do volume do material. E a terceira e última categoria são os sólidos volumétricos que tem sua estrutura em nanômetros.

As nanopartículas também são classificadas como orgânicas e inorgânicas. Na classe de materiais inorgânicos estão as nanopartículas metálicas e óxidos. Na categoria de nanomateriais orgânicos estão às estruturas celulares e os vírus²⁰.

1.2 SUPERFÍCIES BIFUNCIONAIS

As superfícies bifuncionais são caracterizadas por apresentarem dois grupos de materiais diferentes, onde cada um deles apresenta propriedades físicas e químicas características²¹. As principais vantagens deste tipo de superfície são os baixos limites de detecção alcançados e a maior seletividade, sendo uma ótima plataforma para biossensores.

Para demonstrar a eficiência de um sistema bifuncional Qu *et al.*²² realizaram um estudo para determinação da demanda química de oxigênio, utilizando o eletrodo bifuncional de platina e óxido de titânio. No trabalho, os autores sugerem que o óxido de titânio serviu para promover a fotocatalise do oxigênio e a platina para a detecção do oxigênio gerado. Como resultado os autores encontraram um limite de detecção de 9,5 mg L⁻¹ para o eletrodo bifuncional, em comparação com um limite de detecção de 206 mg L⁻¹ para um eletrodo de platina sem modificação, demonstrando assim a eficiência do sistema bifuncional.

Em outro trabalho Baskar *et al.*²³ estudaram a determinação simultânea de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e peróxido de hidrogênio utilizando uma superfície bifuncional composta por um eletrodo impresso de carbono com

poli(tionina) utilizando a técnica de análise de injeção em fluxo. De acordo com os autores o eletrodo bifuncional apresentou um limite de detecção de $1,74 \mu\text{mol L}^{-1}$ enquanto que utilizando apenas o polímero encontrou-se limite de detecção de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

1.3 MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS

As monocamadas auto-organizadas (SAM - *self assembled monolayers*) são caracterizadas por formarem camadas monomoleculares como resultado da elevada afinidade entre adsorbato (alcanotióis e moléculas anfifílicas) e o substrato (Au, Ag, Pd, Cu, Fe, Ni, etc)²⁴, gerando estruturas bem definidas, organizadas e reproduzíveis. A organização do adsorbato se deve, principalmente, às interações laterais entre as moléculas adsorvidas sobre o substrato como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 - Representação das monocamadas auto-organizadas de alcanotióis sobre um substrato metálico.

Fonte: SMITH, R.K.; LEWIS, P.A.; WEISS, P.S. Patterning self-assembled monolayers. **Progress in Surface Science**, v.75, p.1-68, 2004.

As modificações utilizando-se monocamadas auto-organizadas podem ser formadas facilmente apenas pela imersão de uma superfície sólida (eletrodos de

ouro e prata) em solução contendo moléculas anfifílicas (cistamina ou ácido 11-mercaptopundecanóico)²⁵.

Dentre os diferentes tipos de SAMs, aquelas formadas por adsorção de alcanotióis são de longe as mais estudadas exatamente por serem altamente reprodutíveis e formarem monocamadas altamente compactas.

A força motriz que organiza estas moléculas sobre o substrato se deve às interações das suas longas cadeias ligadas ao grupo funcional²⁶. Uma grande variedade de substratos como Pt²⁷, Au²⁸, Ag²⁹, Cu³⁰ e de moléculas anfifílicas como álcoois, aminas e tióis³¹ estão sendo utilizados atualmente para obtenção de SAMs para diferentes aplicações. Quanto ao substrato no qual as SAMs podem ser ancoradas, Yang *et al.*³² apontam a adsorção de octadecanotiol sobre um eletrodo de prata formando assim uma camada auto-organizada sobre este substrato.

As propriedades catalíticas de interesse das SAMs são controladas pelo grupo terminal, assim uma grande diversidade de superfícies orgânicas organizadas com a funcionalidade desejada pode ser sintetizada facilmente. Dessa forma as SAMs vêm sendo intensamente aplicadas em diversos setores como proteção contra corrosão, litografia, simulação e fabricação de membranas e especialmente em sensores. A aplicação de SAMs como sensores eletroquímicos visa alcançar propriedades superficiais que possibilitem aumentar a seletividade ou sensibilidade do sensor, tais como aquelas mostradas na Figura 2.

Figura 2 - Principais propriedades das monocamadas auto-organizadas utilizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos

Fonte: FREIRE, R. S.; PESSOA, C.A.; KUBOTA, L.T. Self-Assembled Monolayers Applications for the Development of Electrochemical Sensors. **Química Nova**, v.26, n.3, p.381-89, 2003.

A principal metodologia encontrada na literatura para se preparar as SAMs e uma das que mais crescem nos últimos anos envolve a adsorção de monocamadas auto-organizadas de alcanotióis funcionalizados sobre superfícies de alguns metais altamente ordenados³³⁻³⁴. Muitos alcanotióis já foram estudados devido à sua alta interação com alguns substratos, como o ouro, por exemplo³⁵. Tsai *et al.*³⁶ apresentam um estudo utilizando-se microeletrodos compostos por nanopartículas de ouro imobilizando-se uma camada auto-organizada de ácido mercaptooctanoico para detecção analítica de dopamina.

A confecção de monocamadas auto-organizadas tem um papel de grande importância no funcionamento do eletrodo modificado, pois a estrutura da SAM depende da morfologia e das características do substrato utilizado. Características como a natureza do acoplamento e das forças intermoleculares entre as moléculas do adsorbato são extremamente importantes para aplicação em biossensores³⁷.

1.3.1 SAMs e suas Aplicações em Eletroanalítica

Na eletroanalítica nos últimos anos tem sido investigada a utilização das SAMs, uma vez que estas monocamadas são organizadas e compactas oferecendo

inúmeras vantagens, tais como, diminuição do sobrepotencial, menor tempo de resposta do eletrodo, além de maior sensibilidade e seletividade³⁸⁻³⁹.

Diversos trabalhos apresentam que a modificação da superfície de eletrodos afeta diretamente a velocidade de transferência de elétrons entre as moléculas de interesse e o substrato. Se a interação entre as moléculas de interesse e o substrato na superfície do eletrodo é fraca, a modificação do eletrodo afetará de maneira não muito significativa a cinética eletrônica, mas se esta interação ocorrer fortemente, a modificação do eletrodo tem a propriedade de controlá-la significativamente⁴⁰. Devido a este fato as SAMs estão sendo muito utilizada em eletroanalítica por causa da sua forte interação com a superfície do eletrodo, sendo aplicada em diversos dispositivos de controle analítico como em biossensores e sensores eletroquímicos⁴¹⁻⁴².

Diversas SAMs apresentam estabilidade em amplos intervalos de potenciais (+0,8 a -1,4 V vs. Ag/AgCl), sendo assim muito úteis em diversas aplicações em eletroanalítica⁴³.

Grande parte das aplicações das monocamadas auto-organizadas em eletroanalítica está na detecção de analitos orgânicos, tanto em matrizes biológicas quanto ambientais. Isto se deve ao fato das SAMs disporem de um ambiente hidrofóbico com alta interação com diversos analitos de interesse, além de ser um material de fácil obtenção e muito rápido na detecção e determinação de diversas substâncias de interesse. Além disso, analitos de caráter orgânico dispõem de maior interação com a monocamada comparada com íons metálicos, resultando assim numa maior seletividade dos sensores propostos⁴⁴.

Diversos artigos podem ser destacados na literatura sobre utilização das SAMs em eletroanalítica, como pode ser evidenciado no trabalho de Sivanesan *et al.*⁴⁵ que construíram um sensor eletroquímico para detecção de óxido nítrico utilizando a SAM de 1,8,15,22-tetraaminoftalocianato de cobalto (II) sobre um eletrodo de carbono vítreo. O sensor proposto pelos autores apresenta uma faixa linear de 3×10^{-9} a 30×10^{-9} mol L⁻¹ com limite de detecção de $1,4 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹. Diversos compostos de interesse analítico tais como DNA⁴⁶, glicose⁴⁷, vírus da hepatite C⁴⁸, íons lítio⁴⁹, entre outros foram detectados utilizando as SAMs.

Também merece destaque as SAMs utilizadas para ancorar nanotubos de carbono de maneira organizada sobre a superfície de eletrodos, como no trabalho apresentado por Ceglowski *et al.*⁵⁰, no qual os autores desenvolvem a

funcionalização de um eletrodo de ouro com nanotubos de carbono utilizando tióis para que os nanotubos se alinhassem perpendicularmente à superfície do eletrodo, apresentando assim uma maior transferência eletrônica.

Outra metodologia de aplicação das monocamadas auto-organizadas em eletroanalítica são aquelas que utilizam mais de um componente, formando-se as “SAMs mistas”, onde estas apresentam inúmeras propriedades úteis na eletroanalítica. Um exemplo deste tipo de superfície foi relatado por Cancino *et al.*⁵¹, no qual os autores desenvolvem um eletrodo de ouro modificado com os tióis ácido 11-mercaptoundecanóico e 2-mercaptoetanol e a enzima acetilcolinesterase para detecção de carbamatos em amostras ambientais. O limite de detecção para a determinação do analito foi de $3,45 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, demonstrando assim o baixo limite de detecção utilizando-se esta plataforma.

Atualmente em eletroanalítica as SAMs estão sendo muito utilizadas no desenvolvimento de biossensores, uma vez que estas estruturas servem para ancorar enzimas sobre as superfícies metálicas. Um exemplo desta aplicação é o relatado por Matharu *et al.*⁵² que construíram um biossensor para detecção de colesterol. Os autores realizam a modificação de um eletrodo de ouro com uma camada auto-organizada de 4-aminotiofenol e a enzima colesterol oxidase, tendo encontrado um intervalo de detecção para o analito de 25 a 400 mg dL⁻¹.

Além das aplicações em eletroanalítica, podem ser destacados outros tipos de aplicações como na corrosão⁵³, obtenção de superfícies impermeáveis, propriedades adesivas⁵⁴, entre outros.

1.3.2 SAMs e suas Aplicações em Biossensores

Em química analítica, em especial em eletroanalítica, a utilização de materiais biológicos promove significativos avanços tanto na área experimental quanto na teórica, com novas aplicações dentro destas áreas. Ultimamente os dispositivos mais utilizados em eletroanalítica são os biossensores, que usam diversos materiais biológicos e apresentam além de baixo custo, alta sensibilidade e seletividade, podendo assim ser utilizados para detecção de inúmeras moléculas de interesse analítico, como no controle e monitoramento ambiental, análises clínicas e de alimentos⁵⁵⁻⁵⁶.

O maior desafio para se construir biossensores robustos e confiáveis está na forma em que se imobilizam as moléculas biológicas sobre a superfície dos eletrodos, pois estas devem ser imobilizadas de maneira com que elas mantenham suas propriedades biológicas⁵⁷.

Segundo Freire *et al.*⁵⁸ as principais formas de imobilizar moléculas biológicas sobre uma superfície condutora são através de “*adsorção, ligação cruzada, ligação covalente e encapsulamento em membranas*”. Mas muitas vezes estes processos de imobilização sobre as superfícies condutoras não se apresentam de forma estável, pois as moléculas bioativas podem sofrer mudanças em sua conformação devido à desorganização da deposição sobre o substrato, fazendo assim que elas percam parte de sua atividade catalítica devido ao bloqueio dos sítios ativos da biomolécula. Com isso tem-se uma perda na sensibilidade e seletividade do analito.

Sendo assim uma maneira de melhorar a estabilidade das moléculas biológicas sobre a superfície de eletrodos é através da utilização das SAMs, onde é possível observar uma melhor resposta analítica em diferentes tipos de biossensores. Asav e Akyilmaz⁵⁹ relatam a utilização de camadas auto-organizadas de cistamina sobre um eletrodo de ouro como plataforma para as enzimas glicose oxidase e álcool oxidase. Como mediador para a detecção simultânea de glicose e etanol os autores utilizaram o tetratíofulvaleno, sendo observado limites de detecção de $75 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para os analitos.

Para os biossensores de primeira geração as SAMs podem proporcionar uma maior sensibilidade, pois oferecem as moléculas biológicas um ambiente e uma disposição privilegiada para os sítios ativos⁶⁰.

Em relação aos biossensores de segunda geração, as camadas auto-organizadas possuem grupos eletroativos que tem a função de mediador de elétrons, aumentando a velocidade de transferência de elétrons da superfície do eletrodo e a molécula biológica, ocasionando maior sensibilidade e seletividade⁶¹.

O grande desafio para a construção de biossensores de segunda geração utilizando SAMs está na relação entre o mediador de elétrons e o produto liberado pela reação enzimática, quando muitas vezes não é possível obter a reação entre estes dois componentes. Além desta interação é preciso que o mediador de elétrons interaja com os cofatores presentes na enzima (NAD e FAD, por exemplo)⁶².

Ren *et al.*⁶³ construíram um biossensor para detecção da atividade da lactato desidrogenase à base de *quantum dots*, no qual esta enzima utiliza o NAD como cofator da reação.

Para os biossensores de terceira geração é necessário ter o controle entre o processo de transferência eletrônica da superfície do eletrodo e o sistema biológico. Esta transferência de elétrons está diretamente relacionada com as propriedades da biomolécula, como a sua natureza (enzima, proteína, aminoácido, etc.), além da orientação do sítio ativo em relação à molécula de interesse e a superfície do eletrodo. Sendo assim a utilização das monocamadas auto-organizadas como plataforma para as moléculas biológicas permite controlar estas propriedades melhorando assim a resposta analítica do biossensor⁶⁴.

1.4 ELETRODOS MODIFICADOS

Um dos primeiros autores a descrever em seus trabalhos a expressão eletrodos modificados foi Moses *et al.*⁶⁵, onde os autores descreveram este termo para se referir a compostos químicos eletroquimicamente ativos imobilizados sobre a superfície de um eletrodo (ouro, platina, níquel, cobre, carbono vítreo, etc) controlando a transferência de elétrons entre a superfície e a solução.

A modificação química da superfície dos eletrodos permite uma maior interação entre a superfície e as espécies em solução, fazendo com que haja uma maior seletividade e uma melhor resposta eletroquímica, permitindo diversas aplicações como nas áreas de eletroanalítica e corrosão.

A partir da década de 70 surgiram os primeiros eletrodos quimicamente modificados. As principais superfícies utilizadas para modificação são as de carbono⁶⁶, ouro⁶⁷, platina⁶⁸ e mercúrio⁶⁹. Estas superfícies podem ser modificadas de inúmeras maneiras como por filmes e membranas⁶⁶, enzimas⁶⁴, nanoestruturas⁷⁰, entre outras.

Uma das aplicações mais utilizadas com eletrodos quimicamente modificados é na eletroanalítica, onde se utiliza mais comumente as técnicas amperométricas, voltamétricas e microbalança de cristal de quartzo⁷⁰, além de eletrodos de íons seletivos⁷¹.

Em eletroanalítica para se justificar a utilização de eletrodos quimicamente modificados o material deve apresentar uma maior sensibilidade (através de

incremento de corrente) e uma maior seletividade (através da diminuição do sobrepotencial diminuindo a oxidação/redução de interferentes), comparadas com eletrodos não modificados⁷².

Uma forma muito utilizada dos eletrodos modificados são os biossensores através de modificação da superfície com materiais biológicos⁶⁴ e membranas poliméricas como Nafion[®] que bloqueiam interferentes aumentando assim a sensibilidade do método⁷³, além da utilização de materiais catalíticos como nanoestruturas de ouro e cobalto para aumentar a sensibilidade⁷⁰.

1.4.1 Biossensores

Dentre as classes de eletrodos quimicamente modificados se encaixam os biossensores.

Um biossensor é caracterizado como um dispositivo capaz de fornecer informação analítica “específica”, quantitativa ou semi-quantitativa, utilizando um elemento de reconhecimento biológico, o qual está em contato espacial direto com o elemento de transdução⁷⁴. Tal mecanismo pode ser representado pela Figura 3.

Figura 3 - Modelo esquemático do funcionamento de um biossensor

Os biossensores funcionam como dispositivos analíticos, acoplados a uma um componente de reconhecimento biológico ou biologicamente derivado, integrado ou associado a um transdutor físico-químico. Nestes dispositivos o componente

biológico é o elemento de reconhecimento responsável pela detecção do analito e o transdutor realiza a conversão do estímulo na forma de energia mensurável⁷⁵.

Sendo assim os biossensores podem ser classificados como dispositivos que detectam analitos específicos através de reações biológicas com enzimas⁷⁶, anticorpos⁷⁷, ácidos nucleicos⁷⁸, entre outros.

A utilização de biossensores apresenta diversas vantagens, entre elas a alta sensibilidade e seletividade, fácil construção e aplicação, além de se mostrarem robustos, estáveis e passíveis de miniaturização⁷⁹. Um exemplo de biossensor em reações biológicas é o relatado por Gosselin *et al.*⁸⁰ que constroem um biossensor espectroscópico para detecção de tricoteceno em amostras ambientais utilizando anticorpos para esta detecção.

