



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Tháisa Aparecida Baldo

Desenvolvimento de um eletrodo modificado com monocamadas auto-
organizadas e sua utilização como biossensor

São José do Rio Preto
2014

Tháísa Aparecida Baldo

Desenvolvimento de um eletrodo modificado com monocamadas auto-organizadas e sua utilização como biossensor

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração - Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira.

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino.

São José do Rio Preto
2014

Baldo, Thaísa Aparecida.

Desenvolvimento de um eletrodo modificado com monocamadas auto-organizadas e sua utilização como biossensor / Thaísa Aparecida Baldo. -- São José do Rio Preto, 2014
96 f. : il.

Orientador: Marcos Fernando de Souza Teixeira

Coorientador: Carlos José Leopoldo Constantino

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Química analítica. 2. Eletroquímica - Análise. 3. Biossensores. 4. Glicose. I. Teixeira, Marcos Fernando de Souza. II. Constantino, Carlos José Leopoldo. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 543.55

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Tháisa Aparecida Baldo

Desenvolvimento de um eletrodo modificado com monocamadas auto-organizadas e sua utilização como biossensor

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração - Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora


Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira
UNESP – Presidente Prudente/SP
Orientador


Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho.
UFSCAR- São Carlos/ SP


Prof. Dr. Homero Marques Gomes
UNESP – Presidente Prudente/ SP

São José do Rio Preto
06 de junho de 2014

Dedico

Ao meu “**tripé**” de sustentação, **infalível**, que me torna uma pessoa melhor, e que apoiam meus estudos com dedicação e zelo: **Sabedoria** (Meu Papai, **Denivaldo**), **Amor incondicional** (Minha Mamãe, **Francisca**) e **Discernimento** (Razão) (Minha irmã, **Tamara**).

AGRADECIMENTOS

Ao meu bondoso e grandioso Deus pelo dom da vida e por ser minha fonte de coragem sempre.

Aos meus pais **Denivaldo e Francisca**, e minha irmã **Tamara** por me apoiarem em cada etapa deste trabalho, sendo os meus guias, minha inspiração.

Ao meu companheiro **Vitor** por ser muito mais que namorado, ser meu amigo, ser paciente, e me apoiar em cada dificuldade.

Às minhas Famílias **Baldo, Pinheiro da Silva** pelo apoio, carinho, amor incondicional na minha caminhada. Em especial à minha 2^a mãe **Jane**.

Aos meus padrinhos **Dalto e Lurdes** pelo incentivo e amor.

Ao meu cunhado **João** pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Ao Prof. **Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira**, pela orientação e amizade ao decorrer destes 5 anos, desde minha iniciação científica.

Ao **Prof. Dr. Homero Marques Gomes** pelo exemplo, amizade, carinho, paciência e por estar presente desde o meu primeiro ano de faculdade.

Ao **Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho** pelas discussões científicas e pela prontidão em aceitar estar em Presidente Prudente, e poder contribuir para meu trabalho.

Aos **Profs. Dr. Sérgio Antonio Marques de Lima e Dra Silvânia Lanfredi Nobre** pela contribuição e discussões na etapa de qualificação deste trabalho.

A **Prof^a. Dra Ana Maria Pires**, pela amizade, carinho e atenção.

Ao **Prof. Dr. Neri Alves** e, aos alunos **Marcelinho e Gabriel**, por me ajudarem na construção do eletrodo e pelas discussões científicas.

À **Glenda Gonçalves de Souza**, pela amizade e trabalhos de imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Às minhas famílias que eu me agreguei e faço parte delas, em especial: **Pereira Pinto** (Vitor, Ana, Afonso, Lucas e Fernanda), **Proença** (Ércio, Inesita e Marielle) e a **Fernanda Borchert** que me tratam como filha e irmã, com muito apoio, carinho, amor e puxões de orelhas, e sempre preocupadas comigo.

Aos meus amigos que são ou foram do GPES: **André, Camila Proença, Camila Fernanda, Cá Rizzardi, Carol, Dani, Denilson, Diego, Fernando Cincotto, Kaio, Larissa, Mamute, Natália Virag, Paulo, Ranulfo, Roberto (Tone), Wesley, Yan, Luan, Cibely, Yuri, Amanda**, não podendo me esquecer da nossa agregada, **Pati Seraphim (GPfis)**, pois participaram do meu crescimento científico, pessoal, e aguentaram-me no decorrer de muitos anos com risadas, choros e comemorações.

Porém, não posso deixar de agradecer ainda mais aos meus irmãos **Camila Proença, Roberto**, pelo apoio, amor e carinho, tornando-se essenciais na minha caminhada; **ao Diego, Denilson e Wesley**, meus amigos, que admiro muito pela prestatividade, sabedoria nas discussões científicas e pelo carinho; e **Yan e Carol** pela amizade indescritível e pelo apoio e ajuda sempre.

Aos professores da minha graduação e pós-graduação em Química (FCT/UNESP) que fizeram parte da minha caminhada, transmitindo muito mais que conhecimento.

Aos técnicos dos laboratórios didáticos **Sidney, Gabriel, Paulão, Murillo e Marilsa** por sempre me ajudarem e pela paciência.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Física, Química e Biologia da FCT UNESP, em especial, **Juvanir, Michele e Dona Margarida**, pois sempre me acolheram, ajudaram-me com muito carinho.

À **CAPES** (ano 2012) e **FAPESP** (nº processo: 2012/21703-7) pela bolsa concedida.

E por fim, mas não menos importante, aos meus amigos: Cristiano, Camila Zambolin, André, Lionai, Janaína, Éster, Letícia, Rafael Gonçalves, Augusto, Clarezza e Letycia.

À todos que de alguma forma cederam uma parcela de carinho, esforço, incentivo para a realização deste trabalho.

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.” **(Albert Einstein)**

RESUMO

O intuito desta pesquisa foi caracterizar eletrodos quimicamente modificados (EQM) pela formação de monocamadas auto-organizadas (SAM) com os tióis (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol sobre a superfície do eletrodo de ouro. E, ainda, verificar seu comportamento de transferência eletrônica com solução de hexacianoferrato(II) e (III) e sua aplicação como biossensor para glicose. As monocamadas auto-organizadas vêm sendo comumente usadas devido ao seu comportamento homogêneo, o que confere ao eletrodo maior sensibilidade e reprodutibilidade, tornando-se possível desenvolver eletrodos para vários fins e aplicações. Neste trabalho, foram estudadas as monocamadas formadas a partir dos tióis (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol. A caracterização eletroquímica e morfológica das monocamadas auto-organizadas foi realizada através da voltametria cíclica e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. Foi notado que as monocamadas mistas na proporção (1:2) apresentaram maior efeito catalítico, uma vez que se obtiveram maiores sinais analíticos, através do incremento das correntes anódicas e catódicas. A viabilidade da molécula de hexacianoferrato (III) foi verificada através da troca iônica destas moléculas eletroativas com as monocamadas auto-organizadas. Para a aplicação dos eletrodos modificados com monocamadas como biossensor para glicose, optou-se pela modificação na proporção (1:2) de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol, respectivamente, assim como a utilização do mediador hexacianoferrato pré-concentrado por troca iônica durante 2 horas, em virtude que, neste tempo ocorreu uma maior concentração de espécies eletroativas sobre a superfície do ouro, tendo como favorecido o processo de transferência eletrônica. A construção do biossensor de segunda geração para glicose foi efetiva, tendo em vista os baixos valores de K_m^{ap} (10^{-5} mol L⁻¹), k_{obs} (10^{-2} s⁻¹) e baixo limite de detecção 1,0 μ mol L⁻¹. O biossensor desenvolvido neste trabalho mostrou-se seletivo para determinação de glicose frente aos interferentes em estudo: paracetamol, ácido úrico, ácido ascórbico, ácido cítrico, manose, frutose e galactose.

Palavras-chaves: Eletrodo quimicamente modificado, monocamadas, auto-organização, transferência eletrônica, biossensor, glicose.

ABSTRACT

The purpose of this research was to characterize chemically modified electrodes (CME) by the formation of self-assembled monolayers (SAMs) with thiols (11-mercaptoundecyl)-N',N'',N'''trimethylammonium and 6-(ferrocenyl)hexanethiol on the surface of gold electrode. And also verify their behavior of electron transfer in solution with hexacyanoferrate (II) and (III) and its application as a biosensor for glucose. The self-assembled monolayers have been commonly used due to its homogenous, which gives the electrode higher sensitivity and reproducibility, becoming possible to develop electrodes for various purposes and applications. In this research, it was studied the monolayers formed from the thiols (11-mercaptoundecyl)-N',N'',N'''trimethylammonium and 6-(ferrocenyl)hexanethiol. Electrochemical and morphological characterization of self-assembled monolayers were performed using cyclic voltammetry and scanning electron microscopy, respectively. The electrochemical characterization of the different SAMs under study occurred in a solution of 0.10 mol L^{-1} hexacyanoferrate(II) and (III) potassium, verifying the electronic transfer mechanisms involved. It was noted that the self assembled monolayers in proportion (1:2) showed higher catalytic effect, since obtained higher analytical signals by increasing the anodic and cathodic currents. The viability of the hexacyanoferrate (III) molecule was verified by ion exchange these electroactive molecules with self-assembled monolayers. For the application of electrodes modified with monolayers as a biosensor for glucose, we opted for the change in the ratio (1:2) of (11-mercaptoundecyl)-N',N'',N'''trimethylammonium and 6-(ferrocenyl)hexanethiol, respectively, as well as the use of pre-concentrated by ion exchange mediator hexacyanoferrate for 2 hours, because that, this time there was a greater concentration of electroactive species on the surface of gold having favored as the electron transfer process. The construction of second generation biosensor for glucose was effective in view of the low K_m^{ap} values ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) k_{obs} (10^{-2} s^{-1}) and low detection limit 1.0 mmol L^{-1} . The biosensor developed in this study was shown to be selective for glucose, interferents in front of the study: paracetamol, uric acid, ascorbic acid, citric acid, mannose, fructose and galactose.

Keywords: Chemically modified electrode, monolayers, self-organization, electron transfer, biosensor, glucose.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Eletrodos quimicamente modificados (EQM)	21
2.2	Eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas (SAMs)	22
2.3	Monocamadas formadas com (11-mercaptopundecil)-N',N'',N'''-trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol sobre a superfície de ouro	24
2.4	Biossensores	25
2.4.1	<i>Biossensores para glicose</i>	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivos específicos	29
4	MATERIAL E MÉTODO	30
4.1	Reagentes	30
4.1.1	<i>Solução de Ferricianeto de Potássio</i>	31
4.1.2	<i>Solução de Ferri-ferrocianeto de potássio</i>	31
4.1.3	<i>Solução de brometo de (11-mercaptopundecil)-N',N'',N'''-trimetilamônio</i>	31
4.1.4	<i>Solução de 6-ferrocenil-hexanotiol</i>	31
4.1.5	<i>Solução de tampão acetato</i>	31
4.1.6	<i>Solução de β-D-Glicose</i>	31
4.1.7	<i>Solução de glicose oxidase</i>	32
4.1.8	<i>Soluções dos interferentes</i>	32
4.2	Instrumentação	32
4.2.1	<i>Pesagem dos reagentes</i>	32
4.2.2	<i>Medidas eletroquímicas</i>	32
4.3	Eletrodos	32
4.3.1	<i>Eletrodo de trabalho</i>	32
4.3.2	<i>Eletrodo de referência</i>	33

4.3.3 Eletrodo auxiliar	33
4.4 Célula eletroquímica	33
4.5 Estudo da modificação do eletrodo de ouro	34
4.5.1 Preparação dos eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas sobre o eletrodo de ouro	34
4.5.1.1 Monocamadas formadas com brometo de (11-mercaptoundecil)-N',N'',N'''-trimetilamônio	34
4.5.1.2 Monocamadas formadas com brometo de (11-mercaptoundecil)-N',N'',N'''-trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol	35
4.6 Caracterização das SAM	35
4.6.1 Caracterização eletroquímica	35
4.6.1.1 Estudo do tempo de pré-concentração com ferricianeto de potássio sobre o eletrodo quimicamente modificado	36
4.6.2 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura	36
4.7 Método de adição múltipla de padrão para detecção de glicose.....	36
4.8 Estudo dos interferentes na determinação de glicose	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Monocamadas formadas por (11-mercaptoundecil)-N',N'',N'''-trimetilamônio	37
5.1.1 Efeito da concentração do tiol funcionalizado	37
5.1.2 Efeito do tempo de imersão	38
5.1.3 Estudo da velocidade de varredura em solução de hexacianoferrato (II) e (III) de potássio 0,10 mol L ⁻¹	41
5.1.4 Estudo da velocidade de varredura no eletrodo de ouro quimicamente modificado com SAM formadas por (11-mercaptoundecil)-N',N'',N'''-trimetilamônio pré-concentradas como mediador eletrônico hexacianoferrato 0,10 mol L ⁻¹	45
5.2 Formação e caracterização de monocamadas auto-organizadas mistas (SAM mistas)	49
5.2.1 Estudo da velocidade de varredura em solução de hexacianoferrato (II) e (III) de potássio 0,10 mol L ⁻¹	51

5.2.2 Estudo da velocidade de varredura no eletrodo de ouro quimicamente modificado com SAM mistas pré-concentradas como mediador eletrônico hexacianoferrato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$	56
5.2.2.1 Período de pré-concentração do mediador eletrônico durante 1 hora.	57
5.2.2.2 Período de pré-concentração do mediador eletrônico durante 2 horas	61
5.2.2.3 Período de pré-concentração do mediador eletrônico durante 3 horas	65
5.5 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	70
5.6 Avaliação eletroquímica do biossensor em relação à resposta para espécie de interesse	72
5.6.1 Biossensor voltamétrico.....	72
5.6.2 Biossensor amperométrico.	78
5.7 Estudo de interferentes na determinação de glicose.	81
6 CONCLUSÃO	83
7 ATIVIDADES FUTURAS.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação do funcionamento de um biossensor.26
- Figura 2:** Etapas do funcionamento de um biossensor para glicose de 2ª geração. 28
- Figura 3:** Representação da célula eletroquímica, onde EA: Eletrodo de platina; ET: Eletrodo modificado com monocamadas auto-organizadas e ER: Eletrodo de Calomelano ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$).34
- Figura 4:** Voltamogramas cíclicos para o eletrodo de ouro modificado com diferentes concentrações de tiol (1 mmol L^{-1} , 10 mmol L^{-1} e 20 mmol L^{-1}). As determinações foram feitas a 25 mV s^{-1} em $1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, aplicando a janela de potencial de $-0,3$ a $0,8 \text{ V}$38
- Figura 5:** Variação de valores de corrente de pico anódica e catódica com o tempo de imersão do eletrodo de ouro na solução de alcanotiol a 20 mmol L^{-1} . Valores de corrente de pico obtidos em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$39
- Figura 6:** Variação de valores de potenciais de pico anódico e catódico em função do tempo de imersão do eletrodo de ouro na solução de alcanotiol a 20 mmol L^{-1} . Valores de corrente de pico obtidos em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$40
- Figura 7:** Estudo da influência da velocidade de varredura em um eletrodo modificado com SAM de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio. As análises foram realizadas em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,50 \text{ mol L}^{-1}$ em janela de potencial de $-0,3$ a $0,8 \text{ V}$41
- Figura 8:** Representação do processo de transferência eletrônica do tipo misto (adsortivo e difusional) através do logaritmo das correntes de pico anódica pelo logaritmo da variação da velocidade de varredura.43
- Figura 9:** Estudo da varredura de potencial pela variação do logaritmo da velocidade de varredura em monocamadas de tiol funcionalizado em eletrodo de ouro.44
- Figura 10:** Representação esquemática do estudo de pré-concentração com $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}(\text{aq})$ (3^-) em SAM de (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' trimetilamônio. Fonte: Elaborada pelo autor, a partir de dos básicos da pesquisa.46
- Figura 11:** Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio, pré-concentrado em ferricianeto de potássio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ durante 1 hora em cloreto de potássio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$47

Figura 12: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11-mercaptoundecil)- <i>N',N'',N'''</i> -trimetilamônio, pré-concentrado em ferricianeto de potássio 0,10 mol L ⁻¹ durante 2 horas em cloreto de potássio 0,50 mol L ⁻¹	47
Figura 13: Dependência das correntes de picos em função da velocidade de varredura de potenciais para o par redox Fe ³⁺ /Fe ²⁺ em SAM formadas com (11-mercaptoundecil)- <i>N',N'',N'''</i> trimetilamônio e pré-concentrados durante 1 hora com K ₃ [Fe(CN) ₆].	48
Figura 14: Dependência das correntes de picos em função da velocidade de varredura de potenciais para o par redox Fe ³⁺ /Fe ²⁺ em SAM formadas com (11-mercaptoundecil)- <i>N',N'',N'''</i> trimetilamônio e pré-concentrados durante 2 horas com K ₃ [Fe(CN) ₆].	48
Figura 15: Representação esquemática da oxiredução do 6-(ferrocenil)hexanotiol.	50
Figura 16: Representação esquemática de monocamadas auto-organizadas mistas de (11- mercaptoundecil)- <i>N',N'',N'''</i> -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (proporção 1:1, respectivamente). Fonte: Elaborada pelo autor, a partir de dos básicos da pesquisa.....	51
Figura 17: Representação esquemática de monocamadas auto-organizadas mistas de (11-mercaptoundecil)- <i>N',N'',N'''</i> trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (proporção 1:2, respectivamente). Fonte: Elaborada pelo autor, a partir de dos básicos da pesquisa.....	51
Figura 18: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- <i>N',N'',N'''</i> -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol na proporção (1:1) em solução de hexacianoferrato (II) e (III) 0,10 mol L ⁻¹	52
Figura 19: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- <i>N',N'',N'''</i> -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol na proporção (1:2) em solução de hexacianoferrato (II) e (III) 0,10 mol L ⁻¹	52
Figura 20: Estudo do comportamento de transferência eletrônica através dos valores do logaritmo das correntes anódicas e catódicas em função do logaritmo das velocidades de varredura, em monocamadas mistas (1:1) em solução de [Fe(CN) ₆] ³⁻ /[Fe(CN) ₆] ⁴⁻ em KCl 0,50 mol L ⁻¹	53