Existem dois mecanismos básicos de detecção na utilização dos biossensores. O primeiro é através da detecção direta, na qual ocorre a interação do material biológico com o transdutor e o sinal é medido diretamente, através de um ligante não catalítico. Como exemplo pode-se citar receptores de células e anticorpos. O segundo mecanismo é por detecção indireta, onde anticorpos ou enzimas são muito utilizados, detectando-se o produto da reação antígeno-anticorpo ou da reação enzimática. Um exemplo de detecção indireta utilizando-se enzimas foi relatado por El Ichi *et al.*⁸¹ que utilizaram a enzima peroxidase imobilizada em quitosana para aplicação em biossensores.

Os biossensores também podem ser divididos em dois grupos de acordo com o tipo de reconhecimento que este dispositivo realiza. No primeiro grupo se enquadram aqueles dispositivos onde um ligante é ancorado na superfície do eletrodo e reconhece por bioafinidade o analito. O segundo é quando uma enzima é ancorada na superfície de um eletrodo, onde sua reação com o respectivo substrato é inibida pelo analito⁸².

Na literatura estão relatadas diversas enzimas que são utilizadas como biossensores como lacase⁸³, peroxidase⁸¹, acetilcolinesterase⁷⁶, glicose oxidase⁸⁴, entre outras. Chawla *et al.*⁸⁵ construíram um biossensor para detecção de polifenol através da imobilização da enzima lacase sobre um eletrodo de ouro constituído por polianilina/nanotubos de carbono/chitosana/nanopartículas de cobre. O eletrodo proposto possui um limite de detecção de $0,156 \mu\text{mol L}^{-1}$. Outro exemplo de biossensores utilizando-se enzimas foi o relatado por Yalçner *et al.*⁸⁶ que desenvolvem um biossensor amperométrico para detecção de peróxido de

hidrogênio utilizando a enzima peroxidase imobilizada sobre a superfície de um eletrodo compósito composto por nanopartículas de ferrita de níquel em quitosana.

Os biossensores são aplicados em diversas áreas, como na indústria de alimentos, na agricultura, área clínica, explicando assim o interesse no desenvolvimento destes⁸⁷.

1.5 SENSORES PARA GLICOSE

A detecção de glicose é de interesse para os seres humanos devido a doenças como a diabetes, tornando-se necessário o seu controle e monitoramento. O excesso de glicose no sangue gera doenças como a diabetes e a ausência gera atrofia muscular, sendo assim necessário o desenvolvimento de novas metodologias capazes de monitorar o nível de glicose sanguínea em tempo real e *in situ*⁸⁸.

Devido a este fato os biossensores ganharam muita atenção no campo da monitorização da glicose sanguínea, ambiental e na indústria de alimentos. Uma variedade de diferentes biossensores para glicose foi desenvolvida e comercializada nas últimas três décadas, mas ainda há muito esforço na melhoria do seu desempenho⁸⁹.

A determinação da concentração de glicose é particularmente de grande valia em alguns produtos alimentares, pois a glicose provoca escurecimento durante o armazenamento, e desidratação em longo prazo, principalmente devida à reação de Maillard⁹⁰. Este é um dos principais obstáculos para a fabricação de ovo desidratado e na hidrólise de dextranos de elevada massa molar e para os oligossacarídeos, utilizados na produção de produtos farmacêuticos⁹¹. Sendo assim, a determinação quantitativa de glicose constitui uma medida importante no controle de qualidade alimentar do produto.

Numerosos métodos têm sido relatados para a análise de glicose em alimentos. Diversos métodos de detecção são listados na literatura como análise de injeção em fluxo⁹¹ e amperometria⁹² para detecção de glicose com baixos limites de detecção. Su *et al.*⁹³ relatam o desenvolvimento de um biossensor amperométrico por injeção em fluxo para detecção de glicose utilizando-se uma célula amperométrica modificada por resina de troca iônica. O biossensor apresentou um limite de detecção de 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

No entanto, a maioria dos métodos atuais envolvem procedimentos demorados ou custosos. Mesmo na área clínica, vários dispositivos estão disponíveis para detecção de glicose de forma precisa e rápida, porém eles são frequentemente projetados para operar em condições de soro sanguíneo⁸⁹. Devido a este fato é preciso desenvolver métodos baratos, rápidos, seletivos e práticos para a detecção de glicose em alimentos, pois as pesquisas atuais estão voltadas para a detecção na área clínica.

Os biossensores que são construídos através de enzimas têm sido utilizados em várias áreas do conhecimento em um longo período de tempo e são muitas as tecnologias para ancorar enzimas.

Determinações enzimáticas de glicose envolvem a enzima glicose oxidase em uma sequência de reações redox, liberando como produto final peróxido de hidrogênio como representada na Equação (1)⁹².

Exemplos do uso de glicose oxidase imobilizada em eletrodos podem ser citados para determinação de glicose no sangue⁸⁹, chocolate⁹², e outros produtos alimentícios. Um exemplo de aplicação de um biossensor em amostras sanguíneas é o relatado por Reshetilov *et al.*⁹⁴ que desenvolvem um biossensor para glicose utilizando um eletrodo de Clark.

Para a detecção de glicose em amostras sanguíneas existem três métodos básicos de biossensores para sua detecção, sendo os métodos invasivos, não invasivos e semi-invasivos. Nos métodos invasivos as amostras sanguíneas são retiradas através da utilização de agulhas. No método semi-invasivo utiliza-se uma quantidade de amostra sanguínea muito pequena, onde se tem a perfuração, mas de modo imperceptível. Na metodologia não invasiva que está sendo muito pesquisada ultimamente não se tem a perfuração da pele do paciente, onde é possível a detecção de glicose através da lágrima, saliva e/ou suor⁹⁵.

Os pacientes portadores de diabetes têm que retirar uma amostra sanguínea todos os dias para o seu controle e monitoramento, sendo assim existe no mercado diversos aparelhos para a detecção de glicose no sangue. Mas esses aparelhos mensuram a glicose de modo invasivo, nos quais os paciente tem que perfurar a pele com uma agulha todas as vezes que vai fazer o exame, sendo um desconforto

para os pacientes⁹⁶. Sendo assim o desenvolvimento de métodos não invasivos para detecção de glicose em seres humanos se torna muito importante.

Melikyan *et al.*⁹⁷ estão desenvolvendo um método não invasivo de detecção de glicose em sangue de porco *in vitro* através da técnica de ressonância magnética espiral. A variação da concentração de glicose faz com que mude o coeficiente de reflexão, por causa da interação eletromagnética entre a solução de glicose e o ressonador.

1.6 ULTRAMICROELETRODOS (UME)

Os ultramicroeletrodos surgiram no início da década de 70 revolucionando algumas áreas, tais como a cinética eletroquímica e a eletroanalítica, pois este tipo de eletrodo permitiu descobrir novas propriedades eletroquímicas antes não acessíveis como análise *in vivo*⁹⁸, utilização de altas velocidades sem a distorção dos perfis⁹⁹, eletroquímica em eletrólitos pouco condutores¹⁰⁰, entre outros.

Os ultramicroeletrodos apresentam diâmetro que variam de 1 a 50 µm, adquirindo diversas características como uma maior velocidade de transferência de massa, baixa sensibilidade à queda ôhmica e maior relação corrente faradaica/corrente capacitiva. Estes eletrodos possuem diversas geometrias, podendo ser em formato de discos, bandas, anéis, cilindros, entre outras¹⁰⁰.

Na eletroanalítica estes eletrodos estão sendo muito utilizados em análises de metais pesados¹⁰¹, biossensores¹⁰², monitoramento ambiental¹⁰³, entre outros. Também merece destaque na aplicação destes eletrodos em diversas reações orgânicas¹⁰⁴, estudos na ausência de eletrólito de suporte¹⁰⁰ e reações de desprendimento de gases¹⁰⁵.

Na construção de biossensores a utilização de ultramicroeletrodos se deve a dois fatos principais. O primeiro é em relação à miniaturização, onde se podem construir dispositivos para análise *in vivo*⁹⁸ e o segundo fato quanto a sensibilidade do método, onde ultramicroeletrodos conseguem alcançar baixos limites de detecção comparados a eletrodos convencionais. Vasylieva *et al.*¹⁰² construíram um biossensor utilizando ultramicroeletrodos modificados com polietilenoglicol diglicidil éter. O polímero tem a função de ancorar as enzimas, onde os autores utilizaram a glicose oxidase, aminoácido oxidase e glutamato oxidase, e posteriormente o eletrodo foi aplicado em análise *in vivo* em ratos.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de uma superfície bifuncional Pt/Au modificada com uma camada auto-organizada de cistamina para ancoragem da enzima glicose oxidase para determinação de açúcar em amostras alimentícias. Este objetivo geral pode ser decomposto segundo o cronograma abaixo:

- Construir os eletrodos;
- Obter uma superfície bifuncional Pt/Au;
- Imobilizar as monocamadas auto-organizadas sobre os eletrodos bifuncionais;
- Imobilizar a enzima (glicose oxidase) e o mediador de elétrons (ferroceno);
- Caracterizar a superfície por técnicas eletroanalíticas e técnicas microscópicas;
- Estabelecer uma rotina eletroanalítica para determinação de glicose em amostras reais;
- Realizar um estudo estatístico do método proposto.

3 METODOLOGIA

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes utilizados durante os experimentos estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Procedência e pureza dos reagentes utilizados

Material	Fórmula Química	Procedência	Pureza (%)
Glicose Oxidase	-	Sigma-Aldrich	-
Glicose	$C_6H_{12}O_6$	Sigma-Aldrich	-
Ferrocianeto de potássio	$K_3Fe(CN)_6$	J.T.Baker	99,4
Ferricianeto de potássio	$K_4Fe(CN)_6$	Mallinckrodt	99,5
Ácido Sulfúrico	H_2SO_4	Synth	> 95
Ácido tetracloroaurico Trihidratado	$HAuCl_4 \cdot 3H_2O$	Sigma-Aldrich	99,9
Glutaraldeído	$HOC(CH_2)_3CHO$	Sigma-Aldrich	-
Ferroceno	$C_{10}H_{10}Fe$	Sigma-Aldrich	>95
Metanol	CH_3OH	J.T.Baker	99,8
Dihidrocloreto de cistamina	$C_4H_{12}N_2S_2 \cdot 2HCl$	Sigma-Aldrich	98
Fosfato de sódio dibásico anidro	Na_2HPO_4	J.T.Baker	99,6
Fosfato de potássio monobásico	KH_2PO_4	Merck	99,5
α – Alumina (1 μm)	Al_2O_3	Buehler	-
α – Alumina (0,3 μm)	Al_2O_3	Buehler	-
α – Alumina (0,05 μm)	Al_2O_3	Buehler	-

Para a deposição de ouro sobre a superfície da platina foi utilizada uma solução de ácido tetracloroáurico trihidratado $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

As medidas voltamétricas e de espectroscopia de impedância eletroquímica foram feitas utilizando uma solução de ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, uma solução de ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e uma solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A imobilização na camada auto-organizada foi realizada utilizando-se uma solução de dihidrocloreto de cistamina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em álcool etílico.

Após a formação da SAM sobre a superfície do eletrodo, o mesmo foi modificado utilizando uma solução de glicose oxidase (GOx) de 1000U em PBS, uma solução etanólica de glutaraldeído (Glu) 0,5% e uma solução de ferroceno (Fc) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol.

Para a construção da curva de calibração foi preparada uma solução padrão de glicose $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato (PBS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e diluído posteriormente de acordo com cada experimento realizado.

3.2 PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS

Para a detecção de glicose em diversas matrizes alimentícias foram desenvolvidos três eletrodos diferentes, sendo um Eletrodo Embutido (EE), um Eletrodo por Evaporação de Platina (EEP) e um Ultramicroeletrodo (UME), construídos conforme se descreve a seguir.

3.2.1 Eletrodo Embutido (EE)

Para a detecção de glicose em amostras que não demandam pré-tratamentos como extração e *clean-up*, como refrigerantes e chá foi desenvolvido um eletrodo embutido (EE). Este eletrodo foi constituído utilizando um tubo de vidro de 11 mm de diâmetro contendo dois fios de platina, sendo um como contra eletrodo e outro como eletrodo de trabalho, além de um fio de prata como eletrodo de referência (pseudo-referência), embutidos em resina Epóxi (Figura 4). A Figura 4 apresenta o eletrodo proposto.

Figura 4 - Eletrodo Embutido para detecção de glicose em alimentos.

3.2.2 Eletrodo por Evaporação de Platina (EEP)

Para a detecção de glicose em amostras sólidas com necessidade de pré-tratamento como iogurte foi desenvolvido um Eletrodo por Evaporação de Platina. Para construção deste eletrodo foi cortado uma placa de vidro de 25 mm de comprimento por 10 mm de largura. Foi construída uma máscara utilizando o software CorelDraw X5. Após esta máscara foi colocada sobre a placa de vidro para a evaporação de platina como apresentado na Figura 5. O eletrodo de trabalho contém uma área de $0,071 \text{ cm}^2$.

Para a evaporação foi utilizado um alvo de platina de 55 mm (Figura 5D), onde foi colocado em um evaporador BAL-TEC MED020 sob pressão de 5,0 Pa, potência de 70 W e voltagem de -80 V com atmosfera de argônio, a fim de obter as partículas de platina de 40 nm sobre o suporte de vidro¹⁰⁶.

Figura 5 - Eletrodo por Evaporação de Platina para detecção de glicose em alimentos. (A) e (B) EEP; (C) máscara para o EEP e (D) alvo de platina.

3.2.3 Ultramicroeletrodo (UME)

Para a detecção de glicose com menores limites de detecção e uma futura aplicação em amostras não invasivas (saliva, lágrima e suor) foi construído um ultramicroeletrodo de Pt (UME) com 50 μm de diâmetro embutido em capilar de vidro mantendo a ponta do micro fio de Pt exposta.

Para a selagem o capilar foi preenchido com resina epóxi. Após o tempo de cura da resina, o eletrodo foi polido. Um acabamento com resina Araldite® foi feito na outra extremidade do tubo de vidro, para evitar a quebra do contato elétrico durante a utilização¹⁰⁷.

3.3 MATERIAIS E INSTRUMENTOS PARA MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

3.3.1 Medidas Eletroquímicas

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT30/Autolab® utilizando o software GPES. Os resultados obtidos foram tratados utilizando o programa Origin da Microcal Inc. 7.0®.

3.3.2 Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Para a realização dos experimentos de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) utilizou-se os mesmos materiais das medidas voltamétricas. Os experimentos foram realizados em um potenciostato PGSTAT30/ Autolab® acoplado a um microcomputador e controlado pelo software FRA. Os espectros de plano complexo foram analisados com o software Electrochemistry-ZView2.

3.3.3 Medidas com Microscopia de Força Atômica

As medidas de microscopia de força atômica foram realizadas em um microscópio Nanosurf easyScan 2 da Nanosurf, com modo de operação de contato e não contato. Os resultados foram tratados no software nanosurf easyScan 2.

3.3.4 Medidas com Microscopia Ótica

As medidas de microscopia ótica foram realizadas em um microscópio HIROX KH-7700 com lente OL-350II.

3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.4.1 Limpeza da superfície dos eletrodos

Para o EE e UME o pré-tratamento da superfície foi realizado em três etapas, sendo um procedimento químico, um polimento mecânico e uma etapa eletroquímica. Para o EEP foi realizado em duas etapas, sendo o procedimento químico e o procedimento eletroquímico.

O procedimento químico consiste na imersão dos eletrodos por um período de 10 minutos em uma solução de 1:3 $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{SO}_4$ (v/v), ambos concentrados. Posteriormente os eletrodos foram enxaguados com água ultrapura. O polimento mecânico foi realizado através do polimento com lixas d'água (600 - 1200 - 2000) e suspensão de alumina (1,0, 0,3 e 0,05 μm). Já o polimento eletroquímico foi procedido por voltametria cíclica de -0,2 a 1.45 V (vs Ag/Ag^+) em solução de H_2SO_4

0,1 mol L⁻¹ até se obter um perfil voltamétrico estável e de acordo com o reportado na literatura para Pt no mesmo eletrólito¹⁰⁸.

3.4.2 Obtenção da superfície bifuncional

As nanoestruturas de ouro foram formadas sobre a superfície dos eletrodos de platina, previamente tratadas. Para tal, foi procedida uma varredura linear de potenciais, no intervalo entre 1,6 a -0,2 V (vs Ag/Ag⁺) em eletrólito de H₂SO₄, 0,1 mol L⁻¹ contendo 1,0 mmol L⁻¹ de ácido tetracloroáurico. Para a padronização do método, foi feito a variação da velocidade de varredura de deposição visando obter nanoestruturas separadas de Au e não um filme contínuo do metal sobre a Pt. A velocidade de varredura escolhida para a deposição na superfície foi de 100 mV s⁻¹ para os eletrodos EE e EEP, e 25 mV s⁻¹ para o eletrodo UME.