Figura 21: Estudo do comportamento de transferência eletrônica através dos valores do logaritmo das correntes anódicas e catódicas em função do logaritmo das velocidades de varredura, em monocamadas mistas (1:2) em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{4-}$ em KCl 0,50 mol L ⁻¹	53
Figura 22: Estudo da varredura de potenciais pela variação do logaritmo da velocidade de varredura para eletrodos modificados com monocamadas mistas (1:1).....	55
Figura 23: Estudo da varredura de potenciais pela variação do logaritmo da velocidade de varredura para eletrodos modificados com monocamadas mistas (1:1).....	55
Figura 24: Representação esquemática do estudo de pré-concentração com $\text{Fe}[\text{CN}]_6^{3-}(\text{aq})$ (3^-) em SAM mistas (1:1). Fonte: Elaborada pelo autor, a partir de dos básicos da pesquisa.	57
Figura 25: Representação esquemática do estudo de pré-concentração com $\text{Fe}[\text{CN}]_6^{3-}(\text{aq})$ (3^-) em SAM mistas (1:2). Fonte: Elaborada pelo autor, a partir de dos básicos da pesquisa.	57
Figura 26: Voltamograma cíclico referente a SAM de (11-mercaptoundecil)- <i>N',N'',N'''</i> -trimetilamônio, pré-concentradas com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ durante 1 hora em KCl 0,5 mol L ⁻¹	58
Figura 27: Voltamograma cíclico referente a SAM de 6-(ferrocenil)hexanotiol realizado em KCl 0,50mol L ⁻¹ . a 25 mV s ⁻¹	58
Figura 28: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- <i>N',N'',N'''</i> -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:1), pré-concentrado em hexacianoferrato de potássio 0,10 mol L ⁻¹ durante 1 hora em solução de cloreto de potássio 0,50 mol L ⁻¹	59
Figura 29: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- <i>N',N'',N'''</i> -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:2), pré-concentrado em hexacianoferrato de potássio 0,10 mol L ⁻¹ durante 1 hora em solução de cloreto de potássio 0,50 mol L ⁻¹	59
Figura 30: Dependência das correntes de picos em função da velocidade de varredura de potenciais: oxidação do ferroceno para o eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- <i>N',N'',N'''</i> -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:1) e pré-concentrados durante 1 hora em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_{(\text{aq})}$	60

Figura 31: Dependência das correntes de picos em função da velocidade de varredura de potenciais: oxidação do par redox do hexacianoferrato em monocamadas mistas (1:1) e pré-concentrados durante 1 hora em $K_3[Fe(CN)_6]_{(aq)}$. 60

Figura 32: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:1), pré-concentrado em hexacianoferrato durante 2 horas em solução de cloreto de potássio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$62

Figura 33: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:2), pré-concentrado em hexacianoferrato durante 2 horas em solução de cloreto de potássio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$62

Figura 34: Dependência das correntes de picos em função da velocidade de varredura de potenciais: oxidação do ferroceno para o eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:1).63

Figura 35: Dependência das correntes de picos em função da velocidade de varredura de potenciais: oxidação do par redox do hexacianoferrato em monocamadas mistas (1:1) e pré-concentrados durante 2 horas em $K_3[Fe(CN)_6]_{(aq)}$64

Figura 36: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:1), pré-concentrado em hexacianoferrato durante 3 horas em solução de cloreto de potássio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$66

Figura 37: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:2), pré-concentrado em hexacianoferrato durante 3 horas em solução de cloreto de potássio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$67

Figura 38: Estudo do comportamento de transferência eletrônica através dos valores do logaritmo das correntes anódicas e catódicas em função do logaritmo das velocidades de varredura, em monocamadas mistas (1:1) pré-concentradas durante 3 horas com hexacianoferrato.68

Figura 39: Estudo do comportamento de transferência eletrônica através dos valores do logaritmo das correntes anódicas e catódicas em função do logaritmo das velocidades de varredura, em monocamadas mistas (1:2) e pré-concentrados durante 3 horas em $K_3[Fe(CN)_6]$68

Figura 40: Imagens de MEV com diferentes morfologias. (a) eletrodo de ouro não modificado, (b) eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- <i>N',N'',N'''</i> -trimetilamônio, (c) eletrodo de ouro modificado com monocamadas auto-organizadas do tipo mistas (6-ferrocenilhecanotiol e (11-mercaptoundecil)- <i>N',N'',N'''</i> -trimetilamônio), d) eletrodo de ouro modificado com monocamadas auto-organizadas do tipo mistas (6-ferrocenilhecanotiol e (11-mercaptoundecil)- <i>N',N'',N'''</i> -trimetilamônio) pré-concetrado com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3^-$ por 2 horas.....	71
Figura 41: Voltamograma cíclico de o eletrodo de ouro modificado com monocamadas auto-organizadas (1:2, proporção) em tampão de acetato (pH = 4,6) 0,10 mol L ⁻¹ a 25 mV s ⁻¹	73
Figura 42: Resposta voltamétrica do biossensor proposto para adições sucessivas de glicose em tampão de acetato 0,10 mol L ⁻¹ (pH = 4,6) a 25 mV s ⁻¹	74
Figura 43: Curva analítica obtida através das correntes de pico catódicas em função de sucessivas adições de glicose.	75
Figura 44: Representação gráfica de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos.	76
Figura 45: Representação linear de Eadie-Hofstee (EH) para determinação dos parâmetros cinéticos.	77
Figura 46: Representação linear de Hanes-Woolf para determinação dos parâmetros cinéticos.	77
Figura 47: Resposta amperométrica do biossensor proposto para adições sucessivas de glicose em tampão de acetato 0,10 mol L ⁻¹ (pH = 4,6) a 25 mV s ⁻¹ no potencial fixo de 0,06 V.....	79
Figura 48: Curva analítica de adições de β-D-glicose para o biossensor amperométrico em solução tampão de acetato 0,10 mol L ⁻¹ (pH=4,6).....	80
Figura 49: Corrente relativa (%) de interferentes em relação á concentração de glicose (GLU) 1,23 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ . AA = ácido ascóxico; AU = ácido úrico; AC= ácido cítrico; MN= manose; GA= galactose; FR=frutose; PA = paracetamol.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Procedência e pureza dos reagentes utilizados.	30
Tabela 2: Valores de potencial e corrente de pico dos voltamogramas cíclicos para as diferentes concentrações da solução etanólica de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio.	38
Tabela 3: Valores de potenciais e correntes de pico obtidos em função do aumento do período do tempo de imersão do eletrodo de ouro em (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio.	40
Tabela 4- Valores de potenciais, variação do potencial e correntes de pico para os picos anódicos e catódicos apresentados na Figura 7.	42
Tabela 5: Valores das constantes de transferência eletrônica das monocamadas de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e valores das constantes encontradas na literatura [103].	45
Tabela 6: Dados obtidos para as monocamadas mistas através das equações das retas obtidas pelas Figuras 30 e 31.	61
Tabela 7: Dados obtidos para as monocamadas mistas através dos valores de coeficientes angulares obtidos pela equação da reta dos valores de corrente em função da velocidade de varredura.	65
Tabela 8: Dados obtidos através das equações das retas das Figuras 38 e 39.	69
Tabela 9: Representação das equações lineares obtidas através do rearranjo da equação de Michaelis- Menten.	76
Tabela 10: Valores de K_m^{ap} , k_{obs} e coeficientes de regressão linear referente as representações gráficas das Figuras de 47 a 49.	78
Tabela 11: Comparação entre o biossensor deste trabalho e os recentemente publicados.	81

LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EQM: eletrodo quimicamente modificado

SAM: do inglês self- assembled monolayers, ou seja, monocamadas auto-organizadas

FCSH e/ ou C₁₆H₂₂FeS: 6-(ferrocenil)hexanotiol

KCl: Cloreto de potássio

K₃[Fe(CN)₆]: Ferricianeto de potássio

K₄[Fe(CN)₆]: Ferrocianeto de potássio

C₂H₆O: Álcool etílico

C₁₄H₃₂BrNS: (11- mercaptoundecil)-*N',N'',N'''* trimetilamônio

ET: Eletrodo de trabalho

ER: Eletrodo de Referência

EA: Eletrodo Auxiliar

EC: Eletrodo de Calomelano

R_a: Correlação Linear na região anódica

R_c: Correlação Linear na região catódica

N_a: Número de pontos na região anódica

N_c: Número de pontos na região catódica

GOx: glicose oxidase

MEV: microscopia eletrônica de varredura

GLI: Glicose

FR: Frutose

GA: Galactose

MA: Manose

PA: Paracetamol

AA, AC, AU: ácidos ascórbico, cítrico e úrico, respectivamente

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 01: Oxidação da Glicose em ácido glicônico na presença de oxigênio

Equação 02: Oxidação do centro enzimático glicose oxidase na presença do mediador eletrônico hexacianoferrato (III)

Equação 03: Redução do mediador eletrônico (hexacianoferrato) no eletrodo

Equação 04: Representação do cálculo da constante aparente de transferência eletrônica

Equação 05: Representação do cálculo do coeficiente de transferência eletrônica anódico

Equação 06: Representação do cálculo de espécies eletroativas na superfície do eletrodo para processos adsortivos

Equação 07: Representação do cálculo de espécies eletroativas na superfície do eletrodo para processos difusionais

Equação 08: Oxidação do centro enzimático glicose oxidase na presença de oxigênio

Equação 09: Oxidação do mediador eletrônico (hexacianoferrato) pelo peróxido de hidrogênio

Equação 10: Representação gráfica de Michaelis-Menten

Equação 11: Representação gráfica de Lineweaver- Burk (LB)

Equação 12: Representação gráfica de Eadie- Hofstee (EH)

Equação 13: Representação gráfica de Hanes- Woolf (HW)

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento acelerado de sensores eletroquímicos para suprir necessidades específicas nas áreas industriais, clínicas e ambientais, tem buscado nesses sensores características como: alta seletividade, sensibilidade e estabilidade. Nesse sentido, o controle e manipulação das propriedades das superfícies eletródicas podem proporcionar uma variedade de efeitos atrativos, e reduzir efetivamente muitos dos problemas apresentados pelos sensores eletroquímicos tradicionais [1-3].

A utilização de monocamadas auto-organizadas na construção de eletrodos modificados ganhou grande impulso nos últimos anos uma vez que a auto-organização conferida pelos tióis funcionalizados possibilita projetar eletrodos seletivos para analitos de interesse, propiciando assim sistemas flexíveis com um gama de aplicações [4].