3.4.3 Cálculo das Áreas Superficiais do eletrodo bifuncional Pt/Au

A área eletroativa do eletrodo de Pt/Au foi calculado a partir da carga de dessorção do hidrogênio adsorvido na fração da superfície do eletrodo composta por platina antes e após a modificação com Au. Para isso, foi utilizada a voltametria cíclica em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹. Sabe-se que uma monocamada completa de hidrogênio adsorvido sobre Pt policristalina demanda uma carga de 210 μC cm⁻²¹⁰⁹ para sua dessorção. Dividindo-se a carga encontrada experimentalmente pela densidade de carga teórica tem-se a área eletroativa da Pt¹⁰⁹. Dessa forma, a área do eletrodo de Pt recoberta com Au foi calculado através da diferença entre a carga (obtida da região de adsorção de hidrogênio) antes e após a modificação com as nanoestruturas de Au.

3.4.4 Preparação das Monocamadas Auto-Organizadas de Alcanotóis

A adsorção dos alcanotóis na fração de Au das superfícies eletródicas devidamente limpas foi realizada por meio de imersão dos eletrodos bifuncionais em solução etanólica de cistamina (Cys) 1,0 mmol L⁻¹. A influência do tempo de imersão do eletrodo na solução de cistamina na formação da SAM foi investigada, onde o tempo ótimo de imersão foi de 6 horas. Foram utilizadas técnicas voltamétricas,

espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e microscopia de força atômica (AFM) para a caracterização da superfície.

A caracterização eletroquímica da superfície foi realizada utilizando uma solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em um intervalo de potencial de $-0,1$ a $0,8 \text{ V}$ vs. Ag/Ag^+ .

A Pt possui pouca interação com a SAM, pois não há muita afinidade do substrato com os átomos de enxofre da cistamina, assim, apenas as nanoestruturas de ouro foram modificadas pela imersão do eletrodo em solução de contendo este²⁸.

3.4.5 Imobilização da enzima (glicose oxidase) e do mediador de elétrons (ferroceno)

Para a construção do biossensor, foram adicionados $10 \mu\text{L}$ enzima (glicose oxidase contendo 1000U em tampão PBS), $5 \mu\text{L}$ de glutaraldeído $0,5 \%$ e, por último, $10 \mu\text{L}$ do mediador de elétrons (ferroceno) sobre a superfície do eletrodo bifuncional modificado¹¹⁰. Na otimização da eficiência do biossensor foram variadas as quantidades de enzima, glutaraldeído (Glu) e ferroceno (Fc).

Para a caracterização da reação enzimática foram utilizadas técnicas voltamétricas, espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e microscopia ótica. A distribuição das espécies na superfície do biossensor está esquematizada na Figura 6.

A caracterização eletroquímica foi realizada utilizando uma solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em um intervalo de potencial de $-0,1$ a $0,6 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl .

Figura 6 - Modelo esquemático da superfície do eletrodo bifuncional modificado.

3.4.6 Estabelecimento de uma Rotina Eletroanalítica para Detecção de Glicose

Nesta etapa do desenvolvimento do trabalho, a glicose foi testada visando determinar o seu comportamento eletroquímico (em ambiente controlado) sobre os eletrodos desenvolvidos e caracterizados anteriormente. O perfil voltamétrico da glicose sobre o biossensor foi analisado utilizando tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{pH} = 7$. Em seguida, foi estabelecida uma rotina de análise, utilizando as técnicas de voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e cronoamperometria, utilizando os eletrodos desenvolvidos. Para isto, foram feitas dez curvas de trabalho com diferentes eletrodos através da adição de glicose $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em uma cela eletroquímica de 10 mL utilizando-se a técnica de cronoamperometria aplicando um potencial de oxidação/redução do analito de $0,25 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ para EE e UME e $0,35 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ para EEP, com um tempo de estabilização de corrente difusional de 60 segundos, obtendo assim os melhores valores de corrente (maior corrente de pico) e potencial foram utilizados para a construção da curva analítica.

Para via de comparação, os eletrodos de Pt, Pt/Au, Pt/Au/Cys, Pt/Au/Cys/Glu/GOx e Pt/Au/Cys/Glu/Gox/Fc também foram submetidos aos mesmos procedimentos eletroquímicos adotados para a detecção e quantificação de glicose.

A partir de diversas curvas analíticas, para a glicose, foi feita uma análise estatística dos resultados e valores como linearidade de resposta, limites de detecção e quantificação, sensibilidade, desvio padrão relativo, erro relativo, incerteza e reprodutibilidade foram obtidos.

3.5 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS

Após o desenvolvimento da metodologia analítica, esta foi aplicada na determinação de glicose em amostras alimentícias. Com isto avaliou-se a influência das impurezas presentes nestas matrizes no limite de detecção e o erro experimental envolvido na determinação do analito em estudo. As amostras analisadas foram refrigerante, chá e iogurte.

3.5.1 Preparo da Amostra de Refrigerante e Chá

Para as amostras de refrigerante e chá foram utilizados o Eletrodo Embutido. Uma vez que essas amostras são líquidas, as mesmas não necessitam de pré-tratamento. Nestes casos, o eletrodo foi inserido diretamente dentro da amostra em questão e feita à quantificação de glicose.

3.5.2 Preparo da Amostra de Iogurte

Para a amostra de iogurte foi utilizado o Eletrodo por Evaporação de Platina. Estas amostras por serem sólidas necessitam de um pré-tratamento. Segundo Conzuelo *et al.*¹¹¹ para a detecção de glicose em iogurte foi necessário suspender 1,0 g da amostra em 15 mL de água destilada e agitar por 10 minutos. A parte dissolvida da amostra foi transferida para um balão volumétrico e diluída em água destilada.

Após o pré-tratamento das amostras foi gotejado sobre o eletrodo 1,0 mL da solução a fim de formar uma gota sobre os eletrodos e assim foi quantificada a glicose presente na amostra.

3.6 ESTUDO ESTATÍSTICO DO MÉTODO

Para aumentar a confiança na interpretação dos resultados obtidos com os três eletrodos modificados utilizados neste trabalho, análises foram feitas repetidamente e os resultados interpretados utilizando o modelo estatístico descrito na referência 112. Os parâmetros analisados são descritos a seguir.

3.6.1 Limite de Detecção e Quantificação Pelo Tratamento Estatístico

A avaliação dos erros experimentais, os limites de confiança e os cálculos dos limites de detecção e quantificação foram calculados a partir do procedimento estatístico descrito em Miller & Miller¹¹². Para se estimar quão bem os pontos experimentais se ajustam em uma linha reta, foi calculado o coeficiente de correlação produto-momento, r , dado por:

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}} \quad (2)$$

onde $(\bar{x}, \bar{y})$ é a posição conhecida como “centróide” de todos os pontos, sendo a média aritmética dos valores de x (concentrações dos padrões) e a dos valores de y (resposta do instrumento). O coeficiente de correlação pode variar no intervalo entre $-1 \leq r \leq +1$. O valor de $r = +1$ descreve uma correlação perfeita, isto é, todos os pontos experimentais, caem numa linha reta. A Equação algébrica que satisfaz um gráfico linear é dada por:

$$y = a + bx \quad (3)$$

onde **b** é a tangente da linha e **a** o intercepto no eixo y.

Assumindo que existe uma correlação linear entre o sinal analítico (y) e a concentração (x), deve ser calculada a melhor linha reta entre os pontos da curva de calibração, considerando os erros experimentais de cada um deles.

Os procedimentos descritos assumem que todos os erros estão na direção y e que as concentrações padrão (valores de x) estão livres de erros. Desta forma, procura-se uma reta que minimize os desvios na direção y entre os dados experimentais e a reta calculada. Como alguns desses desvios, conhecidos tecnicamente como os resíduos y, serão positivos e outros negativos, é conveniente tentar minimizar a soma dos quadrados dos resíduos. Isso explica o uso freqüente do termo “método dos mínimos quadrados” para esse procedimento.

A tangente **b** e o intercepto no eixo y da linha **a**, calculados com base nesse princípio são dados por:

$$b = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (4)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (5)$$

A linha calculada desta maneira é conhecida como curva de regressão de y em x, isso é, a curva indicando como y varia quando x é colocado nos valores escolhidos.

Os erros aleatórios nos valores para a tangente e intercepto são importantes e as equações usadas para calculá-los serão consideradas. Inicialmente foi calculada a estatística $S_{y/x}$ que é dada por:

$$S_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right\}^{1/2} \quad (6)$$

$S_{y/x}$ é o desvio padrão estimado de cada ponto do gráfico, incluindo o ponto do “branco”, com uma variação de erros normalmente distribuída apenas na direção y.

A Equação (6) utiliza os valores residuais de y ($\hat{y}$), sendo os pontos na curva de regressão calculada que correspondem aos valores individuais de x, isso é, os valores ajustados de y. Esses valores são facilmente calculados com a Equação de regressão.

Numa regressão linear, o número de graus de liberdade é $(n - 2)$, sendo n o número de experimentos realizados, o que reflete a consideração óbvia de que somente uma linha reta pode ser traçada passando por dois pontos dados.

Com o valor calculado de $S_{y/x}$ pode-se calcular S_b e S_a , os desvios padrão para a tangente (b) e o intercepto (a).

$$S_b = \frac{S_{1/2}}{\{\sum_i (x_i - \bar{x})^2\}^{1/2}} \quad (7)$$

$$S_a = S_{y/x} \left\{ \frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2} \quad (8)$$

Esses valores de desvio padrão podem ser utilizados para se estimar os limites de confiança para a tangente ($b \pm t_{(n-2)} \times S_b$) e para o intercepto ($a \pm t_{(n-2)} \times S_a$), onde t é o parâmetro de Student (valor tabelado), que pode ser tomado no nível de confiança desejado e $(n - 2)$ graus de liberdade.

Uma vez que a tangente e o intercepto de uma curva de regressão tenham sido determinados, é simples calcular um valor de x correspondente a qualquer valor medido de y. A determinação do erro no valor de x é dada por:

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \left\{ 1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2} \quad (9)$$

na expressão acima y_0 é o valor experimental de y , a partir do qual o valor de concentração x_0 pode ser determinado. S_{x_0} é o desvio padrão estimado de x_0 . Os limites de confiança puderam ser calculados como $x_0 = t_{(n-2)} \times S_{x_0}$.

Finalmente foram determinados os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ).

Em termos gerais, o limite de detecção de um analito pode ser descrito como aquela concentração que dá um sinal (y) no instrumento significativamente diferente do sinal do “branco” ou da “linha de base”⁴⁸.

Para os cálculos do LOD e LOQ foram utilizadas as relações:

$$\text{LOD} = y_B + 3 S_B \quad (10)$$

$$\text{LOQ} = y_B + 10 S_B \quad (11)$$

nessas equações y_B é o valor do sinal do “branco” e S_B é o desvio padrão do “branco”.

3.6.2 Erros, Incertezas e Desvio Padrão da Curva Analítica

Para o cálculo dos erros, incertezas, desvio padrão e limite de confiança da curva analítica foram construídas dez curvas analíticas com diferentes eletrodos através da adição de um padrão de glicose $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ em uma cela eletroquímica de 10 mL.

3.6.2.1 Incerteza Padrão Tipo A

A incerteza padrão tipo A está relacionada com as repetições de experimentos e é intrínseca do processo de medição¹¹⁵, podendo ser calculada segundo a Equação (12).

$$U(x_i) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (12)$$

Onde s é o desvio padrão de cada curva analítica.

3.6.2.2 Incerteza do Fator de Diluição

Esta incerteza está relacionada à diluição provocada pelas sucessivas adições dos padrões de glicose na cela eletroquímica¹¹³. A Equação (13) apresenta como calcular este valor.

$$f(x_i) = \frac{V_f}{V_i} \quad (13)$$

Onde V_f é o volume final da solução diluída e V_i é o volume adicionado na cela eletroquímica.

3.6.2.3 Incerteza pelo Fator de Correção

Esta incerteza está relacionada com a média de cada uma das curvas de calibração obtidas¹¹³. Para o calculo desta incerteza foi utilizada a Equação (14).

$$U(F) = \frac{U(U(x_i))}{\bar{x}} \quad (14)$$

Onde $U(x_i)$ é a incerteza padrão tipo A e $\bar{x}$ a média de corrente de cada ponto da curva de calibração.

3.6.2.4 Incerteza das Grandezas de Mensuração

Esta incerteza está relacionada com a sensibilidade do método, onde se tem a contribuição de cada ponto da curva de calibração na incerteza do método¹¹³. Para este calculo utilizou-se a Equação (15).

$$U_y(x_i) = C_i(x_i) \times U(x_i) \quad (15)$$

Onde $U(x_i)$ é a incerteza padrão tipo A e $C_i(x_i)$ é o coeficiente de sensibilidade do mensurando que é dado pela Equação (16).

$$C_i(x_i) = \frac{\Delta y}{\Delta x} \quad (16)$$

Onde Δy é a variação de corrente da curva de calibração e Δx é a variação da concentração do padrão de glicose da curva de calibração.

3.6.2.5 Incerteza Padrão Combinada

Está relacionada com as somas das incertezas do sistema¹¹⁵, onde foi calculada segundo a Equação (17).

$$U_{cy} = \sqrt{\sum_0 (U(x_i))^2} \quad (17)$$

Onde $U(x_i)$ é a incerteza padrão tipo A.

3.6.2.6 Incerteza Expandida

É a incerteza total do sistema¹¹³, onde foi calculada segundo a Equação (18).

$$U = k \times U_{cy} \quad (18)$$

Onde U_{cy} é a incerteza padrão combinada e k é o coeficiente de abrangência que foi calculado segundo a Equação (19) que apresenta o grau de liberdade efetivo.

$$V_{eff} = \frac{(U_{cy})^4}{\frac{\sum (U_y(x_i))^4}{n-1}} \quad (19)$$

Onde V_{eff} é o grau de liberdade efetivo; U_{cy} é a incerteza padrão combinada; $U_y(x_i)$ é a incerteza das grandezas de mensuração e n é o número de repetições. Através do valor de V_{eff} ¹¹³ (Anexo 1) foi encontrado o coeficiente de abrangência (k).

3.6.2.7 Limite de Confiança

O limite de confiança é dado como o intervalo confiável de mensuração, onde é uma teoria estatística que é utilizada para calcular a probabilidade da diferença observada entre a média das amostras e o valor verdadeiro que seja originada de erros aleatórios¹¹². A Equação (20) representa como foi calculado o nível de confiança de 95% para a curva de calibração.

$$\mu = \bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (20)$$

Onde μ é o valor verdadeiro; $\bar{x}$ a média da amostra; t é o valor tabelado do parâmetro de *Student* em função dos graus de liberdade ($n-1$); s é o desvio padrão e n é o número de repetições.

3.6.3 Tratamento Estatístico das Amostras Analisadas

Para os estudos estatísticos das amostras reais foram comparados o eletrodo proposto, o valor rotulado na embalagem dos produtos alimentícios e um glicosímetro comercial BREEZETM2 da Bayer[®]. Para cada amostra analisada foram feitas dez repetições através de cinco adições de padrão de glicose 0,001 mol L⁻¹.

3.6.3.1 Erro Relativo, Desvio Padrão e Incerteza da Mensuração

O erro relativo é dado pela diferença entre o valor detectado e o valor exato da amostra¹¹⁴, onde foi calculado pela Equação (21).

$$\%E_r = \frac{C_{exp} - C_{ref}}{C_{ref}} \quad (21)$$

Onde C_{exp} é a concentração detectada com o eletrodo proposto e C_{ref} é a concentração padrão.

A incerteza de mensuração e o desvio padrão foram calculados segundo as equações (7) e (12).

3.6.3.2 Índice Z

O índice Z segundo Gomes-Júnior ¹¹³ “*é um teste estatístico cujo objetivo é testar a igualdade entre a média conhecida e uma média calculada*”. O índice Z foi calculado utilizando a Equação (22).

$$Z_i = \frac{C_{\text{exp}} - C_{\text{ref}}}{s} \quad (22)$$

Onde C_{exp} é a concentração detectada com o eletrodo proposto; C_{ref} é a concentração padrão e s é o desvio padrão.

Ainda segundo Gomes-Júnior ¹¹⁵ “*considera que $|Z| < 3$ tem-se que o resultado individual da amostra controle, no caso o material de referência que está sendo analisado, deve estar dentro de 99% do intervalo de confiança do valor esperado*”.

3.6.3.3 Teste t

Este teste consiste na comparação entre a média experimental das análises com um valor conhecido padrão¹¹², onde foi calculado através da Equação (23).

$$|t| = (\bar{x} - \mu) \frac{\sqrt{n}}{s} \quad (23)$$

Onde μ é o valor verdadeiro; $\bar{x}$ a média da amostra; t é o valor tabelado de *Student* em função dos graus de liberdade ($n-1$) (Anexo 2); s é o desvio padrão e n é o número de repetições.