A construção de sensores enzimáticos obtidos por monocamadas auto-organizadas é amplamente empregada. Os métodos de imobilização de materiais biológicos têm se tornados versáteis, pois atendem as necessidades de controle de diversos processos, de obtenção de dados que permitam diagnósticos de doenças causadas por vírus e bactérias, detecção de patógenos em bebidas lácteas, e da segurança e monitoramento ambientais [5-7].

As técnicas eletroquímicas apresentam grande potencial para o estabelecimento de métodos alternativos de análise de materiais biológicos, principalmente, pela possibilidade do desenvolvimento de sensores para uso *in-situ*. Dentre as técnicas mais comumente usadas para a determinação de glicose utilizando biossensores, destacam-se: a voltametria cíclica, a voltametria de pulso diferencial, a voltametria de onda quadrada e a cronoamperometria. A utilização de técnicas eletroanalíticas possibilita a caracterização e o desenvolvimento de sensores com menor limite de detecção e quantificação [8, 9].

No presente trabalho, investigaram-se as potencialidades da utilização das monocamadas auto-organizadas na construção de um biossensor específico para glicose e com características vantajosas em relação aos biossensores já existentes, no que se refere à melhora do limite de detecção, da seletividade e da estabilidade para possíveis aplicações em amostras reais de sangue e urina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Eletrodos quimicamente modificados (EQM)

Na década de 70, o termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi introduzido na eletroquímica [10, 11] para denotar imobilização de espécies quimicamente ativas na superfície eletródica, com o intuito de minimizar a passivação gradual da superfície [12]. Essa passivação é provocada principalmente pela adsorção dos produtos da própria reação de óxido-redução utilizada na detecção, ou ainda, dos subprodutos ou produtos destas reações que podem sofrer polimerização e se depositar sobre a superfície dos eletrodos [13].

Um eletrodo modificado é constituído basicamente por duas partes: o eletrodo base (superfície condutora), sendo os mais convencionais os de ouro, de platina, de carbono vítreo, de fibras de carbono e de mercúrio na forma de filme sobre os quais é depositada uma camada do modificador químico eletroativo, dentre os quais se podem citar: tióis funcionalizados, bases de *Schiff*, óxido de manganês, entre outros, sendo que a escolha desta camada depende das características analíticas desejadas para sensor [9, 13, 14].

A modificação da superfície do eletrodo favorece o pré-estabelecimento e controle da natureza físico-química da interface eletrodo-solução, alterando sua reatividade e seletividade, proporcionando assim, o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações [12, 13]. A utilização da camada modificadora depositada sobre a superfície do eletrodo base melhora a reatividade do mesmo através da elevação da taxa de transferência eletrônica entre o analito e os materiais dos eletrodos [15]. Portanto, os sensores químicos têm desempenhado um papel imprescindível dentro da Química Analítica, uma vez que propiciam uma melhor reatividade ao analito de interesse e são fáceis de reproduzir e utilizar [1].

Dentre os recursos empregados para a modificação química dos eletrodos destacam-se: a adsorção irreversível direta (simples e rápida) [14, 16]; a ligação covalente do agente modificador a sítios específicos da superfície eletródica (manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes no eletrodo) [17]; o recobrimento com filmes poliméricos, ampliando a resposta eletroquímica através da imobilização de multicamadas da espécie ativa sobre o eletrodo [18] e/ ou a

alteração dos compósitos dos eletrodos à base de pasta de carbono (modificação interna do material eletródico) [19].

As preparações e as utilizações de EQM têm sido amplamente estudadas. As aplicações dos eletrodos modificados são evidenciadas em eletrocatalise, em cinética de transferência eletrônica, na permeação de membranas, na síntese eletro-orgânica e foto-eletroquímica [20-25]. Em virtude disso, os sensores químicos têm tido crescente interesse devido as suas importantes características, tornando-se potencialmente promissores [1].

2.2 Eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas (SAMs)

Em 1946, Zisman et al. [26], iniciou estudos de preparação de uma camada mono molecular formada por adsorção de um agente tenso ativo sobre superfície uma metálica. Estes estudos foram realizados com uma grande variedade de solventes (hidrocarbonetos, dissulfureto de carbono, tetracloreto de carbono, bromobenzeno e difenilóxido), porém o nível de interesse era limitado, sendo que o potencial de auto-montagem ainda não havia sido explorado.

Em 1985, foi descoberta a formação de monocamadas auto-organizadas (SAM do inglês self-assembled monolayers) através de soluções diluídas de di-*N* dissulfetos-alcúlicos sobre a superfície de ouro [27].

Muitos sistemas de automontagem já foram investigados, no entanto, monocamadas de alcanotióis e tióis funcionalizados sobre a superfície de ouro foram as mais estudadas até o momento. O interesse por monocamadas formadas sobre ouro deve-se ao fato deste metal ser inerte (não reage com o oxigênio atmosférico) e ser utilizado como substrato para análises espectroscópicas, além de apresentar estabilidade para a detecção eletroquímica em uma ampla janela de potencial de -0,50 V a 1,40 V [28-31]. Além disso, o mecanismo de transferência eletrônica tem sido muito explorado no estudo eletroquímico do eletrodo modificado com SAMs, pois as variáveis como a energia livre de Gibbs, o acoplamento eletrônico entre o doador de elétrons e aceptor, a energia de reorganização e a temperatura, podem ser controlados experimentalmente, através da teoria de Marcus-Hush [32-35].

As SAMs são construídas pela adsorção espontânea de uma camada monomolecular de moléculas de um surfactante por uma superfície sólida. Este tipo

de modificação da superfície do eletrodo é aplicado em eletroquímica e subdividido em três categorias de acordo com o modo de fixação [32]:

- Adsorção de moléculas de alquilclorossilanos e alquilaminossilanos sobre superfícies de hidróxido de silício [36];
- Técnica de Langmiur – Blodgett (LB): formação de um filme monomolecular sobre a superfície de uma subfase aquosa, sendo este transferido para um substrato sólido, seguido de imersão e retirada do substrato [37, 38];
- Monocamadas auto-organizadas com moléculas funcionalizadas sobre superfícies metálicas [39].

A auto-organização das SAMs ocorre em três etapas:

1) interface SAMs/substrato – nela está localizado o sítio reacional da ligação entre o composto organotiol e a superfície de ouro, para a formação da ligação enxofre-ouro;

2) interface SAMs/ fase (aquosa ou gasosa) – nela está localizado o sítio onde ocorre uma variedade de reações, que tornam possível a modificação da superfície da SAMs com diversos grupos funcionais. As propriedades físicas desta interface podem ser modificadas com base nos grupos terminais. O grupo metil produz monocamadas com caráter hidrofóbico, enquanto grupos como hidroxila, formam SAMs com caráter hidrofílico (grupo terminal) e hidrofóbico (cadeia principal). As monocamadas podem apresentar também dipolos alinhados na interface, que podem ser invertidos com base nos substituintes terminais, por exemplo, as aminas ricas em elétrons, comparado com os grupos nitrilos pobres em elétrons [34].

3) estrutura espacial do interior da monocamada (camada intermediária entre as duas interfaces) - nela ocorre a transferência eletrônica [14, 40-44]. O comprimento da cadeia conduz à formação de monocamadas densas ($n > 10$) [45]. As interações moleculares através das forças de Van der Waals entre as moléculas em redes contribuem para a estabilidade. Nas SAMs alcanotiol-Au, esta contribuição aumenta com o comprimento da cadeia alquila, tal como cada metileno ($-CH_2-$) contribui com cerca de uma unidade de $kcal\ mol^{-1}$ [34].

A habilidade para pré-projetar a monocamada possibilita desenvolver superfícies com propriedades e funções específicas, viabilizando interações específicas entre a superfície do eletrodo e os analitos. As principais aplicações da SAM na área de Química são: transferência eletrônica (catálise) [46], fenômenos de

interface (corrosão), novos materiais (adesão/lubrificação) e sensores (ópticos, eletroquímicos e piezelétricos) [1]. Na área de sensores eletroquímicos, a alta organização exibida pelas monocamadas, assegura um comportamento homogêneo em toda a superfície do eletrodo, contribuindo para a obtenção de sensores com maiores sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade [1]. A utilização desses sistemas altamente organizados oferece uma combinação única das propriedades físicas, que permitem estudos fundamentais entre as interações que ocorrem na interface formada pela superfície do eletrodo suporte e as moléculas da monocamada e delas com o solvente, tornando-se substratos inestimáveis em bioanalítica, organometálicos, física, orgânica, bio-orgânicos e eletroquímica [47].

A utilização de SAMs vem crescendo, nos últimos anos, dentro da eletroanalítica, destacando-se sua aplicação na construção de biossensores, devido:

- a facilidade na formação das monocamadas e suas estruturas ordenada.
- a formação de membranas similares a ambientes celulares adequadas para imobilização de biomoléculas.
- a presença de uma variedade de grupos terminais com superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas.
- a diminuição do consumo com reagentes, uma vez que é necessária uma quantidade mínima da biomolécula de interesse para imobilização e estabilidade por um período considerável, permitindo a realização de um grande número de medidas [48, 49].

Além disso, as SAMs formadas a partir de tiol ou ditiol sobre ouro, têm grande aplicabilidade em: eletrônica molecular (transistores e comutadores); biossensores (imobilização de biomoléculas: enzimas, DNA, membrana fosfolípídicas); síntese de nanopartículas de ouro; utilização como modelos químicos para a cristalização de sais inorgânicos; funcionalização de dispositivos para detecção de patógenos (bactéria, vírus), garantindo boa funcionalidade destes dispositivos, com o tempo de meia vida, tempo de detecção e resposta [28, 50-52].

2.3 Monocamadas formadas com (11-mercaptoundecil)-*N',N'',N'''* trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol sobre a superfície de ouro

Os alcanotióis são amplamente empregados nos estudos de modificação de superfícies para a formação de monocamadas auto-organizadas, uma vez que

propiciam uma eficiente padronização e funcionalização da interface eletrodo/solução, possibilitando, por exemplo, a fabricação de biossensores [9].

Os grupos terminais eletroativados são considerados padrões para a compreensão dos mecanismos de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução e têm sido alvo de grande interesse nos estudos referente à modificação da superfície eletródica [53, 54].

Inicialmente, a molécula 6-(ferrocenil)hexanotiol foi adotada como sistema modelo para estudar a troca de elétrons entre os grupos ferroceno e o eletrodo de ouro, devido ao caráter eletroquímico simples e eficaz deste grupo eletroativador [22]. A molécula de 6-ferrocenil-1-hexanotiol ($\text{Fc}(\text{CH}_2)_6\text{SH}$), que será referida como FCSH, foi previamente investigada como SAM para atender esses fins [53].

Uma forma adequada de modificar a superfície de ouro em nível molecular é a inclusão de algumas moléculas receptoras, que nas monocamadas são usadas como um suporte para o reconhecimento molecular na superfície, através da formação de complexos de inclusão via interação hospedeiro-hóspede [9, 55]. Monocamadas formadas por tióis com grupos terminais ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), apresentam forte tendência para a automontagem e, o grupo amina também confere um melhor comportamento eletrocatalítico, uma vez que possui deficiência de elétrons, sendo carregada positivamente, propiciando a interação destas moléculas com mediadores eletrônico, como por exemplo, o hexacianoferrato. Com a adsorção da enzima glicose oxidase sobre o eletrodo modificado com estas moléculas e na presença de um mediador eletrônico, a determinação de glicose é facilitada através de sucessivas reações químicas e eletroquímica, entre o centro ativo da enzima (glicose oxidase), mediador eletrônico e o analito em interesse [56]. Para a funcionalização de superfícies metálicas de ouro, com a finalidade de empregar o EQM como biossensor, foi utilizado também o tiol (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' trimetilamônio.

2.4 Biossensores

A concepção básica do biossensor foi elucidada pela primeira vez por Clark Lyons, em 1962 em sua descrição de um sensor enzimático para a determinação de

glicose. Essa conquista permitiu um contínuo e permanente desenvolvimento na área de sensores biológicos [57].

Os biossensores são definidos como sensores que combinam a alta seletividade de um elemento biológico e sua sensibilidade ao analito de interesse, sendo estes ligados a um transdutor responsável pela conversão do sinal biológico em sinal elétrico proporcional à concentração do analito [58, 59]. Os materiais biológicos para a confecção dos biossensores mais comumente utilizados são os antígenos, os anticorpos, as enzimas, os tecidos animais e vegetais, as células e diversas organelas.

A natureza do transdutor utilizado classifica os biossensores como eletroquímicos (potenciométricos, amperométricos e condutimétricos) [60-65], ópticos (iluminescência, fluorescência, elipsimetria, entre outros) [66-69], detectores de massas (piezelétricos) [70] e termoelétricos [71-73].

A seletividade do biossensor o diferencia dos demais sensores químicos, uma vez que existe seletividade de reconhecimento do analito pelo componente biológico ativo. Isto aliado à sensibilidade do transdutor, tem gerado um grande número de trabalhos na área de biossensores catalíticos [74-77]. O uso de enzimas proporciona a construção de sensores biológicos com elevada seletividade para a detecção do analito em interesse [78].

O funcionamento do biossensor é esquematizado na Figura 1.

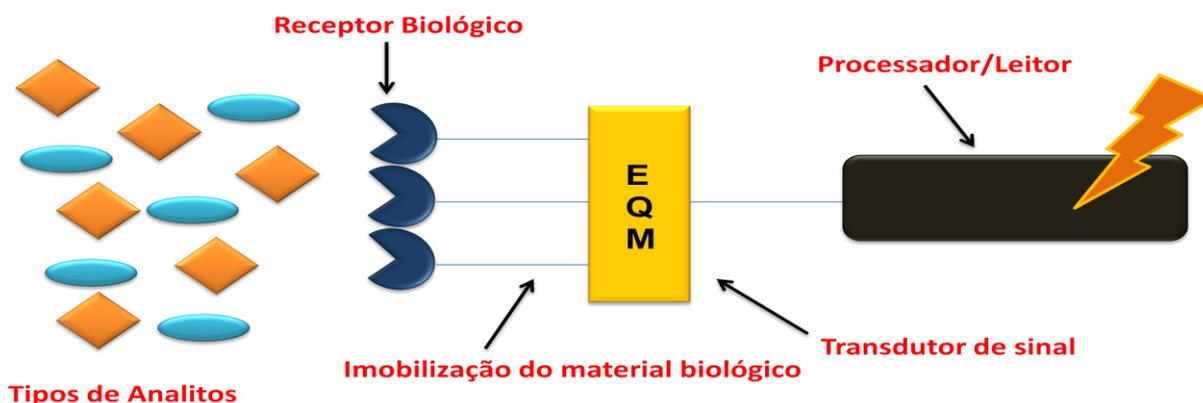


Figura 1: Representação do funcionamento de um biossensor.

O avanço na área de sensores biológicos, no decorrer dos últimos 50 anos, é notório, visto que em 1985 houve a publicação de quase uma centena de artigos na área, enquanto em 2013 foram publicados cerca de quatro mil [74]. A ascensão nesta área deve-se à necessidade de aperfeiçoar as vantagens dos biossensores, tais como: determinação de níveis traços do analito, como também melhorar a

sensibilidade, o limite de detecção, a estabilidade, a seletividade, a portabilidade, a análise em tempo real e a simplicidade na operação dos biossensores [7, 58, 74, 79-82].

A utilidade dos biossensores em aplicações analíticas se tornou vantajosa, pois a purificação de enzimas é um processo relativamente barato, já que muitas delas podem ser isoladas de microrganismos como fungos e bactérias [58, 83].

Ainda que a atividade enzimática seja reduzida, as vantagens dos biossensores enzimáticos são a maior estabilidade conformacional e possível reutilização dependendo da imobilização da enzima, como também as análises químicas podem ser realizadas *in situ* ou *in vivo* pelo próprio paciente [58].

2.4.1 Biossensores para glicose

Em 1975, o primeiro biossensor comercial de glicose é lançado pela Yellow Springs Company (Ohio), baseado na detecção amperométrica de peróxido de hidrogênio [84].

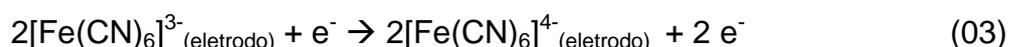
Os biossensores de glicose consistem na imobilização da glicose oxidase (GOx) sobre uma superfície eletródica. A GOx é uma oxireductase que catalisa a oxidação da β -D-glicose, em meio aquoso, na presença de oxigênio. Este processo ocorre em duas etapas: na primeira acontece a oxidação enzimática da glicose e a coenzima flavina adenina dinucleotídeo (FAD) é reduzida a FADH₂; na etapa seguinte, a coenzima é oxidada (regeneração biocatalítica) pelo oxigênio molecular com a produção de peróxido de hidrogênio [85].

A classificação dos biossensores amperométricos de glicose é realizada através de três gerações, de acordo com o processo de transferência eletrônica envolvido, o reconhecimento do analito, e a geração e a detecção do sinal [86-88]. Esta classe é dividida em:

- Primeira geração: consiste na resposta elétrica provocada pela difusão dos reagentes e/ou produtos normais da reação para o transdutor, onde a resposta analítica é monitorada pelo consumo de oxigênio ou pela produção de peróxido. O modificador químico eletroativo é responsável apenas pela imobilização da glicose oxidase. A desvantagem na operação de sensores enzimáticos de primeira geração é os problemas de interferência, uma vez que estes sensores operam em potenciais mais elevados.

- Na segunda geração ocorre a presença de “mediadores” específicos ou cofatores que atuam na transferência de carga entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo, ou seja, entre a reação e o transdutor de forma a ampliar a resposta elétrica. As Equações 01 a 03 representam biossensores de segunda geração para detecção de glicose, onde a *enzima glicose oxidase (GOx)* catalisa a conversão da glicose em ácido glicônico, seguido pela recepção de elétron pelo mediador na forma oxidada ($M_{(oxi)}$) da enzima na forma reduzida (GOx_{red}). O sinal de corrente gerado através da reoxidação do mediador na superfície do eletrodo será proporcional à concentração de glicose [89]. O mediador eletrônico tem a finalidade de diminuir o potencial de trabalho aplicado, dificultando reações interferentes [90].

Os biossensores de 2ª geração apresentam as seguintes reações para a detecção da glicose:



As representações esquemáticas das reações que ocorrem no biossensor de segunda geração deste trabalho estão esquematizadas na Figura 2:

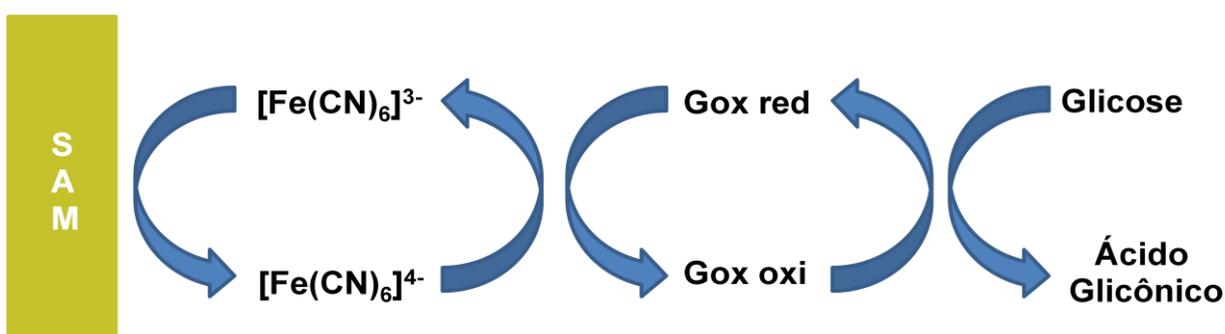


Figura 2: Etapas do funcionamento de um biossensor para glicose de 2ª geração.