Se o valor de $|t|$ exceder o valor crítico tabelado (Anexo 2), a hipótese nula será rejeitada, demonstrando que o resultado experimental não se encontra dentro do intervalo de confiança do método¹¹².

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 DEPOSIÇÃO DAS NANOESTRUTURAS DE OURO

As nanoestruturas de ouro foram depositadas sobre o eletrodo de platina utilizando a voltametria de varredura linear no intervalo de potencial de 1,6 a -0,2 V vs. Ag/Ag^+ em uma solução de ácido tetracloroáurico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O comportamento eletroquímico dos eletrodos de Pt, Au e Pt/Au foram estudados em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de potencial de -0,2 a 1,45 V vs. Ag/Ag^+ . A morfologia da superfície foi estudada com AFM no modo não contato.

4.1.1 Caracterização das Nanoestruturas de Ouro por Voltametria Cíclica

Inicialmente foi realizada a caracterização da superfície do eletrodo de platina em uma solução de ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, após todos os procedimentos de limpeza como descrito na seção 3.4.1. A Figura 7 apresenta o voltamograma típico da platina obtido para o eletrodo EE.

Figura 7 – Voltamograma cíclico do eletrodo de platina EE em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Como observado no voltamograma da Figura 7, o eletrodo de platina apresenta vários processos redox. A região de -0,2 a 0,1 V vs. Ag/Ag⁺ é correspondente aos processos de adsorção e dessorção de hidrogênio atômico sobre o eletrodo de platina devido à redução do próton em solução e à oxidação da monocamada de H_{ads} formada,¹¹⁵ como apresentado nas equações (24) e (25).

Este processo é reversível, pois as cargas envolvidas nos processos são idênticas e não foi observada variações de carga com a variação da velocidade de varredura de potenciais¹¹⁶. Estes processos de adsorção e dessorção de hidrogênio formam uma monocamada sobre os átomos de platina na superfície do eletrodo na proporção 1:1, onde cada átomo de platina acomoda um hidrogênio adsorvido.

Na região entre 0,1 a 0,5 V vs. Ag/Ag⁺ não ocorrem processos faradaicos, apenas processos de carga de dupla camada elétrica, onde os valores de corrente se aproximam de zero.

A região entre 0,5 a 1,45 V vs. Ag/Ag⁺ apresenta um pico de oxidação relativo à formação de óxidos de platina sobre a superfície do eletrodo, caracterizado pelo aumento significativo de corrente neste intervalo e descrito pela Equação (26).

Na varredura catódica observa-se a redução dos óxidos de platina em potenciais próximos a 0,5 V vs. Ag/Ag⁺ de acordo com a Equação (27).

Depois de caracterizados os processos eletrônicos presentes na superfície do eletrodo de platina foram calculados a área eletroativa através da carga dos átomos de hidrogênio adsorvidos na superfície da platina. Para a platina policristalina o valor de referência para a carga é de $210 \mu\text{C cm}^{-2}$ para uma monocamada de $\text{H}_{\text{ads}}^{115}$. Sendo assim, para calcular a área eletroativa do eletrodo foram integrados os picos da região de dessorção de hidrogênio no intervalo de -0,2 a 0,1 V vs. Ag/Ag^+ .

Sabendo-se que carga (Q_{Pt}) é igual à variação de corrente (di) vs. a variação de tempo (dt) e a variação de tempo é igual à divisão entre a variação de potencial (dE) pela velocidade de varredura (v), pode-se calcular a carga pela divisão entre a área integrada (A_{int}) dividida pela velocidade de varredura como apresentado pelas equações (28), (29), (30) e (31).

$$Q_{\text{Pt}} = di \times dt \quad (28)$$

$$dt = dE/V \quad (29)$$

$$Q_{\text{Pt}} = \frac{di \times dE}{v} \quad (30)$$

$$Q_{\text{Pt}} = A_{\text{int}} / v \quad (31)$$

Assim, o valor de carga calculado é correspondente à dessorção de hidrogênio na superfície do eletrodo. Dividindo-se a carga calculada pela carga da platina policristalina ($210 \mu\text{C cm}^{-2}$), encontra-se a área eletroativa do eletrodo como apresentado na Equação (32).

$$A_{\text{ativa}} = Q_{\text{Pt}} / Q_{\text{Pt(policristalina)}} \quad (32)$$

A razão entre a área eletroativa pela área geométrica encontra-se o fator de rugosidade (f) do eletrodo de platina como descrito na Equação (33).

$$f = A_{\text{ativa}} / A_{\text{geométrica}} \quad (33)$$

Para a platina policristalina polida até um acabamento perfeitamente espelhado, o fator de rugosidade esperado está entre 2 e 3¹¹⁷.

Os valores de carga (Q_{Pt}), área ativa (A_{ativa}) e fator de rugosidade (f) foram calculados para os três eletrodos construídos e os resultados estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização da eletroatividade dos eletrodos de platina.

Eletrodo	$A_{\text{geométrica}}$ (cm^2)	$A_{\text{int}} (\mu\text{C V s}^{-1})$	$v (\text{V s}^{-1})$	$Q_{\text{Pt}} (\mu\text{C})$	A_{ativa} (cm^2)	f
EE	0,0314	4,54	0,1	45,39	0,0744	2,37
EEP	0,071	1,93	0,5	38,6	0,184	2,59
UME	$7,85 \times 10^{-5}$	0,0575	0,5	0,115	0,00019	2,40

Depois de calculada a área eletroativa dos eletrodos foi realizada o procedimento de modificação do eletrodo de platina através da deposição das nanoestruturas de ouro, através da redução eletroquímica de Au (III) para Au (0) pela técnica de varredura linear como pode ser apresentado na Figura 8.

Como apresentado nos voltamogramas da Figura 8 o eletrodo EE apresenta três picos de redução e os eletrodos EEP e UME apresentam dois picos. O pico I é relativo à redução do óxido de platina como apresentado na Equação (27), e os picos II e III estão relacionados com a redução de Au(III) para Au(0) sobre a superfície de platina. Essa redução ocorre em duas etapas no eletrodo EE, onde o pico III é relativo à UPD de ouro sobre a platina e o pico II é relativo à deposição de ouro em *bulk*¹¹⁸. A formação de UPD sobre ouro é observado apenas no eletrodo EE devido a sua maior área eletroativa comparado com o eletrodo EEP. No eletrodo

UME não se observa este pico, provavelmente devido à pequena área superficial do eletrodo, onde não se consegue observar o pico de formação de UPD de ouro.

Figura 8 – Voltamogramas de varredura linear do eletrodo de Pt em HAuCl_4 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ + H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (A) EE a 100 mV s^{-1} ; (B) EEP a 100 mV s^{-1} e (C) UME a 25 mV s^{-1} .

A fim de investigar a melhor velocidade de deposição foi feita a deposição de ouro sobre os eletrodos de platina variando-se a velocidade de varredura de potenciais no intervalo de 10 a 150 mV s^{-1} . A Figura 9 apresenta a porcentagem de recobrimento da superfície (% θ) com nanoestruturas de ouro em função da velocidade de varredura de potenciais.

Figura 9 - Porcentagem de recobrimento da superfície com nanoestruturas de ouro em função da velocidade de varredura de potenciais em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ utilizando-se o eletrodo EE.

Como observado na Figura 9, no intervalo de 10 a 125 mV s⁻¹ a porcentagem de recobrimento de ouro varia proporcionalmente com a velocidade de varredura de potenciais. Com velocidades muito pequenas observa-se que praticamente toda superfície de platina está recoberta com ouro, assim não foram utilizadas essas velocidades, pois o objetivo é obter nanoestruturas de ouro e não um filme. Acima de 125 mV s⁻¹ observou-se que a porcentagem de deposição varia pouco com a velocidade de varredura, pois em velocidades mais altas não há tempo suficiente para a nucleação dos átomos de ouro sobre a superfície de platina.

Com isso a velocidade de deposição definida como adequada para a formação das nanoestruturas de ouro foi a de 0,1 V s⁻¹ para os eletrodos EE e EEP, pois nessa velocidade se tem uma superfície 1:1 de Pt:Au. No eletrodo UME utilizou-se a velocidade de varredura de potenciais de 25 mV s⁻¹ para garantir um recobrimento uniforme de toda a superfície do UME e não somente nas bordas do microdisco, onde a eletrodeposição ocorre de maneira preferencial, devido à geometria esférica da camada de difusão do UME.

Após a deposição das nanoestruturas de ouro a partir das velocidades de varredura de potenciais escolhidas anteriormente, foram caracterizados os

comportamentos voltamétricos dos eletrodos de Pt; Au e Pt/Au em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ como apresentado nos voltamogramas da Figura 10.

Os perfis voltamétricos dos eletrodos modificados com nanoestruturas de ouro obtidas nos diferentes eletrodos mostraram picos referentes à redução dos óxidos de ouro em 0,87 V vs. Ag/Ag⁺, pico este característico da superfície de ouro, como pode ser observado nos voltamogramas dos eletrodos convencionais de ouro.

Também foi possível perceber, na Figura 10, que os picos referentes à oxidação e redução do óxido de platina diminuíram na presença de ouro sobre a superfície do eletrodo, devido a uma menor quantidade de platina exposta. O mesmo comportamento é observado para os picos de adsorção e dessorção de hidrogênio, devido a uma menor quantidade de substrato disponível.

Figura 10 - Voltamogramas em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, utilizando-se um eletrodo de Pt (—); Au (—) e Pt/Au (—) com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

Com a diminuição do pico de dessorção de hidrogênio na platina foi calculada a porcentagem de recobrimento pela carga desta região no eletrodo de Pt e no eletrodo Pt/Au através da Equação (31). Depois de calculada as cargas dos dois eletrodos usou-se a Equação (34) para calcular a porcentagem de recobrimento de ouro sobre o eletrodo de platina.

$$\theta_{Au} = \frac{Q_{Pt/Au}}{Q_{Pt}} \times 100 \quad (34)$$

Utilizando a Equação (34) foi calculada a porcentagem de recobrimento de ouro, sendo encontrado o valor de 47 % para o eletrodo EE.

4.1.2 Caracterização Topográfica das Nanoestruturas de Ouro por Microscopia de Força Atômica

A técnica de microscopia de força atômica foi utilizada para avaliar a topografia superficial do eletrodo de platina modificado com as nanoestruturas de ouro, a fim de verificar a distribuição e morfologia das estruturas formadas¹¹⁹.

A Figura 11 apresenta as imagens do eletrodo de platina e o eletrodo Pt/Au e o tamanho médio das nanoestruturas de ouro.

Figura 11 - Imagem topográfica realizada por AFM modo contato do eletrodo de Pt e Pt/Au.

Observando as micrografias apresentadas na Figura 11 fica evidente a modificação do eletrodo de platina com nanoestruturas de ouro através dos aglomerados formados sobre a superfície do eletrodo. O eletrodo de platina apresentou rugosidade de 3,3 nm, enquanto o eletrodo Pt/Au apresentou rugosidade de 14,1 nm, demonstrando a modificação da superfície.

Com a imagem do eletrodo de Pt/Au foi construído um histograma da quantidade de partículas em função da altura, e um histograma da quantidade de partículas em função da largura como apresentado na Figura 12.

Figura 12 – Histogramas da quantidade de partículas em função da altura e largura das nanoestruturas de ouro.

Na Figura 12 é possível observar que as partículas de ouro apresentaram uma altura média de aproximadamente 58 nm, com um desvio padrão de $\pm 22,0$ nm e uma largura média de aproximadamente 216 nm, com um desvio padrão de $\pm 64,0$ nm. Com os valores de desvio padrão e média das partículas é possível calcular a polidispersividade das partículas de acordo com a Equação (35).

$$\sigma = s \times 100 / \bar{x} \quad (35)$$

Onde $\bar{x}$ é a média e s o desvio padrão. Com isso os valores de polidispersividade foram de 38% para a altura das partículas e 30 % para a largura.

Um sistema monodisperso é aquele que apresenta um grau de polidispersividade inferior ou igual a 10%, um valor bastante inferior àquele observado neste trabalho. Este fato se deve ao fato do sistema de deposição de ouro ser realizado de maneira aleatória, com o potencial de varredura englobando uma ampla faixa de potenciais sem controle de deposição. Este efeito pode ser melhorado utilizando modeladores de forma como sais quaternários de amônio, polímeros, entre outros¹²⁰.

Com estes resultados se observou que as estruturas formadas sobre o eletrodo de platina possuem um tamanho relativamente pequeno, mas um comprimento grande, dimensões estas bastante adequadas para a imobilização da glicose oxidase sobre as monocamadas auto organizadas que serão formadas sobre a superfície de ouro, como será discutida nas seções 4.2 e 4.3.

4.2 MODIFICAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS DE OURO COM MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS

A imobilização da monocamada auto organizada sobre o eletrodo de Pt/Au foi realizada utilizando-se uma solução de dihidroclorato de cistamina 1 mmol L^{-1} em álcool etílico com um tempo de imobilização de 6 horas. Para caracterizar a superfície do eletrodo com as monocamadas auto organizadas foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

4.2.1 Caracterização Eletroquímica das Nanoestruturas de Ouro Modificadas com as Monocamadas Auto Organizadas por Voltametria Cíclica

A fim de caracterizar a modificação do eletrodo de Pt/Au com as monocamadas auto organizadas foi investigado o comportamento eletroquímico através da técnica de voltametria cíclica utilizando-se uma solução de ferricianeto e ferrocianeto de potássio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para os eletrodos EE e EEP e uma solução de ferrocianeto de potássio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para o eletrodo UME. Os eletrodos utilizados para comparação foram um eletrodo de Au (—), um eletrodo de Pt (—), um eletrodo de Pt/Au (—) e um eletrodo de Pt/Au/Cys (—) como apresentado na Figura 13.

A formação das camadas auto-organizadas ocorre em algumas etapas²⁵. Primeiramente as moléculas de cistamina tendem a se adsorver sobre as estruturas de ouro de forma desorganizada, recobrando apenas certa parte da superfície de ouro, sendo realizada de maneira rápida. Após esta etapa rápida de adsorção se iniciam os processos mais lentos de interações hidrofóbicas de van der Waals entre as moléculas de cistamina adsorvidas, estabilizando as cadeias, mantendo-as com uma dada inclinação em relação à superfície²⁴, devido ao ângulo da ligação formada entre o enxofre e o ouro.

Figura 13: Voltamogramas cíclicos em ferrocianeto e ferricianeto de potássio 0,01 mol L⁻¹ em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ nos eletrodos de Au (—), eletrodo de Pt (—), eletrodo de Pt/Au (—) e eletrodo de Pt/Au/Cys (—) com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹. (A) EE; (B) EEP e (C) UME.

Assim, o par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio serviu de sonda para verificar a formação desta modificação da superfície, devido à sua resposta voltamétrica diferenciada em cada modificação da superfície de eletrodos.

A platina possui pouca afinidade com os átomos de enxofre da cistamina, com isso apenas as nanoestruturas de ouro na superfície do eletrodo de platina tendem a ser modificadas com o alcanotiol. Os voltamogramas que correspondem aos eletrodos de Pt/Au, linhas de cor preta na Figura 13, apresentaram um aumento da corrente de pico e uma diminuição do potencial de oxidação das espécies eletroativas em comparação aos eletrodos de Pt e de Au, demonstrando mais uma vez a modificação da superfície com as estruturas de ouro. Esse comportamento se

deve à presença das nanoestruturas de ouro que aumentam a área superficial do eletrodo, causando assim um aumento de corrente, além de facilitarem a transferência eletrônica proporcionando assim uma diminuição do potencial de oxidação das espécies. Quando é imobilizada a camada auto-organizada de cistamina ocorre um aumento de corrente ainda mais significativo, associado a um aumento no poder catalítico da superfície, demonstrado pelo aumento da reversibilidade da reação, ou seja, pela diminuição no valor do ΔE_p . Este comportamento se deve ao fato da camada de cistamina facilitar o processo de transferência eletrônica das espécies eletroativas, além de ter a função de proteção da superfície contra impurezas que tendem a adsorver sobre a superfície do ouro.

A Tabela 3 apresenta os valores de corrente, diferença de potencial (EE e EEP) e potencial de meia onda (UME) dos voltamogramas da Figura 13 para as diferentes modificações dos eletrodos estudados.

Tabela 3 – Valores de potencial e corrente de pico para as modificações do eletrodo de platina.

	EE		EEP		UME	
	ΔE (V)	I_{ano} (μA)	ΔE (V)	I_{ano} (mA)	$E_{1/2}$ (V)	I_{ano} (nA)
Pt	0,30	13	0,54	0,26	0,44	30
Au	0,26	15	0,52	0,25	0,41	39
Pt/Au	0,14	19	0,37	0,32	0,41	49
Pt/Au/Cys	0,06	22	0,11	0,40	0,40	59

Assim, com os diferentes valores de corrente e potencial para cada tipo de eletrodo, constatou-se que a superfície do eletrodo de platina foi primeiramente modificada com as estruturas de ouro e posteriormente com a camada auto-organizada de cistamina.