Os mediadores mais comumente utilizados são o ferroceno e seus derivados, por possuírem baixos potenciais redox, geralmente independentes do pH [91].

A utilização do hexacianoferrato como mediador eletrônico iniciou-se em 1976 na Suíça [84], para um biossensor de lactose. Este mediador era responsável pela transferência eletrônica entre o *lactato desidrogenase* e o eletrodo.

- Terceira geração compreende a transferência direta dos elétrons da enzima para a superfície do eletrodo em baixos potenciais, ou seja, a transformação do substrato em produto ocorre no centro ativo da enzima. [92-94].

Na construção dos biossensores para glicose pode-se levar em consideração: a resposta através da variação da concentração de O_2 consumido no processo ou de H_2O_2 produzido; da redução ou oxidação destas substâncias ou dos mediadores eletrônicos envolvidos (biossensores amperométricos); da variação do pH local devido à produção de ácido glucônico (biossensores potenciométricos); da mudança da resistividade elétrica do meio durante todo processo (biossensores condutométricos) ou pelo calor produzido (biossensores entalpimétricos) [94-96].

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a modificação química do eletrodo de ouro com monocamadas auto-organizadas formadas pelos tióis funcionalizados de (11-mercaptoundecil)-*N'**N''**N'''*-trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol. Como segunda etapa é a aplicação do eletrodo no desenvolvimento de um sensor enzimático para glicose.

3.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse trabalho fundamentaram-se em:

- O estudo do mecanismo de transferência eletrônica por voltametria cíclica em solução aquosa de $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$.
- Estudo da viabilidade do hexacianoferrato $[Fe(CN)_6]^{3-}$ como mediador eletrônico sobre as monocamadas auto-organizadas através do estudo da imobilização do hexacianoferrato por troca-iônica.
- Caracterização morfológica das monocamadas auto-organizadas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura.
- Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de glicose através de um biossensor voltamétrico e amperométrico de 2ª geração.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos são de pureza analítica (PA), suas fórmulas e procedências encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Procedência e pureza dos reagentes utilizados.

Reagente	Fórmula Química	Procedência	Pureza %
6- ferrocenil-hexanotiol.	$C_{16}H_{22}FeS$	Sigma	$\geq 95,0$
Acetato de sódio	CH_3COONa	Vetec	99,0
Ácido acético	CH_3COOH	Vetec	99,7
Ácido ascórbico	$C_6H_8O_6$	Vetec	99,0
Ácido cítrico	$C_6H_8O_7$	Vetec	98,4
Ácido úrico	$C_5H_4N_4O_3$	Sigma	99,0
Álcool etílico	C_2H_6O	Sigma	99,6
brometo de (11-mercaptopundecil)- <i>N',N'',N'''</i> -trimetilamônio.	$C_{14}H_{32}BrNS$	Sigma	$\geq 90,0$
Cloreto de potássio	KCl	Vetec	99,0
D-Frutose	$C_6H_{12}O_6$	Sigma	$\geq 99,0$
Galactose	$C_6H_{12}O_6$	Sigma	$\geq 99,0$
Glicose oxidase (<i>Aspergillus niger</i>)	-	Sigma	-
Hexacianoferrato (II)	$[Fe(CN)_6]^{4-}_{(aq)}$	Vetec	98,5
Hexacianoferrato (III)	$[Fe(CN)_6]^{3-}_{(aq)}$	Vetec	99,0
Manose	$C_6H_{12}O_6$	Sigma	$\geq 99,0$
Paracetamol	$C_8H_9NO_2$	Sigma	$\geq 97,0$
β -D-glicose	$C_6H_{12}O_6$	Sigma	99,5

4.1.1 Solução de Ferricianeto de Potássio

A solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ foi preparada na concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, para realização do estudo da viabilidade deste complexo como mediador de elétrons entre a interface eletrodo modificado- solução.

4.1.2 Solução de Ferri-ferrocianeto de potássio

A caracterização eletroquímica do eletrodo com as monocamadas auto-organizadas foi realizada em uma solução equimolar de $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$ na concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$.

4.1.3 Solução de brometo de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio

Para a modificação do eletrodo de ouro com o tiol brometo de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio foram preparadas soluções com diferentes concentrações: 1 mmol L^{-1} , 10 mmol L^{-1} e 20 mmol L^{-1} em meio etanólico.

4.1.4 Solução de 6-ferrocenil-hexanotiol

Solução etanólica de 6-(ferrocenil)hexanotiol foi preparada na concentração de 20 mmol L^{-1} para a modificação do eletrodo de ouro na formação de SAM mistas.

4.1.5 Solução de tampão acetato

A solução de tampão acetato foi preparada na concentração $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH= 4,6), e utilizada na aplicabilidade do biossensor para glicose.

4.1.6 Solução de β -D-Glicose

A solução de D-glicose $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de pH = 4,6.

4.1.7 Solução de glicose oxidase

A solução de glicose oxidase foi preparada na concentração 5 mg L⁻¹ em tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ (pH=4,6).

4.1.8 Soluções dos interferentes

Os interferentes estudados neste trabalho foram: manose, frutose, galactose, paracetamol, ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido úrico. A solução estoque para todos os interferentes foi de 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹ em tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ (pH=4,6).

4.2 Instrumentação

4.2.1 Pesagem dos reagentes

As pesagens dos reagentes foram feitas em balança analítica (Ohaus Adventurer) com precisão de dois décimo de miligrama.

4.2.2 Medidas eletroquímicas

Potenciostato/Galvanostato μ -Autolab Type III foi utilizado para as medidas eletroquímicas. A aquisição dos dados e o gerenciamento do potenciostato foram realizados por um microcomputador e pelo software GPES.

4.3 Eletrodos

4.3.1 Eletrodo de trabalho

O eletrodo de trabalho foi fabricado através da evaporação do ouro (teor de pureza 99,9%) formando uma camada de, aproximadamente, 100 nm sobre uma lâmina de vidro, delimitando uma área de 0,8 cm x 1,2 cm (0,96 cm²). A limpeza com ácido sulfúrico 0,50 mol L⁻¹ não foi necessária, visto que a fabricação do

eletrodo de trabalho foi através da metalização deste metal com alto grau de pureza sobre uma lâmina de vidro.

As lâminas de ouro foram modificadas com brometo de (11-mercaptoundecil)-*N',N'',N'''*-trimetilamônio para monocamadas formadas apenas por um tiol funcionalizado. Para SAMs mistas, a modificação foi realizada com brometo de (11-mercaptoundecil)-*N',N'',N'''*-trimetilamônio e 6-ferrocenil-hexanotiol em diferentes proporções (1:1 e 1:2).

4.3.2 Eletrodo de referência

O eletrodo de calomelano (Hg_2Cl_2) consiste de um fio de platina, uma mistura contendo mercúrio metálico (Hg^0), calomelano (Hg_2Cl_2) em uma solução de KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.3 Eletrodo auxiliar

Como eletrodo auxiliar ou contra eletrodo utilizou-se um fio de platina.

4.4 Célula eletroquímica

A célula eletroquímica constituiu de uma célula de vidro Pyrex[®] com uma camisa para o controle de temperatura, equipada com uma tampa de Teflon[®], contendo orifícios para posicionar os eletrodos: eletrodo quimicamente modificado com SAM (Eletrodo de Trabalho- ET); eletrodo de calomelano (Eletrodo de Referência- ER) e eletrodo de platina (Eletrodo Auxiliar- EA). A célula eletroquímica está representada pela Figura 3.

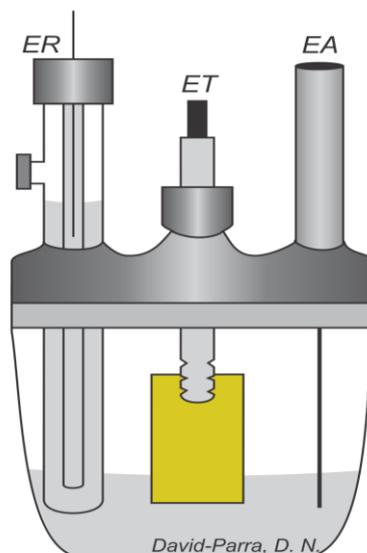


Figura 3: Representação da célula eletroquímica, onde EA: Eletrodo de platina; ET: Eletrodo modificado com monocamadas auto-organizadas e ER: Eletrodo de Calomelano ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

4.5 Estudo da modificação do eletrodo de ouro

4.5.1 Preparação dos eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas sobre o eletrodo de ouro

4.5.1.1 Monocamadas formadas com brometo de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio

A adsorção das moléculas do tiol funcionalizado (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio foi realizada através da imersão do eletrodo de ouro em uma solução etanólica deste tiol. As moléculas fisicamente adsorvidas foram removidas por lavagem da superfície com etanol e água deionizada.

A escolha da concentração mais adequada do alcanotiol a ser utilizada foi determinada variando-a: $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, 10 mmol L^{-1} e 20 mmol L^{-1} , e realizando-se a técnica de voltametria cíclica em uma solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,50 \text{ mol L}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio, aplicando uma velocidade de varredura de potenciais de 25 mV s^{-1} . A reversibilidade dos processos eletroquímicos foi verificada através da dependência linear dos valores de corrente pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, ou seja, $I_p \propto v^{1/2}$ [97-99].