4.2.2 Caracterização Eletroquímica das Nanoestruturas de Ouro Modificadas com as Monocamadas Auto-Organizadas por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada para caracterizar a formação da monocamada auto-organizada sobre o eletrodo de Pt/Au. Utilizou-se uma solução de ferricianeto e ferrocianeto de potássio em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando-se o eletrodo EE. Aplicou-se uma onda senoidal com 10 mV de amplitude no potencial de pico observado com os experimentos de voltametria cíclica (Figura 13) em uma faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz.

Os eletrodos utilizados para comparação foram o eletrodo de Au (—), o eletrodo de Pt (—), o eletrodo de Pt/Au (—) e o eletrodo de Pt/Au/Cys (—) como apresentado na Figura 14.

Para os espectros representados na Figura 14 foram utilizados o circuito modelo de Randles $R_s (CPE[R_{ct}Z_w])$ como apresentado na Figura 15.

O efeito da modificação com os tióis na cinética de transferência eletrônica fica mais evidente ao analisar a Figura 14. A simulação dos resultados, aplicando um circuito de Randles modificado ($R_s (CPE[R_{ct}Z_w])$) com o software *Electrochemistry-ZView2*, forneceu os parâmetros apresentados na Tabela 4.

Figura 14 – Espectros de plano complexo obtidos para o eletrodo de Au (○); eletrodo de Pt (○); eletrodo Pt/Au (○) e eletrodo Pt/Au/Cys (○). Faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, onda senoidal de 10 mV aplicada no E_{pa} observado com a voltametria cíclica. As linhas ultrapassando os identificadores são os resultados de simulação com software empregando o circuito de Randles modificado.

Figura 15 - Modelo de circuito equivalente utilizado para análise dos dados obtidos com os gráficos de plano complexo obtidos com a EIE.

Onde R_s é a resistência da solução, R_{tc} é a resistência de transferência de carga, Z é a impedância de Warburg e CPE é o elemento constante de fase (representa a capacitância da dupla camada).

Tabela 4 – Dados obtidos com os espectros de plano complexo da Figura 14

Eletrodo	R_s (Ω)	CPE (μF)	R_{tc} (Ω)	α	K_{app} ($\mu cm\ s^{-1}$)
Pt	30	2,48	3985	0,95	2,1
Au	37	0,76	9568	0,96	0,89
Pt/Au	30	1,4	1974	0,94	4,3
Pt/Au/Cys	30	130	38,8	0,78	2200

Os dados da Tabela 4 mostram que os valores de resistência e capacitância variam para cada eletrodo estudado demonstrando assim a modificação do mesmo com as estruturas de ouro e a camada auto-organizada de cistamina.

O valor da resistência de transferência de carga, relacionada ao eletrodo de Pt/Au, apresentou uma diminuição em comparação àqueles dos eletrodos de Pt e de Au, demonstrando a modificação da superfície com as estruturas de ouro. Quando é inserida a camada auto-organizada de cistamina observa-se uma diminuição ainda maior da resistência de transferência de carga, comparando-se assim a modificação da superfície do eletrodo com o alcanotiol. Como descrito no item 4.2.1 este comportamento se deve ao fato da camada de cistamina facilitar ainda mais o processo de transferência eletrônica das espécies eletroativas, além de ter a função de proteção da superfície contra impurezas que tendem a adsorverem sobre os eletrodos de platina e ouro, diminuindo assim a resistência de transferência de carga do sistema, sendo condizente com os voltamogramas obtidos na Figura 13.

Como apresentado na Figura 14, a aplicação de ondas senoidais de baixa amplitude possibilitou uma boa separação de regiões de frequência onde a oxidação do par $[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$ se dá por controle cinético e por controle de transporte de massa. Sob essas condições a constante de velocidade de transferência eletrônica heterogênea aparente (k_{app}) da reação pode ser determinada pela Equação (36)¹²¹:

$$K_{app} = \frac{RT}{F^2 R_{tc} CA} \quad (36)$$

Onde F é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}), C a concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em solução ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$), R a constante física dos gases ($8,3145 \text{ J K mol}$), T a temperatura em Kelvin (298 K), A área do eletrodo ($0,0314 \text{ cm}^2$) e R_{tc} a resistência de transferência de carga obtida com a simulação dos resultados da Figura 14. Os valores de K_{app} estão apresentados na Tabela 4. De acordo com os valores de K_{app} , observa-se para o eletrodo de Pt/Au/Cys um valor 1047 vezes maior que para um eletrodo de platina e 511 vezes maior para o eletrodo de Pt/Au, demonstrando assim que a transferência eletrônica é muito mais rápida com o eletrodo modificado com a monocamada auto-organizada de cistamina.

4.3 IMOBILIZAÇÃO DA GLICOSE OXIDASE E FERROCENO SOBRE A SUPERFÍCIE DO ELETRODO BIFUNCIONAL

Após a formação das monocamadas auto-organizadas de cistamina sobre as estruturas de ouro, foi construído o biossensor, através da adição de $10 \mu\text{L}$ enzima (glicose oxidase), $5 \mu\text{L}$ de glutaraldeído 0,5% e por último $10 \mu\text{L}$ do mediador de elétrons (ferroceno) sobre a superfície do eletrodo bifuncional modificado. Para a caracterização da superfície foram utilizadas voltametria cíclica, microscopia ótica e microscopia de força atômica.

4.3.1 Caracterização Eletroquímica do Eletrodo Bifuncional Modificado com Glicose Oxidase e Ferroceno por Voltametria Cíclica

A detecção de glicose pode ser feita indiretamente a partir da determinação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado na reação da glicose com GOx. A glicose é oxidada através da enzima glicose oxidase como apresentado no esquema abaixo.

A GOx é uma enzima globular dimérica que tem o FAD como cofator¹²², como mostrado na Figura 16 abaixo. O FADH₂ presente na GOx sofre oxidação para FAD e consequentemente o oxigênio sofre uma redução para H₂O₂, podendo ser monitorado os níveis de glicose através da detecção indireta do peróxido de hidrogênio gerado, por meio de medidas amperométricas.

Figura 16 - Representação 3D da enzima glicose oxidase (GOx)

Ao se colocar o eletrodo modificado com a GOx na célula eletroquímica contendo a solução tampão e o substrato da enzima, esta entra em contato com a glicose e ocorre uma reação bioquímica, na qual é produzido o peróxido de hidrogênio. Como o H₂O₂ é uma molécula eletroativa, ele pode ser oxidado na camada de Pt do eletrodo modificado, sendo monitorado o seu sinal analítico.

Durante os experimentos foi utilizado o ferroceno (Figura 17) como mediador de elétrons já que o uso de mediadores permite o fluxo de elétrons do centro redox para a superfície do eletrodo, reduzindo o sobrepotencial e minimizando a

interferência de outras espécies contidas em solução e, conseqüentemente, aumentando a seletividade e sensibilidade do biossensor¹¹⁰.

Figura 17 – Estrutura molecular do ferroceno

Com a presença do ferroceno, o mecanismo eletrocatalítico no eletrodo modificado é definido por: uma etapa eletroquímica, referente ao processo oxidação/redução do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, uma etapa enzimática, onde a glicose é oxidada pela enzima glicose oxidase com a liberação de peróxido de hidrogênio, sendo a concentração de glicose diretamente proporcional à concentração do peróxido gerado e a etapa química, envolvendo uma reação entre o peróxido de hidrogênio e o ferroceno. O desempenho do biossensor para determinação de glicose pode ser descrito segundo as etapas representadas pelas equações (37), (38), (39) e (40):

Para a determinação do potencial de oxidação do peróxido de hidrogênio sobre o eletrodo bifuncional foram realizadas medidas de voltametria cíclica. Os

voltamogramas foram obtidos com velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$, por permitir uma boa visualização dos processos eletroquímicos.

Na Figura 18, 19 e 20 são apresentados os voltamogramas cíclicos para os eletrodos EE, EEP e UME, respectivamente, em PBS, pH = 7, com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Para comparação do melhor sistema a ser aplicado na detecção e quantificação de glicose para cada um dos eletrodos construídos foram realizados experimentos utilizando as seguintes modificações: Pt/Au/Cys/Glu/GOx; Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc e Au/Cys/Glu/GOx/Fc.

Através dos voltamogramas apresentados nas Figuras 18, 19 e 20 observa-se o aumento da corrente de pico evidenciando claramente o processo catalítico referente ao ferroceno e o peróxido de hidrogênio. Com isso foi escolhido o potencial de $0,25 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ para os eletrodos EE e UME e potencial de $0,35 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ para o eletrodo EEP para os posteriores estudos amperométricos.

A Figura 18 apresenta o estudo voltamétrico referente ao eletrodo EE como apresentado abaixo.

Figura 18 - Voltamogramas cíclicos obtidos a 100 mV s^{-1} para o eletrodo EE em solução de PBS 0,1 mol/L (pH = 7) sem glicose (—) e com adição de 20 mmol L^{-1} de glicose (---). (A) Pt/Au/Cys/Glu/GOx; (B) Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc e (C) Au/Cys/Glu/GOx/Fc.

Como observado nos voltamogramas da Figura 18 o eletrodo bifuncional com a presença do ferroceno tem uma diminuição significativa do potencial de oxidação do peróxido de hidrogênio ($0,21 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$) em comparação ao eletrodo sem a presença de ferroceno e com o eletrodo de ouro. Observa-se também um aumento da variação de corrente de pico 15 vezes para o eletrodo bifuncional sem a presença de ferroceno e um aumento de 2,2 vezes em relação ao eletrodo de ouro. Com isso observa-se que para o eletrodo bifuncional com a presença de ferroceno (Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc) tem uma diminuição de potencial de oxidação aumentando a seletividade do sistema, e o aumento de corrente significativo em relação aos outros eletrodos, demonstra uma maior sensibilidade do método, obtendo menores

limites de detecção. Através deste estudo foi escolhido o potencial de 0,25 V para as medidas amperométricas.

A Figura 19 apresenta o estudo voltamétrico referente ao eletrodo EEP como apresentado abaixo.

Figura 19 - Voltamogramas cíclicos obtidos a 100 mV s^{-1} para o eletrodo EEP em solução de PBS 0,1 mol/L (pH = 7) sem glicose (—) e com adição de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose (—). (A) Pt/Au/Cys/Glu/GOx; (B) Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc e (C) Au/Cys/Glu/GOx/Fc.

Novamente, observa-se uma diminuição significativa do potencial de oxidação do H_2O_2 (0,29V vs. Ag/Ag^+) em comparação aos demais eletrodos, como no parágrafo anterior. Observa-se também um aumento da variação da corrente de pico de 5 vezes para o eletrodo bifuncional sem a presença de ferroceno e um aumento de 1,1 vezes em relação ao eletrodo de ouro. Com este estudo foi escolhido o

potencial de 0,35 V para as medidas amperométricas. Comparado com os eletrodos EE e UME o eletrodo EEP não apresentou uma catálise satisfatória, mas devido a sua fácil construção, consumo de pouco reagente e miniaturização foi aplicado para detecção de glicose em alimentos.

A Figura 20 apresenta o estudo voltamétrico referente ao eletrodo UME.

Figura 20 - Voltamogramas cíclicos obtidos a 100 mV s^{-1} para o eletrodo UME em solução de PBS 0,1 mol/L (pH = 7) sem glicose (—) e com adição de $20 \mu\text{molL}^{-1}$ de glicose (—). (A) Pt/Au/Cys/Glu/GOx; (B) Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc e (C) Au/Cys/Glu/GOx/Fc.

De maneira similar aos demais eletrodos, o ultramicroeletrodo bifuncional com a presença do ferroceno apresentou uma diminuição do potencial de oxidação do

peróxido enzimático (0,22V vs. Ag/Ag⁺) em comparação ao eletrodo sem a presença de ferroceno. Observa-se também um aumento da variação de corrente de pico 5,4 vezes para o eletrodo bifuncional sem a presença de ferroceno e um aumento de 3,1 vezes em relação ao eletrodo de ouro. Assim, foi escolhido o potencial de 0,25 V para as medidas amperométricas.

Para uma melhor visualização dos resultados obtidos para os três eletrodos, os valores de correntes e potenciais estão coletados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de potenciais e correntes para os experimentos de voltametria cíclica.

Eletrodo	EE		EEP		UME	
	E _{oxi}	ΔI (μA)	E _{oxi}	ΔI (μA)	E _{oxi}	ΔI (nA)
Pt/Au/Cys/Glu/GOx	0,45	0,14	0,4	0,18	0,5	0,07
Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc	0,21	2,15	0,29	0,96	0,22	0,38
Au/Cys/Glu/GOx/Fc	0,5	0,97	0,44	0,87	0,2	0,12

4.3.2 Caracterização do Eletrodo Bifuncional Modificado com Glicose Oxidase e Ferroceno por Microscopia Ótica e Microscopia de Força Atômica

As medidas de microscopia ótica foram realizadas em um microscópio HIROX KH-7700 com lente OL-350II. A Figura 21 apresenta a imagem de microscopia ótica obtidos para um eletrodo de (A) Pt, (B) Pt/Au/Cys/Glu/GOx e (C) Pt/Au/Cys/Glu/Gox/Fc.

Figura 21 - Microscopia óptica realizada em um microscópio HIROX KH-7700 com lente OL-350II da superfície do eletrodo de (A) Pt, (B) Pt/Au/Cys/Glu/GOx e (C) Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc.

Como apresentado nas imagens da Figura 21, observa-se claramente a superfície do eletrodo de Pt lisa (Figura 21A), do eletrodo modificado Pt/Au/Cys/Glu/GOx (Figura 21 B) com a formação de um filme na superfície do eletrodo e a modificação deste eletrodo com o ferroceno (Figura 21C) evidenciada pela mudança de coloração promovida pela presença de ferroceno na superfície.

Por meio desta imagem ficam evidentes as regiões do eletrodo onde ocorre cada uma das etapas de reação. Na região de coloração mais clara (acinzentada) é a parte onde ocorre a oxidação da glicose promovida pela enzima GOx (Equação 37), e a região mais escura (marrom) é onde ocorre a reação eletroquímica entre o ferro do mediador de elétrons com o peróxido de hidrogênio liberado da reação enzimática (equações 38, 39 e 40).

Também foi utilizado a microscopia de força atômica para a caracterização da superfície do eletrodo utilizando-se microscópio Nanosurf EasyScan2 com modo de operação de não contato, como apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Imagem topográfica realizada por AFM no modo não contato do eletrodo de Pt/Au/Cys/Glu/GOx.

A Figura 22 evidencia a presença de pontos esféricos sobre a superfície do eletrodo referentes à interação da glicose oxidase com o glutaraldeído através da formação de ligações cruzadas entre eles⁵⁸, ficando evidente a modificação da superfície do eletrodo bifuncional com a enzima estudada. A rugosidade média encontrada para o eletrodo modificado com a enzima foi de 151 nm, sendo mais de 45 vezes maior que para o eletrodo de platina sem modificação e 10 vezes maior para o eletrodo de Pt com as estruturas de ouro, demonstrando a modificação da superfície.

4.4 CURVA ANALÍTICA E REPRODUTIBILIDADE

Após otimizar as melhores condições de trabalho para o eletrodo bifuncional modificado, realizaram-se medidas amperométricas a fim de obter a curva de

calibração dos eletrodos modificados pela adição sucessiva de glicose em 10 mL de solução PBS pH = 7. O tempo de resposta do eletrodo foi rápido, apresentando correntes estáveis em torno de 60 segundos após cada adição do analito. Para cada um dos três eletrodos estudados (EE, EEP e UME) foram feitas dez curvas analíticas a fim de obter dados como erro relativo, desvio padrão e incertezas das medidas eletroquímicas de acordo com as equações (2) a (11). A Figura 23 apresenta uma curva cronoamperométrica para o eletrodo EE.

Figura 23 - Cronoamperograma em tampão fosfato utilizando-se o eletrodo EE com potencial fixo aplicado de 0,25 V vs. Ag/Ag⁺.

A Figura 24 apresenta a curva de calibração obtida para o eletrodo EE, após adições sucessivas de glicose.

Figura 24 - Curva analítica obtida para glicose empregando-se o eletrodo bifuncional EE modificado com Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc em PBS (pH = 7) com potencial constante de 0,25 V vs. Ag/Ag⁺.

A resposta do eletrodo foi linear no intervalo de concentração de 6,0 a 36 $\mu mol/L$ com um limite de detecção de 1,1 $\mu mol/L$ e um limite de quantificação de 3,6 $\mu mol/L$, seguindo a Equação $\Delta I_{pa} (A) = 2,15 \times 10^{-7} + 0,01994 [Glicose (\mu mol/L)]$. O limite de detecção foi obtido seguindo a metodologia estatística descrita no item Materiais e Métodos.

Para o eletrodo EE os valores de erro relativo, desvio padrão e incertezas das medidas eletroquímicas estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Erros, desvio padrão e incertezas das medidas eletroquímicas para o eletrodo EE.

Concentração [Glicose] umol L ⁻¹	I (uA)	E _r	S	U(x _i)	f(x _i)	U(F)	U _y (x _i)
0	0,26	0,00375	6,6x10 ⁻⁹	2,1x10 ⁻⁹	0	0,0079	0
6	0,36	0,01093	1,9x10 ⁻⁸	6,0x10 ⁻⁹	0,002	0,0166	0,003
12	0,48	0,01529	2,6x10 ⁻⁸	8,3x10 ⁻⁹	0,004	0,0017	0,003
18	0,57	0,01586	2,7x10 ⁻⁸	8,7x10 ⁻⁹	0,006	0,0151	0,003
21	0,71	0,01266	2,2x10 ⁻⁸	6,9x10 ⁻⁹	0,007	0,0098	0,003
30	0,80	0,018	3,1x10 ⁻⁸	9,8x10 ⁻⁹	0,010	0,0122	0,003
36	0,98	0,01393	2,4x10 ⁻⁸	7,6x10 ⁻⁹	0,012	0,0078	0,003

Através dos dados da Tabela 6 encontrou-se a incerteza padrão combinada (U_{cy}), tendo um valor de $3,65 \times 10^{-11}$. Para calcular a incerteza expandida (U) foi necessário encontrar o grau de liberdade efetivo (V_{eff}) que teve o valor de 50. Para este valor de grau de liberdade efetivo foi encontrado o valor do coeficiente de abrangência (k) tabelado correspondente a este valor, sendo no valor de $2,05^{113}$. Com isso foi calculado a incerteza expandida, encontrando-se o valor de $7,5 \times 10^{-11}$.

A Figura 25 apresenta a curva analítica obtida para o eletrodo EEP, após adições sucessivas de glicose.

Figura 25 - Curva analítica obtida para glicose empregando-se o eletrodo bifuncional EEP modificado com Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc em PBS (pH = 7) com potencial constante de 0,35 V vs. Ag/Ag⁺.

A resposta do eletrodo foi linear no intervalo de concentração de 1,5 a 3,9 $\mu mol/L$ com um limite de detecção de 0,3 $\mu mol/L$ e um limite de quantificação de 1,2 $\mu mol/L$, seguindo a Equação $\Delta I_{pa} (\mu A) = 0,60735 + 0,07487 [Glicose (\mu mol/L)]$.

Para o eletrodo EEP os valores de erro relativo, desvio padrão e incertezas das medidas eletroquímicas estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Erros, desvio padrão e incertezas das medidas eletroquímicas para o eletrodo EEP.

Concentração [Glicose] $\mu\text{mol L}^{-1}$	I (μA)	E_r	S	$U(x_i)$	$f(x_i)$	$U(F)$	$U_y(x_i)$
0	0,58	$3,25 \times 10^{-8}$	$5,60 \times 10^{-8}$	$1,8 \times 10^{-8}$	0	0,027	$2,42 \times 10^{-7}$
1,5	0,70	$9,37 \times 10^{-9}$	$1,61 \times 10^{-8}$	$5,1 \times 10^{-9}$	0,0015	0,0070	$6,99 \times 10^{-8}$
4,4	0,92	$8,19 \times 10^{-9}$	$1,41 \times 10^{-8}$	$4,5 \times 10^{-9}$	0,0044	0,0049	$6,12 \times 10^{-8}$
9,9	1,35	$1,12 \times 10^{-8}$	$1,93 \times 10^{-8}$	$6,1 \times 10^{-9}$	0,001	0,0044	$8,37 \times 10^{-8}$
19	2,12	$1,48 \times 10^{-7}$	$2,56 \times 10^{-7}$	$8,1 \times 10^{-8}$	0,002	0,0336	$1,11 \times 10^{-6}$
27	2,62	$1,70 \times 10^{-7}$	$2,93 \times 10^{-7}$	$9,3 \times 10^{-8}$	0,0027	0,0331	$1,27 \times 10^{-6}$
30	2,92	$6,33 \times 10^{-8}$	$1,09 \times 10^{-7}$	$3,5 \times 10^{-8}$	0,003	0,0114	$4,73 \times 10^{-7}$
39	3,44	$5,15 \times 10^{-8}$	$8,88 \times 10^{-8}$	$2,81 \times 10^{-8}$	0,0039	0,0079	$3,85 \times 10^{-7}$

De maneira similar ao cálculo encontrou-se a incerteza padrão combinada (U_{cy}), tendo um valor de $1,81 \times 10^{-6}$ e o grau de liberdade efetivo (V_{eff}) que teve o valor de 23. Para este valor de grau de liberdade efetivo foi encontrado o valor do coeficiente de abrangência (k) tabelado correspondente a este valor, sendo no valor de $2,11^{113}$. Com isso foi calculado a incerteza expandida, encontrando-se o valor de $3,82 \times 10^{-6}$.

A Figura 26 apresenta a curva analítica obtida para o eletrodo EEP, após adições sucessivas de glicose.

Figura 26 - Curva analítica obtida para glicose empregando-se o eletrodo bifuncional UME modificado com Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc em PBS (pH = 7) com potencial constante de 0,25 V vs. Ag/Ag⁺.

A resposta do eletrodo foi linear no intervalo de concentração de 0,4 a 2,9 $\mu\text{mol/L}$ com um limite de detecção de 90 $\mu\text{mol/L}$ e um limite de quantificação de 0,3 $\mu\text{mol/L}$, seguindo a Equação $\Delta I_{pa} (A) = 5,03 \times 10^{-11} + 2,01 \times 10^{-4} [\text{Glicose} (\text{mol/L})]$.

Para o eletrodo UME os valores de erro relativo, desvio padrão e incertezas das medidas eletroquímicas estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Erros, desvio padrão e incertezas das medidas eletroquímicas para o eletrodo UME.

Concentração [Glicose] $\mu\text{mol L}^{-1}$	I (nA)	E_r	S	$U(x_i)$	$f(x_i)$	$U(F)$	$U_y(x_i)$
0	0,1122	$8,8 \times 10^{-12}$	$1,5 \times 10^{-11}$	$4,8 \times 10^{-12}$	0	0,04298	$2,4 \times 10^{-8}$
0,4	0,1618	$6,1 \times 10^{-12}$	$1,0 \times 10^{-11}$	$3,3 \times 10^{-12}$	4×10^{-4}	0,02046	$1,7 \times 10^{-8}$
0,7	0,2069	$3,3 \times 10^{-12}$	$5,7 \times 10^{-12}$	$1,8 \times 10^{-12}$	7×10^{-4}	0,00866	$9,0 \times 10^{-9}$
1,1	0,2552	$3,3 \times 10^{-12}$	$5,8 \times 10^{-12}$	$1,8 \times 10^{-12}$	0,0011	0,00715	$9,1 \times 10^{-9}$
1,9	0,4147	$8,5 \times 10^{-12}$	$1,5 \times 10^{-11}$	$4,6 \times 10^{-12}$	0,0019	0,01115	$2,3 \times 10^{-8}$
2,5	0,584	$9,8 \times 10^{-12}$	$1,7 \times 10^{-11}$	$5,3 \times 10^{-12}$	0,0025	0,00913	$2,7 \times 10^{-8}$
2,9	0,7115	$8,4 \times 10^{-12}$	$1,4 \times 10^{-11}$	$4,6 \times 10^{-12}$	0,003	0,00645	$2,3 \times 10^{-8}$

De maneira similar ao cálculo encontrou-se a incerteza padrão combinada (U_{cy}), tendo um valor de $2,6 \times 10^{-11}$ e o grau de liberdade efetivo (V_{eff}) que teve o valor de 47. Para este valor de grau de liberdade efetivo foi encontrado o valor do coeficiente de abrangência (k) tabelado correspondente a este valor, sendo no valor de $2,06^{113}$. Com isso foi calculado a incerteza expandida, encontrando-se o valor de $4,2 \times 10^{-11}$.

Através das curvas analíticas representadas nas Figuras 24, 25 e 26, e os dados das Tabelas 6, 7 e 8, pode-se observar que os eletrodos EE e EEP por serem eletrodos maiores, com áreas relativamente próximas, encontrou-se limites de detecção e quantificação muito próximos, podendo assim ser aplicáveis na detecção de glicose em amostras alimentícias de refrigerantes, chás e iogurtes. O eletrodo UME, devido a seu menor tamanho, foi possível conseguir um limite de detecção e quantificação muito menor do que comparado com os eletrodos EE e EEP, podendo ser aplicável este eletrodo na detecção de glicose em amostras clínicas de glicose em métodos não invasivos como em lágrimas, suor e saliva, sendo uma perspectiva futura para este material desenvolvido neste trabalho.

Para demonstrar os baixos limites de detecção e quantificação dos eletrodos propostos foi feita uma comparação com outros trabalhos encontrados na literatura como apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 – Limites de detecção para os eletrodos propostos e alguns trabalhos na literatura.

Eletrodo	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Pt/Au/Cys/Glu/GOx/Fc	2,4; 2,2 e 0,03
Luo <i>et al.</i> (2004)¹²³	2,5
Wan <i>et al.</i> (2010)¹²⁴	2000
Lien <i>et al.</i> (2006)¹²⁵	130

Como observado através das curvas de calibração obtidas para os três eletrodos e seus respectivos dados estatísticos pode-se observar que os eletrodos possuem um baixo erro relativo, desvio padrão e incerteza, além dos limites de detecção e quantificação, e faixa linear, podendo assim ser aplicáveis na detecção de glicose em amostras reais.

Também foi realizado um estudo de estabilidade da enzima e do eletrodo, onde foi possível observar que a enzima ficou ativa por vários meses e podendo ser aplicada em diversas análises sem a renovação da superfície.

4.5 APLICAÇÃO DOS ELETRODOS EM AMOSTRAS COMERCIAIS

A fim de avaliar a aplicabilidade dos eletrodos desenvolvidos foram determinados os teores de glicose em seis amostras comerciais. As amostras estudadas foram refrigerantes de cola, refrigerante de cola diet, refrigerante de laranja diet, chá, chá diet e iogurte. Para as amostras de refrigerante foi utilizado o eletrodo EE, sendo realizada a detecção de glicose diretamente dentro das latas dessas amostras como apresentado na Figura 27. Para a quantificação foi utilizado a técnica de adição de padrões, onde foram adicionadas alíquotas de um padrão de glicose de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em PBS. Foi retirado o gás carbônico presente nas amostras de refrigerantes através da agitação durante dez minutos.

Figura 27 – Eletrodo EE para detecção de glicose em amostras de chá e refrigerantes

Para a amostra de iogurte foi utilizado o eletrodo EEP, onde após o pré tratamento da amostra (secção 3.5.2) foi adicionado uma gota de 1000 μL sobre o eletrodo e realizada a quantificação do teor de glicose nesta amostra, como apresentado na Figura 28. Para a quantificação foi utilizado à técnica de adição de padrão, onde foram preparadas diferentes soluções a partir de um padrão de glicose de 1,0 mmol L^{-1} em PBS.

Figura 28 - Eletrodo EEP para detecção de glicose na amostras de iogurte.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10, onde foi comparado o valor detectado pelo eletrodo proposto, os valores rotulados nas embalagens e os valores encontrados através de um eletrodo comercial (glicosímetro BREEZE™2 da Bayer®).

Tabela 10 – Determinação de glicose em amostras de refrigerantes, chá e iogurtes empregando-se os sensores propostos (EE e EEP) e o eletrodo comercial.

Amostras	Detectado sensor proposto		Rotulado no frasco		Detectado com eletrodo comercial	
	g/350 mL	%	g/350 mL	%	g/350 mL	%
Refrigerante cola	20,1	5,7	18,5	5,3	25,4	7,2
Refrigerante cola diet	0,044	0,013	0	0	Aparelho não detectou	
Refrigerante de laranja diet	0,79	0,2	0,75	0,2	0,72	0,2
Chá	14,3	4,1	15	4,3	13,2	3,8
Chá diet	0,079	0,02	0	0	Aparelho não detectou	
Iogurte*	14,3	15,9	14	15,6	14,9	16,6

* Utilizou-se o eletrodo EEP e o valor rotulado no frasco é de 14 g em 90g de produto.

Como observado nos resultados apontados na Tabela 10, o eletrodo proposto foi eficiente na quantificação de glicose nas amostras estudadas, onde os valores estão próximos aos rotulados nas amostras. É notório destacar que para amostras onde as quantidades de glicose são muito pequenas (refrigerante de cola diet e chá

diet) o glicosímetro não conseguiu detectar, demonstrando assim que o eletrodo proposto consegue detectar baixas concentrações do analito estudado.

A fim de observar a reprodutibilidade do eletrodo quanto à detecção dos analitos em questão, foi realizado um estudo estatístico, calculando-se parâmetros como desvio padrão, erro relativo em relação ao rotulado no frasco, índice Z e incerteza, como apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Estudo estatístico na detecção de glicose em amostras alimentícias.

Amostras	Detectado (g em 350 mL))	S	E_r (%)	Índice Z	Incerteza
Refrigerante cola	20,1	2,8	8,6	0,57	0,88
Refrigerante cola diet	0,044	0,0074	---	5,9	0,002
Refrigerante de laranja diet	0,79	0,072	5,0	0,56	0,023
Chá	14,3	1,3	-5,0	0,54	0,4
Chá diet	0,079	0,0072	---	10,9	0,0023
logurte*	14,3	0,7	2,1	0,43	0,22

* Rotulados são 14 g em 90g de produto.

Através dos dados obtidos relatados na Tabela 11, o eletrodo apresentou um desvio padrão, erro, índice Z e incerteza aceitáveis para a técnica eletroquímica de quantificação, sendo viável a aplicação dos eletrodos desenvolvidos na quantificação de glicose.

Por fim para a validação do método foi aplicado um teste T (Equação 23) para comparar se os valores obtidos pelo eletrodo proposto são condizentes com os rotulados nas amostras. Os resultados para o eletrodo proposto e para o glicosímetro estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Resultados para o teste T para o eletrodo desenvolvido e para o eletrodo comercial.

Amostra	Resultado obtido teste t_1 (Eletrodo Proposto)	Resultado obtido teste t_1 (Glicosímetro)
Refrigerante de cola	1,81	11,0
Refrigerante laranja diet	1,76	1,50
Chá	1,70	6,00
Refrigerante de cola diet	18,78	-----
Chá diet	34,67	-----
logurte	1,35	19,1

O com o valor de t de Student para nove graus de liberdade ($n-1$) e para um limite de confiança de 95% é de 1,83 (Anexo 2). Se o valor de $|t|$ exceder o valor crítico tabelado (1,83), a hipótese nula será rejeitada, demonstrando que o resultado experimental não se encontra dentro do intervalo de confiança do método¹¹⁴, com isso todas as amostras realizadas pelo eletrodo proposto estão dentro do intervalo de confiança, exceto para as amostras de refrigerante de cola diet e chá diet, pois mesmo possuindo um pequeno teor de glicose em sua composição, seu valor é muito próximo de zero, não sendo rotulado no frasco. Em comparação com o glicosímetro, apenas para a amostra de laranja diet que o valor de $|t|$ calculado se encontra abaixo do valor de t crítico.

Através dos valores encontrados na detecção de glicose em amostras reais, observa-se que os eletrodos propostos são eficientes na quantificação do analito em comparação a outros métodos, conseguindo assim detectar até mesmo em amostras com baixas concentrações de glicose.

E como perspectiva futura espera-se utilizar o eletrodo UME para a quantificação de glicose em pessoas com diabetes, através das lágrimas, suor ou saliva, pois este eletrodo apresenta baixos limites de detecção, podendo ser aplicável para esta finalidade.

5 CONCLUSÕES

A modificação da superfície de platina em três eletrodos diferentes, com nanoestruturas de ouro, obtida por eletrodeposição, se mostrou muito eficiente para a confecção de um biossensor para glicose em alimentos. Esta modificação gerou um eletrodo bifuncional, com cerca de metade da superfície de platina policristalina lisa e metade com nanoestruturas de ouro. Sobre as ilhas de ouro foi possível depositar camadas auto-organizadas de cistamina, um alcanotiol, onde a enzima glicose oxidase foi adequadamente imobilizada. Já sobre a superfície de platina exposta se depositou ferroceno, um eficiente mediador para a oxidação do peróxido de hidrogênio, gerado na reação enzimática.

Os resultados experimentais mostram que estes eletrodos são promissores para a determinação de glicose em amostras reais de alimentos, sem qualquer necessidade de tratamento da amostra. A superfície bifuncional modificada com ferroceno mostrou um alto poder catalítico para a oxidação do peróxido de hidrogênio formado pelo cofator FAD, durante a reação enzimática. A corrente de oxidação obtida é proporcional à concentração de glicose e o eletrodo apresentou baixos limites de detecção durante as medidas amperométricas. O mecanismo de detecção de glicose segue um mecanismo em três etapas, a primeira envolvendo a oxidação da glicose através da atividade catalítica da GOx, a segunda etapa sendo a etapa eletroquímica de oxidação do mediador ferroceno na superfície do eletrodo e em sequência, a reação química na interface do eletrodo entre o ferroceno oxidado e o peróxido de hidrogênio gerado na primeira etapa.