O tempo de modificação do eletrodo de ouro em uma solução etanólica do tiol foi determinado variando-se o mesmo em: 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos, 360 minutos, 720 minutos e 1440 minutos. As medidas eletroquímicas foram realizadas através da voltametria cíclica em uma solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio, verificando o comportamento eletroquímico através dos valores de magnitude de corrente para os diferentes tempos estudados.

4.5.1.2 Monocamadas formadas com brometo de (11-mercaptoundecil)-N',N'',N'''-trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol

Para a formação das monocamadas mistas foram utilizados os parâmetros experimentais otimizados na formação de SAM com apenas o tiol brometo de 11-mercaptoundecil-N',N'',N'''-trimetilamônio.

Inicialmente, a formação das monocamadas foram realizadas em solução etanólica equimolar de brometo de (11-mercaptoundecil)-N',N'',N'''-trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:1). Um segundo estudo foi realizado para monocamadas formadas em 10 mmol L^{-1} $C_{14}H_{32}BrNS$ e 20 mmol L^{-1} $C_{16}H_{22}FeS$ (proporção 1:2, respectivamente). O período de modificação do eletrodo de ouro foi de 1 hora.

4.6 Caracterização das SAM

4.6.1 Caracterização eletroquímica

Os eletrodos modificados foram submetidos à varredura cíclica de potenciais para a determinação dos potenciais de oxi-redução e da reversibilidade dos mesmos. O estudo da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta eletroquímica do eletrodo modificado foi realizado em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, através da técnica de voltametria cíclica, com janela de potencial $-0,3 \text{ V}$ a $0,8 \text{ V}$ vs. EC, com o intuito de verificar o mecanismo de transferência eletrônica e determinar a concentração do tiol ativo na superfície do eletrodo.

4.6.1.1 Estudo do tempo de pré-concentração com ferricianeto de potássio sobre o eletrodo quimicamente modificado

Para verificar a viabilidade da molécula de hexacianoferrato como mediador da transferência de elétrons para posterior construção de um biossensor, foi realizada a pré-concentração por troca iônica realizada entre esta molécula com o tiol funcionalizado adsorvido na superfície do ouro (60, 120 e 360 minutos). A técnica utilizada para este estudo foi a voltametria cíclica de varredura na faixa de potencial compreendida entre -0,5 V a 0,8 V vs. EC, variando-se a velocidade de varredura entre 5 e 225 mV s⁻¹.

4.6.2 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura

As imagens das monocamadas auto-organizadas com tióis funcionalizados sobre a superfície de ouro foram obtidas através de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Carl Zeiss modelo EVO LS15 equipado com detector de elétrons secundários (SE) em alto vácuo e temperatura constante.

4.7 Método de adição múltipla de padrão para detecção de glicose

A imobilização da enzima glicose oxidase sobre o eletrodo de ouro foi realizada através da adsorção de uma alíquota de 50 µL da glicose oxidase (*Aspergillus niger*) com concentração de 5 mg L⁻¹ em tampão acetato 0,10 mol L⁻¹, pH=4,6.

A viabilidade da aplicação do eletrodo modificado com SAM como biossensor foi verificada pela técnica de voltametria cíclica através de adições sucessivas de uma solução padrão de 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹ D-glicose. O intervalo de concentração estudado foi de 5,0 µmol L⁻¹ a 1,6 mmol L⁻¹. O cálculo do limite de detecção, sensibilidade e a estabilidade da ligação enzima-substrato (constante de Michaelis-Menten) foram calculados através das respostas eletroanalíticas, valores de magnitude de corrente, quando adicionadas as alíquotas de D-glicose.

A técnica de amperometria no potencial de 0,06 V também foi utilizada para detecção de glicose, verificando a eficiência do biossensor de 2ª geração. O estudo foi realizado em tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ (pH=4,6) com tempo de estabilização

de 20 minutos. As sucessivas adições de glicose foram no intervalo de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$.

4.8 Estudo dos interferentes na determinação de glicose

O estudo dos interferentes foi realizado em uma solução de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de β -D-glicose em tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{pH} = 4,6$. Adicionou-se uma alíquota de $250 \mu\text{L}$ da solução estoque $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ dos seguintes interferentes: paracetamol, ácido úrico, ácido cítrico, ácido ascórbico, manose, frutose, galactose. A técnica utilizada para a visualização da possível interferência destes compostos na determinação do analito em interesse, a glicose, foi voltametria cíclica com varredura de potenciais entre $-0,5$ e $0,8 \text{ V}$ a uma velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} na presença de oxigênio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Monocamadas formadas por (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio

5.1.1 Efeito da concentração do tiol funcionalizado

O estudo da melhor concentração do tiol funcionalizado (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio foi realizado a fim de garantir o melhor empacotamento e auto-organização das monocamadas.

O comportamento eletroquímico foi representado na Figura 4 pela técnica de voltametria cíclica em solução aquosa de hexacianoferrato de potássio. A variação de potencial não foi significativa para as diferentes concentrações, entretanto, as correntes anódicas e catódicas apresentaram um incremento com o aumento da concentração do tiol. Os potenciais dos picos anódicos e catódicos para as concentrações utilizadas na formação das monocamadas foram, aproximadamente, $0,272 \text{ V}$ (pico de oxidação de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) e $0,144 \text{ V}$ (pico de redução $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$), respectivamente. A Tabela 2 apresenta os valores de corrente de pico e os potenciais redox para as três concentrações de tiol estudadas.

Tabela 2: Valores de potencial e corrente de pico dos voltamogramas cíclicos para as diferentes concentrações da solução etanólica de (11-mercaptoundecil)-*N',N'',N'''*-trimetilamônio.

Concentração (mmol L ⁻¹)	<i>E</i> _{PA} (V) vs. EC	<i>E</i> _{PC} (V) vs. EC	ΔE vs. EC	<i>I</i> _{pa} (mA)	<i>I</i> _{pc} (mA)
1	0,272	0,144	0,128	1,981	-2,001
10	0,272	0,140	0,132	2,194	-2,127
20	0,271	0,144	0,127	2,932	-2,314

* Elaborada pelo autor, a partir de dados básicos da pesquisa.

A avaliação das concentrações do tiol (Tabela 2 e Figura 4), através da voltametria cíclica do eletrodo de ouro quimicamente modificado por monocamadas auto-organizadas, foi mais significativa para 20 mmol L⁻¹, apresentando maior incremento de corrente de oxidação e redução do par redox Fe²⁺/Fe³⁺ do complexo hexacianoferrato.

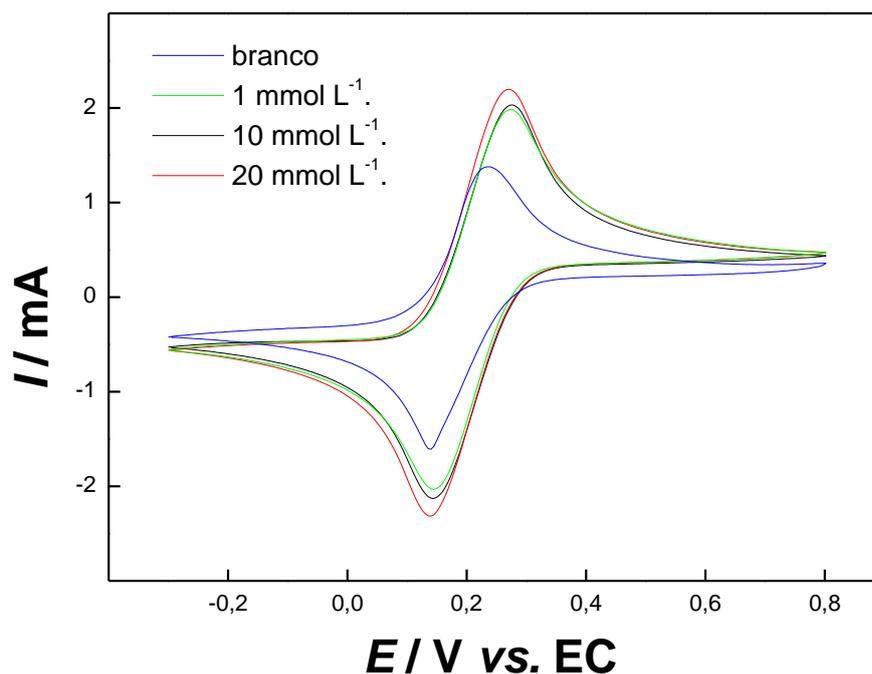


Figura 4: Voltamogramas cíclicos para o eletrodo de ouro modificado com diferentes concentrações de tiol (1 mmol L⁻¹, 10 mmol L⁻¹ e 20 mmol L⁻¹). As determinações foram feitas a 25 mV s⁻¹ em 1,0 mmol L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆]/K₄Fe(CN)₆ em KCl 0,5 mol L⁻¹, aplicando a janela de potencial de -0,3 a 0,8 V.

5.1.2 Efeito do tempo de imersão

Para a formação das SAM foi também investigado o melhor tempo de imersão do eletrodo de ouro em solução de alcanotiol (20 mmol L⁻¹). Os tempos de

imersão empregados para esse estudo foram: 30 min, 60 min, 120 min, 240 min e 1440 min. Os valores de correntes e potenciais de picos redox, obtidos por voltametria cíclica em velocidade de varredura de potencial de 25 mV s^{-1} , em função do tempo de imersão do eletrodo em solução contendo tiol, estão ilustrados nas Figuras 5 e 6.