Os eletrodos bifuncionais apresentaram um desempenho satisfatório como sensor amperométrico para determinação de glicose em amostras reais uma vez comparadas com o método comercial. Em virtude de sua sensibilidade, estabilidade, baixo potencial, simplicidade de trabalho e baixo custo de construção, o sensor construído é altamente eficiente na determinação de glicose em amostras reais.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

As modificações dos eletrodos desenvolvidos com camadas auto-organizadas serão realizadas pela imersão do eletrodo, por diferentes intervalos de tempo em uma solução contendo cistamina. Estas moléculas podem ser obtidas com diferentes terminações, conferindo à superfície, em determinados meios, cargas elétricas diferentes. Sendo assim pode ser proposta a investigação com outros alcanotiois com diferentes tamanhos e terminações.

O comportamento eletroquímico da reação enzimática será avaliado sobre o eletrodo de ouro liso, eletrodo de platina liso e sobre o eletrodo bifuncional modificado com a camada auto-organizada. Esta comparação será feita com os resultados obtidos por voltametria cíclica, na região de oxidação-redução das espécies. Espera-se observar efeitos da SAM tanto nos potenciais de pico quanto nas intensidades de correntes observadas. Assim, estas reações eletródicas poderão ser utilizadas como um indicador da formação das camadas automontadas.

Uma vez visto que o eletrodo bifuncional tem uma boa resposta para um sistema enzimático pode ser proposta a utilização na detecção de outros analitos de interesse utilizando outras enzimas como acetilcolinesterase (pesticidas), peroxidase (peróxido de hidrogênio), lacase (compostos fenólicos), entre outros sistemas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CARUTHERS, S. D.; WICKLINE, S.A.; LANZA, G.M. Nanotechnological applications in medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 26-30, 2007.
- [2] RANGASAMY, M. Nano technology: a review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 2, p. 8-16, 2011.
- [3] VAFAFARD, A.; GOHARSHENASAN, S.; NOZARI, N.; MORTEZAPOUR, A.; MAHMOUDI, M. Phase-dependent optical bistability in the quantum dot nanostructure molecules via inter-dot tunneling. **Journal of Luminescence**, v. 134, p. 900-05, 2013.
- [4] HRISTOZOV, D.; MALSCH, I. Hazards and risks of engineered nanoparticles for the environment and human health. **Sustainability**, v. 1, n. 4, p. 1161-94, 2009.
- [5] SUSLICK, K. S.; FANG, M.; HYEON, T. Sonochemical synthesis of iron colloids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 47, p. 11960-61, 1996.
- [6] WANG, W. N.; LENGGORO, I.W.; TERASHI, Y.; KIM, T.O.; OKUYAMA, K. One-step synthesis of titanium oxide nanoparticles by spray pyrolysis of organic precursors. **Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology**, v. 123, n. 3, p. 194-202, 2005.
- [7] LIU, F. K.; HUANG, P.W.; CHANG, Y.C.; KO, F.H.; CHU, T.C. Microwave-assisted synthesis of silver nanorods. **Journal of Materials Research**, v. 19, n. 2, p. 469-73, 2004.
- [8] BHAINSA, K. C.; D'SOUZA, S.F. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus aspergillus fumigatus. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 47, n. 2, p. 160-64, 2006.

- [9] OMER, M.; HAIDER, S.; PARK, S.Y. A novel route for the preparation of thermally sensitive core-shell magnetic nanoparticles. **Polymer**, v. 52, n. 1, p. 91-97, 2011.
- [10] JANG, H. D. Experimental study of synthesis of silica nanoparticles by a bench-scale diffusion flame reactor. **Powder Technology**, v. 119, n. 2-3, p. 102-08, 2001.
- [11] JIU, J.; ISODA, S.; ADACHI, M.; WANG, F. Preparation of Tio 2 nanocrystalline with 3-5 nm and application for dye-sensitized solar cell. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 189, n. 2-3, p. 314-21, 2007.
- [12] FENG, S.; YANG, J.; LIU, M.; ZHU, H.; ZHANG, J.; LI, G.; PENG, J.; LIU, Q. Cds quantum dots sensitized tio 2 nanorod-array-film photoelectrode on fto substrate by electrochemical atomic layer epitaxy method. **Electrochimica Acta**, v. 83, p. 321-26, 2012.
- [13] YAKUPHANOGLU, F.; CAGLAR, Y.; CAGLAR, M.; ILICAN, S. Zno/P-Si heterojunction photodiode by solgel deposition of nanostructure n-zno film on p-si substrate. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 13, n. 3, p. 137-40, 2010.
- [14] SÁNCHEZ, E.; BANNIER, E.; VICENT, M.; MORENO, A.; SALVADOR, M.D.; BONACHE, V.; KLYATSKINA, E.; BOCCACCINI, A.R. Characterization of nanostructured ceramic and cermet coatings deposited by plasma spraying. **International Journal of Applied Ceramic Technology**, v. 8, n. 5, p. 1136-46, 2011.
- [15] CASTRO, N.; UMANZOR-ALVAREZ, J.; ZHANG, L.G.; KEIDAR, M. Nanobiotechnology and nanostructured therapeutic delivery systems. **Recent Patents on Biomedical Engineering**, v. 5, n. 1, p. 29-40, 2012.
- [16] KOMATSU, K.; MURATA, M.; MURATA, Y. Encapsulation of molecular hydrogen in fullerene c60 by organic synthesis. **Science**, v. 307, n. 5707, p. 238-40, 2005.

- [17] MEDINTZ, I. L.; UYEDA, H.T.; GOLDMAN, E.R.; MATTOUSSI, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. **Nature Materials**, v. 4, n. 6, p. 435-46, 2005.
- [18] GATTI, A. M.; MONTANARI, S. Nanopollution: The invisible fog of future wars. **Futurist**, v. 42, n. 3, p. 32-34, 2008.
- [19] MACIEL, A. P.; LONGO, E.; LEITE, E.R. Dióxido de estanho nanoestruturado: síntese e crescimento de nanocristais e nanofitas. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 855-62, 2003.
- [20] PINKHASOVA, P.; PUCCIO, B.; CHOU, T.; SUKHISHVILI, S.; DU, H. Noble metal nanostructure both as a sers nanotag and an analyte probe. **Chemical Communications**, v. 48, n. 78, p. 9750-52, 2012.
- [21] ITOH, N.; AKETA, M.; SATO, T.; KAMIMURA, H.; TAKAGIT, D.F. Regeneration of anti-oxidant in lubrication oil on bifunctional palladium membrane electrode. **Journal of the Japan Petroleum Institute**, v. 55, n. 3, p. 215-18, 2012.
- [22] QU, X.; TIAN, M.; CHEN, S.; LIAO, B.; CHEN, A. Determination of chemical oxygen demand based on novel photoelectro-bifunctional electrodes. **Electroanalysis**, v. 23, n. 5, p. 1267-75, 2011.
- [23] BASKAR, S.; CHANG, J.L.; ZEN, J.M. Simultaneous detection of nadh and h₂ 2 using flow injection analysis based on a bifunctional poly(thionine)-modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 33, n. 1, p. 95-99, 2012.
- [24] SINGH, P.; HOSSAIN, M.; DALAL, B.; GURUPATHAM, S.K.; FISCHER, I.S. Thin films with self-assembled monolayers embedded on their surfaces. **Mechanics Research Communications**, v. 45, p. 54-57, 2012.
- [25] SMITH, R.K.; LEWIS, P.A.; WEISS, P.S. Patterning self-assembled monolayers. **Progress in Surface Science**, v. 75, p. 1-68, 2004.

- [26] DUWEZ, A.S. Exploiting electron spectroscopies to probe the structure and organization of self-assembled monolayers: a review. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 134, n. 2–3, p. 97-138, 2004.
- [27] VERCELLI, B.; ZOTTI, G.; BERLIN, A.; GRIMOLDI, S. Polypyrrole self-assembled monolayers and electrostatically assembled multilayers on gold and platinum electrodes for molecular junctions. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 16, p. 3754-63, 2006.
- [28] WANG, H.; XI, Y.Y.; ZHOU, J.Z.; LIN, Z.H. Electrochemical synthesis of cds nanocrystals on a gold electrode modified with a p-aminothiophenol self-assembled monolayer. **Chinese Source**, v. 28, n. 6, p. 1398-404, 2012.
- [29] CHEN, H. Y.; WU, I.W.; CHEN, C.T.; LIU, S.W.; WU, C.I. Self-assembled monolayer modification of silver source-drain electrodes for high-performance pentacene organic field-effect transistors. **Organic Electronics: Physics, Materials, Applications**, v. 13, n. 4, p. 593-98, 2012.
- [30] LIU, X.; MA, H.; MIAO, S.; ZHOU, M. Self-assembled monolayers of stearic imidazoline on copper electrodes detected using electrochemical measurements, xps, molecular simulation and FTIR. **Chinese Science Bulletin**, v. 54, n. 3, p. 374-81, 2009.
- [31] WANG, S. Y.; HUANG, D.C.; TAO, Y.T. Self-assembled azobenzenethiol monolayer on electrode surfaces: effect of photo-switching on the surface and electrical property. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 59, n. 1, p. 9-17, 2012.
- [32] YANG, C.; LIANG, C.; ZHANG, X. Self-assembled monolayers prepared on silver surface in aqueous micellar solution. **Xiyou Jinshu Cailiao Yu Gongcheng/Rare Metal Materials and Engineering**, v. 39, n. 9, p. 1676-81, 2010.

[33] MAOZ, R.; SAGIV, J. On the formation and structure of self-assembling monolayers. i. a comparative atr-wettability study of langmuir-blodgett and adsorbed films on flat substrates and glass microbeads. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 100, n. 2, p. 465-96, 1984.

[34] TRABELSI, S.; ZHANG, S.; ZHANG, Z.; LEE, T.R.; SCHWARTZ, D.K. Semi-fluorinated phosphonic acids form stable nanoscale clusters in langmuir-blodgett and self-assembled monolayers. **Soft Matter**, v. 5, n. 4, p. 750-58, 2009.

[35] JADHAV, S. A. Functional self-assembled monolayers (sams) of organic compounds on gold nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 13, p. 5894-99, 2012.

[36] TSAI, T. C.; GUO, C.X.; HAN, H.Z.; LI, Y.T.; HUANG, Y.Z.; LI, C.M.; CHEN, J.J.J. Microelectrodes with gold nanoparticles and self-assembled monolayers for in vivo recording of striatal dopamine. **Analyst**, v. 137, n. 12, p. 2813-20, 2012.

[37] DOUBOVA, L. M.; FABRIZIO, M.; DAOLIO, S.; FORLINI, A.; RONDININI, S.; VERTOVA, A. Electron transfer across the interface gold/self-assembled organic monolayer. comparison of single- and two-component systems. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 48, n. 4, p. 351-63, 2012.

[38] GOODING, J. J.; MEARNS, F.; YANG, W.; LIU, J. Self-assembled monolayers into the 21st century: recent advances and applications. **Electroanalysis**, v. 15, n. 2, p. 81-96, 2003.

[39] CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 1-2, p. 1-12, 2002.

[40] PRASHAR, D. Self-assembled monolayers -a review. **International Journal of ChemTech Research**, v. 4, n. 1, p.258-65, 2012.

[41] MOTAGHEDIFARD, M.; GHOREISHI, S.M.; BEHPOUR, M.; MOGHADAM, Z.; SALAVATI-NIASARI, M. Electrochemical study of new self-assembled monolayer of 2-hydroxy-n¹1-[(e)-1-(3-methyl-2-thienyl) methylidene] benzohydrazide on gold electrode as an epinephrine sensor element. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 682, p. 14-22, 2012.

[42] ARDUINI, F.; GUIDONE, S.; AMINE, A.; PALLESCHI, G.; MOSCONE, D. Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 179, p. 201-08, 2013.

[43] SUN, K.; JIANG, B.; JIANG, X. Electrochemical desorption of self-assembled monolayers and its applications in surface chemistry and cell biology. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 656, n. 1-2, p. 223-30, 2011.

[44] JOHN JEEVAGAN, A.; JOHN, S.A. Electrochemical sensor for guanine using a self-assembled monolayer of 1,8,15,22-tetraaminophthalocyanatonickel(ii) on glassy carbon electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 424, n. 1, p. 21-26, 2012.

[45] SIVANESAN, A.; JOHN, S.A. Highly sensitive electrochemical sensor for nitric oxide using the self-assembled monolayer of 1,8,15,22-tetraaminophthalocyanatocobalt(ii) on glassy carbon electrode. **Electroanalysis**, v. 22, n. 6, p. 639-44, 2010.

[46] LOAIZA, O. A.; CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; PINGARRÓN, J.M. DNA sensor based on an escherichia coli lac z gene probe immobilization at self-assembled monolayers-modified gold electrodes. **Talanta**, v. 73, n. 5, p. 838-44, 2007.

[47] WANG, H.; OHNUKI, H.; ENDO, H.; IZUMI, M. Effects of self-assembled monolayers on amperometric glucose biosensors based on an organic-inorganic hybrid system. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 168, p. 249-55, 2012.

[48] PARK, J. Y.; LEE, Y.S.; CHANG, B.Y.; KIM, B.H.; JEON, S.; PARK, S.M. Label-free impedimetric sensor for a ribonucleic acid oligomer specific to hepatitis c virus at a self-assembled monolayer-covered electrode. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 19, p. 8342-48, 2010.

[49] WANICHACHEVA, N.; SOTO, E.R.; LAMBERT, C.R.; MCGIMPSEY, W.G. Surface-based lithium ion sensor: an electrode derivatized with a self-assembled monolayer. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 20, p. 7132-37, 2006.

[50] CEGŁOWSKI, M.; NARKIEWICZ, U.; PEŁECH, I.; SCHROEDER, G. Functionalization of gold-coated carbon nanotubes with self-assembled monolayers of thiolates. **Journal of Materials Science**, v. 47, n. 7, p. 3463-67, 2012.

[51] CANCINO, J.; RAZZINO, C.A.; ZUCOLOTTO, V.; MACHADO, S.A.S. The use of mixed self-assembled monolayers as a strategy to improve the efficiency of carbamate detection in environmental monitoring. **Electrochimica Acta**, v. 87, p. 717-23, 2013.

[52] MATHARU, Z.; SOLANKI, P.R.; GUPTA, V.; MALHOTRA, B.D. Mediator free cholesterol biosensor based on self-assembled monolayer platform. **Analyst**, v. 137, n. 3, p. 747-53, 2012.

[53] BEHPOUR, M.; MOHAMMADI, N. Investigation of inhibition properties of aromatic thiol self-assembled monolayer for corrosion protection. **Corrosion Science**, v. 65, p. 331-39, 2012.

[54] ROODENKO, K.; SEITZ, O.; GOGTE, Y.; VEYAN, J.F.; YAN, X.M.; HABAL, Y.J. Modification of the adhesive properties of xef 2-etched aluminum surfaces by deposition of organic self-assembled monolayers. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 51, p. 22566-72, 2010.

[55] SPIER, C. R.; VADAS, G.G.; KAATTARI, S.L.; UNGER, M.A. Near real-time, on-site, quantitative analysis of pahs in the aqueous environment using an antibody-based biosensor. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 1557-63, 2011.

[56] CHEN, X. Q.; HE, M.; CAI, Q.; ZHU, S.K.; SHI, H.C. Detecting organophosphorus pesticide in water environment using an enzyme biosensor. **Environmental Science**, v.27, n. 8, p. 1627-30, 2006.

[57] COSNIER, S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. a review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 14, n. 5, p. 443-56, 1999.

[58] FREIRE, R. S.; PESSOA, C.A.; KUBOTA, L.T. Self-assembled monolayers applications for the development of electrochemical sensors. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-89, 2003.

[59] ASAV, E.; AKYILMAZ, E. Preparation and optimization of a bienzymic biosensor based on self-assembled monolayer modified gold electrode for alcohol and glucose detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 5, p. 1014-18, 2010.

[60] CARELLI, D.; CENTONZE, D.; DE GIGLIO, A.; QUINTO, M.; ZAMBONIN, P.G. An interference-free first generation alcohol biosensor based on a gold electrode modified by an overoxidised non-conducting polypyrrole film. **Analytica Chimica Acta**, v. 565, n. 1, p. 27-35, 2006.

[61] MAYORGA MARTINEZ, C. C.; TREO, E.F.; MADRID, R.E.; FELICE, C.C. Real-time measurement of glucose using chrono-impedance technique on a second generation biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 29, n. 1, p. 200-03, 2011.

[62] WANG, J. Electrochemical glucose biosensors. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 2, p. 814-25, 2008.

[63] REN, X.; YANG, L.; TANG, F.; YAN, C.; REN, J. Enzyme biosensor based on nad-sensitive quantum dots. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 1, p. 271-74, 2010.

[64] FANG, Z. H.; LU, L.M.; ZHANG, X.B.; LI, H.B.; YANG, B.; SHEN, G.L.; YU, R.Q. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized in carbon nanotubes/ sba-15 film. **Electroanalysis**, v. 23, n. 10, p. 2415-20, 2011.

[65] MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY, R.W. Chemically modified tin oxide electrode. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 1882-86, 1975.

[66] KEAWKIM, K.; CHUANUWATANAKUL, S.; CHAILAPAKUL, O.; MOTOMIZU, S. Determination of lead and cadmium in rice samples by sequential injection/anodic stripping voltammetry using a bismuth film/crown ether/naion modified screen-printed carbon electrode. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 14-21, 2013.

[67] SALAJ-KOSLA, U.; PÖLLER, S.; SCHUHMANN, W.; SHLEEV, S.; MAGNER, E. Direct electron transfer of trametes hirsuta laccase adsorbed at unmodified nanoporous gold electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 91, p. 15-20, 2013.

[68] FALCIOLA, L.; PIFFERI, V.; MASCHERONI, E. Platinum-based and carbon-based screen printed electrodes for the determination of benzidine by differential pulse voltammetry. **Electroanalysis**, v. 24, n. 4, p. 767-75, 2012.

[69] MARTINIANO, L.C.; ABRANTES, V.R.; NETO, S.Y.; MARQUES, E.P.; FONSECA, T.C.O.; PAIM, L.L.; SOUZA, A.G. Direct simultaneous determination of pb(ii) and cu(ii) in biodiesel by anodic stripping voltammetry at a mercury-film electrode using microemulsions. **Fuel**, v. 103, p. 1164-67, 2013.

[70] SALIMI, A.; HALLAJ, R. Cobalt oxide nanostructure-modified glassy carbon electrode as a highly sensitive flow injection amperometric sensor for the picomolar detection of insulin. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 16, n. 3, p. 1239-46, 2012.

- [71] EL-NASHAR, R.; ABDEL GHANI, N.; HASSAN, S.F. Construction and performance characteristics of new ion selective electrodes based on carbon nanotubes for determination of meclofenoxate hydrochloride. **Analytica Chimica Acta**, v. 730, p. 99-111, 2012.
- [72] DADAMOS, T. R. L.; TEIXEIRA, M.F.S. Electrochemical sensor for sulfite determination based on a nanostructured copper-salen film modified electrode. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 19, p. 4552-58, 2009.
- [73] LIN, X.; NI, Y.; KOKOT, S. Voltammetric analysis with the use of a novel electro-polymerised graphene-nafion film modified glassy carbon electrode: simultaneous analysis of noxious nitroaniline isomers. **Journal of Hazardous Materials**, v. 243, p. 232-41, 2012.
- [74] ISPAS, C. R.; CRIVAT, G.; ANDREESCU, S. Review: recent developments in enzyme-based biosensors for biomedical analysis. **Analytical Letters**, v. 45, n. 2-3, p. 168-86, 2012.
- [75] PRAKASH, S.; PINTI, M.; BHUSHAN, B. Review article: theory, fabrication and applications of microfluidic and nanofluidic biosensors. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 370, n. 1967, p. 2269-303, 2012.
- [76] PUNDIR, C. S.; CHAUHAN, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: a review. **Analytical Biochemistry**, v. 429, n. 1, p. 19-31, 2012.
- [77] ZENG, X.; SHEN, Z.; MERNAUGH, R. Recombinant antibodies and their use in biosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 10, p. 3027-38, 2012.

[78] ZHANG, X.; XU, Y.; ZHAO, Y.; SONG, W. A new photoelectrochemical biosensors based on dna conformational changes and isothermal circular strand-displacement polymerization reaction. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, n. 1, p. 338-41, 2013.

[79] NIKOLELI, G. P.; ISRAR, M.Q.; TZAMTZIS, N.; NIKOLELIS, N.P.; WILLANDER, M.; PSAROUDAKIS, N. Structural characterization of graphene nanosheets for miniaturization of potentiometric urea lipid film based biosensors. **Electroanalysis**, v. 24, n. 6, p. 1285-95, 2012.

[80] GOSSELIN, E.; DENIS, O.; VAN CAUWENBERGE, A. ;CONTI, J.; VANDEN EYNDE, J.J.; HUYGEN, K.; DE CONINCK, J. Quantification of the trichothecene verrucarín-a in environmental samples using an antibody-based spectroscopic biosensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 166-167, p. 549-55, 2012.

[81] EL ICHI, S.; LIMAM, F.; MARZOUKI, M.N. Garlic peroxidase immobilized into chitosan matrix suitable for biosensors applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 5, p. 1662-67, 2009.

[82] CAMPÀS, M., B. PRIETO-SIMÓN, AND J. L. MARTY. A review of the use of genetically engineered enzymes in electrochemical biosensors. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 1, p. 3-9, 2009.

[83] LIU, J.; NIU, J.; YIN, L.; JIANG, F. In situ encapsulation of laccase in nanofibers by electrospinning for development of enzyme biosensors for chlorophenol monitoring. **Analyst**, v. 136, n. 22, p. 4802-08, 2011.

[84] ZHU, Z.; GARCIA-GANCEDO, L.; FLEWITT, A.J.; XIE, H.; MOUSSY, F.; MILNE, W.I. A critical review of glucose biosensors based on carbon nanomaterials: carbon nanotubes and graphene. **Sensors**, v. 12, n. 5, p. 5996-6022, 2012.

[85] CHAWLA, S.; RAWAL, R.; PUNDIR, C.S. Fabrication of polyphenol biosensor based on laccase immobilized on copper nanoparticles/chitosan/multiwalled carbon nanotubes/polyaniline-modified gold electrode. **Journal of Biotechnology**, v. 156, n. 1, p. 39-45, 2011.

[86] YALÇINER, F.; ÇEVİK, E.; ŞENEL, M.; BAYKAL, A. Development of an amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase onto nickel ferrite nanoparticle-chitosan composite. **Nano-Micro Letters**, v. 3, n. 2, p. 91-98, 2011.

[87] TERRY, L. A.; WHITE, S.F.; TIGWELL, L.J. The application of biosensors to fresh produce and the wider food industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1309-16, 2005.

[88] ABU-RMILEH, A.; GARCIA-GABIN, W. Wiener sliding-mode control for artificial pancreas: a new nonlinear approach to glucose regulation. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 107, n. 2, p. 327-40, 2012.

[89] JANEGITZ, B. C.; PAULIUKAITE, R.; GHICA, M.E.; BRETT, C.M.A.; FATIBELLO-FILHO, O. Direct electron transfer of glucose oxidase at glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 158, n. 1, p. 411-17, 2011.

[90] CHUNG, S. Y.; HAN, S.H.; LEE, S.W.; RHEE, C. Effect of maillard reaction products prepared from glucose-glycine model systems on starch digestibility. **Starch**, v. 64, n. 8, p. 657-64, 2012.

[91] ONO, M.; NAKAJIMA, T.; ITOH, Y.; SHIMADA, K.; YAMATO, S. Specific determination of myo-inositol in multivitamin pharmaceutical preparations by a flow injection system using a myo-inositol dehydrogenase reactor coupled with a glucose eliminating enzyme reactor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 5, p. 1175-80, 2003.

[92] LO COCO, F.; FILIPPI, F.M.; MONTALDO, D.; LANUZZA, F. Determination of glucose, fructose, sucrose, and lactose in chocolate based matrices using hpic with pulsed amperometric detection. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 29, n. 18, p. 2733-39, 2006.

[93] SU, Y.; HUANG, W.; HU, R.; DING, H.; HU, K. Development of a novel, sensitive amperometric-fia glucose biosensor by packing up the amperometric cell with glucose oxidase modified anion exchange resin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 8, p. 2665-70, 2009.

[94] RESHETILOV, A. N.; IL'YASOV, P.V.; DONOVA, M.V.; DOVBNYA, D.V.; BORONIN, A.M. Measurement of glucose concentrations in human blood sera with a bacterial biosensor. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 120, n. 2, p. 861-64, 1995.

[95] BACA, J. T.; TAORMINA, C.R.; FEINGOLD, E.; FINEGOLD, D.N.; GRABOWSKI, J.J.; ASHER, S.A. Mass spectral determination of fasting tear glucose concentrations in nondiabetic volunteers. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 1370-72, 2007.

[96] VASHIST, S.K. Non-invasive glucose monitoring technology in diabetes management: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 750, p. 16-27, 2012.

[97] MELIKYAN, H.; DANIELYAN, E.; KIM, S.; KIM, J.; BABAJANYAN, A.; LEE, J.; FRIEDMAN, B.; LEE, K. Non-invasive in vitro sensing of d-glucose in pig blood. **Medical Engineering & Physics**, v. 34, n. 3, p. 299-304, 2012.

[98] WASSUM, K. M.; TOLOSA, V.M.; WANG, J.; WALKER, E.; MONBOUQUETTE, H.G.; MAIDMENT, N.T. Silicon wafer-based platinum microelectrode array biosensor for near real-time measurement of glutamate in vivo. **Sensors**, v. 8, n. 8, p. 5023-36, 2008.

[99] ROBINSON, R. S.; MCCREERY, R.L. Absorption spectroelectrochemistry with microelectrodes. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 997-1001, 1981.

[100] CORREIA, A.N.; MASCARO, L.H.; MACHADO, S.A.S; MAZO, L.H.; AVACA, L.A. Ultramicroeletrodos. parte i: revisão teóricas e perspectivas. **Química Nova**, v.18, n. 5, 1995.

[101] ANANDHAKUMAR, S.; MATHIYARASU, J.; PHANI, K.L.N. In situ bismuth film modified carbon fiber microelectrode for nanomolar detection of cadmium and lead. **Indian Journal of Chemistry - Section A Inorganic, Physical, Theoretical and Analytical Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 699-703, 2012.

[102] VASYLIEVA, N.; BARNYCH, B.; MEILLER, A.; MAUCLER, C.; POLLEGIONI, L.; LIN, J.; BARBIER, D.; MARINESCO, S. Covalent enzyme immobilization by poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (pegde) for microelectrode biosensor preparation. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 10, p. 3993-4000, 2011.

[103] GUSTAVSSON, J.; GINEBRA, M.P.; PLANELL, J.; ENGEL, E. Electrochemical microelectrodes for improved spatial and temporal characterization of aqueous environments around calcium phosphate cements. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 386-93, 2012.

[104] STEFAN-VAN, STADEN, R. I.; BALASOIU, S.C.; VAN STADEN, J.F.; RADU, G.L. Microelectrodes based on porphyrins for the determination of ascorbic acid in pharmaceutical samples and beverages. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 16, n. 7-8, p. 809-16, 2012.

[105] TUAN, C.; TUAN, M.A.; HIEU, N.V.; TRUNG, T. Electrochemical synthesis of polyaniline nanowires on pt interdigitated microelectrode for room temperature nh₃ gas sensor application. **Current Applied Physics**, v. 12, n. 4, p. 1011-16, 2012.

[106] ZHANG, C.; HU, J.; NAGATSU, M.; SHU, X.; TOYODA, H.; FANG, S.; MENG, Y. Magnetron sputtering of platinum nanoparticles onto vertically aligned carbon nanofibers for electrocatalytic oxidation of methanol. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 17, p. 6033-40, 2011.

- [107] DE ANDRADE, C.E.; DE SOUZA, F.C.; FERNANDES, D.R.; MACHADO, S.A.S.; D'ELIA, E. Use of hg-electroplated-pt ultramicroelectrode for determining elemental sulphur in naphtha samples. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2012.
- [108] UMEDA, M.; MARUTA, T.; INOUE, M.; NAKAZAWA, A. Cathode platinum degradation in membrane electrode assembly studied using a solid-state electrochemical cell. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 46, p. 18098-103, 2008.
- [109] CHEN, D.; TAO, Q.; LIAO, L.W.; LIU, S.X.; CHEN, Y.X.; YE, S. Determining the active surface area for various platinum electrodes. **Electrocatalysis**, v. 2, n. 3, p. 207-19, 2011.
- [110] SATO, N.; OKUMA, H. Development of single-wall carbon nanotubes modified screen-printed electrode using a ferrocene-modified cationic surfactant for amperometric glucose biosensor applications. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 129, n. 1, p. 188-94, 2008.
- [111] CONZUELO, F.; GAMELLA, M.; CAMPUZANO, S.; RUIZ, M.A.; REVIEJO, A.J.; PINGARRÓN, J.M. An integrated amperometric biosensor for the determination of lactose in milk and dairy products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7141-48, 2010.
- [112] MILLER, J.N.; MILLER, J.C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. Dorset: Pearson Education 2005. 263 p.
- [113] GOMES-JÚNIOR, Alcides. **Determinação de selênio em água subterrânea utilizando a espectroscopia de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafita (GFAAS) e geração de hidretos (HGAAS)**. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em ciências na area de tecnologia nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

[114] ENSAFI, A.A.; ALLAFCHIAN, A.R.; REZAEI, B. Multiwall carbon nanotubes decorated with FeCr_2O_4 , a new selective electrochemical sensor for amoxicillin determination. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 11, p. 2-11, 2012.

[115] ANGERSTEIN-KOZLOWSKA, H.; CONWAY, B. E; SHARP, W.B.A. The real condition of electrochemically oxidized platinum surfaces. part i. resolution of component processes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 9-36, 1973.

[116] DOS SANTOS, V. P.; TREMILIOSI FILLIO, G. The correlation between the atomic surface structure and the reversible adsorption-desorption of hydrogen on single crystal pt (111), pt (100) and pt (110) electrodes. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 856-63, 2001.

[117] MITSUSHIMA, S.; TAKAHASHI, T.; ARIFFIN, A.; MATSUZAWA, K.; ISHIHARA, A.; OTA, K.I. Efficiency of CO_2 generation during the electrooxidation of ethanol on platinum with various roughness factors. **ECS Transactions**, v.16, n.2, p.1253-1261, 2008.

[118] DEL BARRIO, M. C.; GARCÍA, S.G.; SALINAS, D.R. Alloy formation in the system $\text{Au}(111)/\text{Cd}$ during the upd process. **Electrochemistry Communications**, v. 6, n. 8, p. 762-66, 2004.

[119] SOROKINA, K. L.; TOLSTIKHINA, A.L. Atomic force microscopy modified for studying electric properties of thin films and crystals. review. **Crystallography Reports**, v. 49, n. 3, p. 476-99, 2004.

[120] MUENCH, F.; LAUTERBACH, S.; KLEEBE, H.J.; ENSINGER, W. Deposition of nanofilms inside a polymer template: formation of metal nanotubes. **Journal of Surface Science and Nanotechnology**, v. 10, p. 578-84, 2012.

[121] SABATANI, E.; RUBINSTEIN, I.; MAOZ, R.; SAGIV, J. Organized self-assembling monolayers on electrodes. Part I. Octadecyl derivatives on gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 219, p. 365-371, 1987.

[122] WILSON, R.T. Glucose oxidase: an ideal enzyme. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 7, n. 3, p. 165-185, 1992.

[123] LUO, X. L., XU, J. J., DU, Y., CHEN H. Y. A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. **Analytical Biochemistry**, v. 334, n. 2, p. 284-89, 2004.

[124] WAN, D., YUAN, S., LI, G.L., NEOH, K.G., KANG, E. T. Glucose biosensor from covalent immobilization of chitosan-coupled carbon nanotubes on polyaniline-modified gold electrode. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 2, n. 11, p. 3083-91, 2010.

[125] LIEN, P., TUNG, T., HO, K. Amperometric glucose biosensor based on entrapment of glucose oxidase in a poly(3,4-ethylenedioxythiophene) film, **Electroanalysis**, v. 18, n. 13, p. 1408–1415, 2006.

Anexo 1 – Coeficiente de Abrangência (Veff)

ueff	t95(u)	ueff	t95(u)	ueff	t95(u)
1	13,97	10	2,28	35	2,07
2	4,53	12	2,23	40	2,06
3	3,31	14	2,20	45	2,06
4	2,87	16	2,17	50	2,05
5	2,65	18	2,15	60	2,04
6	2,52	20	2,13	80	2,03
7	2,43	25	2,11	100	2,02
8	2,37	30	2,09	>100	2,00

Anexo 2 – t de Student

g.l.	P _s						
	0,200	0,150	0,100	0,050	0,025	0,010	0,005
1	1,376	1,963	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66
2	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925
3	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841
4	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604
5	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032
6	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707
7	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499
8	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355
9	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250
10	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169
11	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106
12	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055
13	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012
14	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977
15	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947
16	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921
17	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898
18	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878
19	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861
20	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845
21	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831
22	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819
23	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807
24	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797
25	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787
26	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779
27	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771
28	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763
29	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756
30	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750
35	0,852	1,052	1,306	1,690	2,030	2,438	2,724
40	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704
50	0,849	1,047	1,299	1,676	2,009	2,403	2,678
60	0,848	1,045	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660
80	0,846	1,043	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639
100	0,845	1,042	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626
1	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,327	2,576