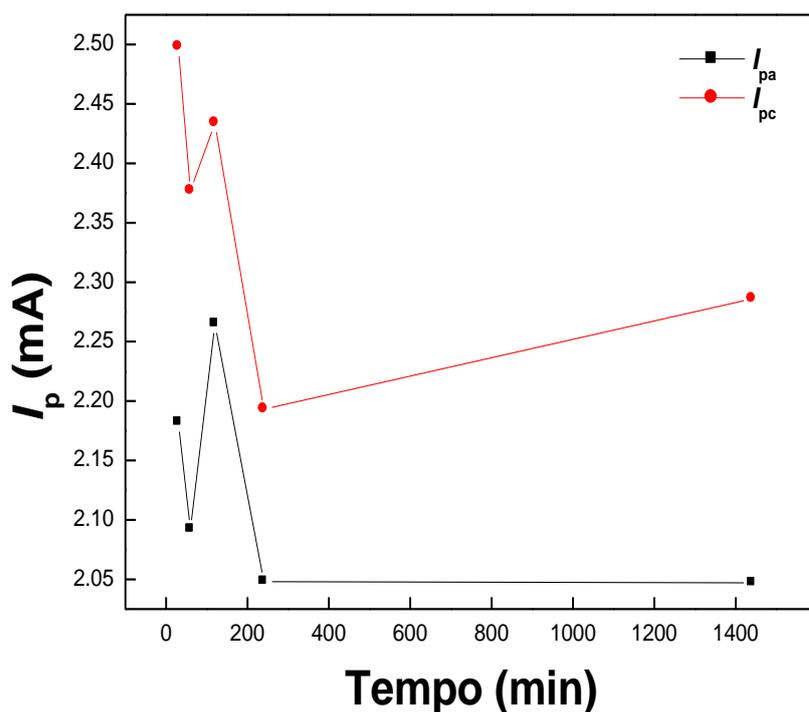


Figura 5: Variação de valores de corrente de pico anódica e catódica com o tempo de imersão do eletrodo de ouro na solução de alcanotiol a 20 mmol L^{-1} . Valores de corrente de pico obtidos em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

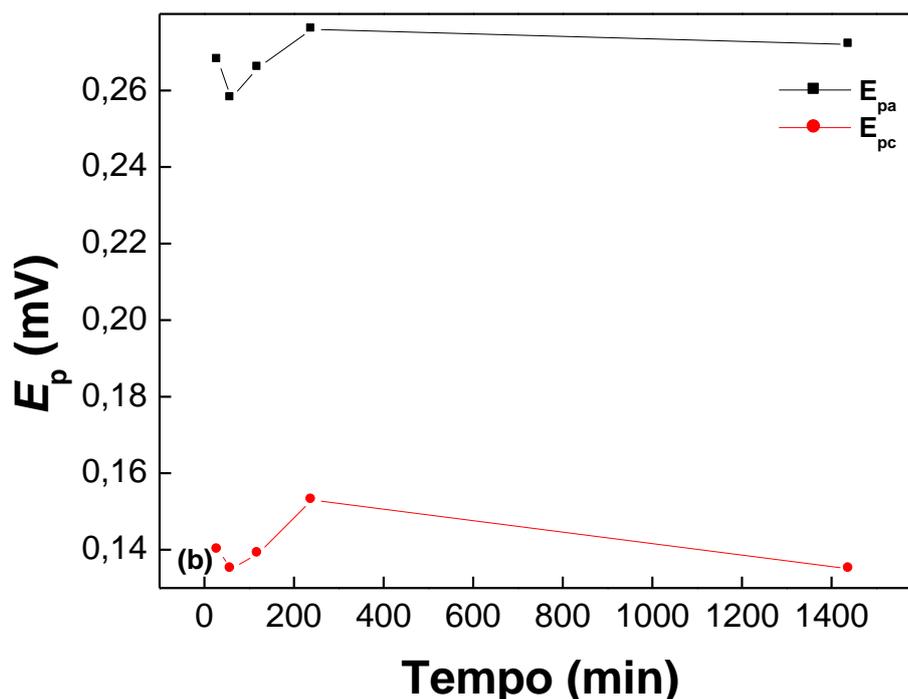


Figura 6: Variação de valores de potenciais de pico anódico e catódico em função do tempo de imersão do eletrodo de ouro na solução de alcanotiol a 20 mmol L^{-1} . Valores de corrente de pico obtidos em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Não foram observadas diferenças significativas nos valores dos potenciais de picos e nos valores das correntes anódicas e catódicas. Logo, o tempo de 60 minutos foi selecionado para a formação das monocamadas, por apresentar magnitude de corrente satisfatória para a formação das mesmas. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para o estudo do tempo de imersão para a formação de monocamadas de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' trimetilamônio.

Tabela 3: Valores de potenciais e correntes de pico obtidos em função do aumento do período do tempo de imersão do eletrodo de ouro em (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio.

Tempo (min)	E_{PA} (V)*	E_{PC} (V)*	ΔE (V)	I_{PA} (mA)	I_{PC} (mA)
30	0,268	0,140	0,128	2,182	2,498
60	0,258	0,135	0,123	2,092	2,377
120	0,266	0,139	0,128	2,265	2,434
240	0,276	0,153	0,123	2,048	2,193
1440	0,272	0,135	0,137	2,047	2,286

*vs. EC (Elaborada pelo autor através de dados básicos da pesquisa).

5.1.3 Estudo da velocidade de varredura em solução de hexacianoferrato (II) e (III) de potássio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

O efeito da velocidade de varredura de potenciais (5 a 175 mV s^{-1}) sobre a resposta voltamétrica do eletrodo modificado com monocamadas de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio foi investigada em uma solução de ferroferricianeto de potássio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 7). Analisando-se os voltamogramas cíclicos constatou-se que o aumento da velocidade de varredura houve um aumento da separação dos potenciais das correntes de pico redox.

A Tabela 4 apresenta os valores dos potenciais de pico anódico e catódico com os respectivos valores de corrente obtidos nos voltamogramas cíclicos mostrados na Figura 7. O estudo do mecanismo de transferência eletrônica foi realizado através do logaritmo dos valores de correntes de pico anódico em função do logaritmo das velocidades de varredura (Figura 8).

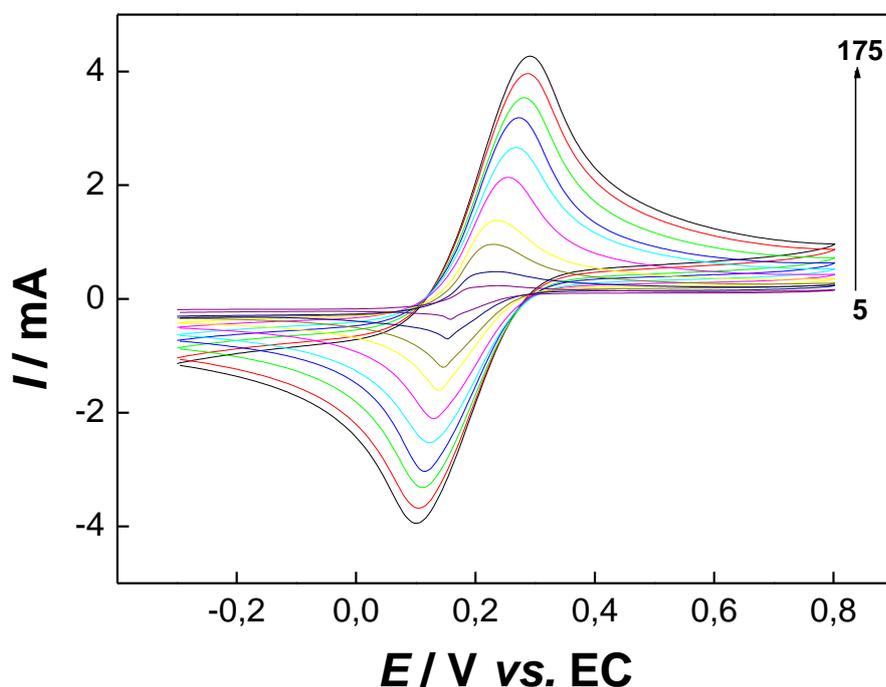


Figura 7: Estudo da influência da velocidade de varredura em um eletrodo modificado com SAM de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio. As análises foram realizadas em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ em janela de potencial de $-0,3$ a $0,8 \text{ V}$.

Tabela 4- Valores de potenciais, variação do potencial e correntes de pico para os picos anódicos e catódicos apresentados na Figura 7.

Velocidade (mV s ⁻¹)	E _{PA} (V)*	E _{PC} (V)*	ΔE (V)*	I _{PA} (mA)	I _{PC} (mA)
5	0,24	0,16	0,080	0,235	-0,359
10	0,24	0,15	0,085	0,480	-0,697
15	0,24	0,14	0,082	0,964	-1,199
25	0,25	0,14	0,094	1,379	-1,607
50	0,25	0,13	0,123	2,140	-2,108
75	0,26	0,12	0,147	2,664	-2,527
100	0,27	0,11	0,156	3,194	-3,031
125	0,28	0,11	0,170	3,553	-3,322
150	0,29	0,11	0,180	3,963	-3,684
175	0,29	0,10	0,189	4,272	-3,952

*vs. EC (Elaborada pelo autor através de dos básicos da pesquisa).

A Figura 8 apresenta o gráfico do $\log I$ vs. $\log v$ das correlações lineares obtidas a partir de estudo realizado em meio de hexacianoferrato de potássio em velocidades de varredura entre 5 e 175 mV s⁻¹ para eletrodos modificados com o tiol funcionalizado (11-mercaptoundecil)-N',N',N'''-trimetilamônio. Para esse estudo considerou-se coeficiente de correlação com valores próximo a 0,990 na obtenção de linearidade em intervalos definidos de velocidades de varredura.

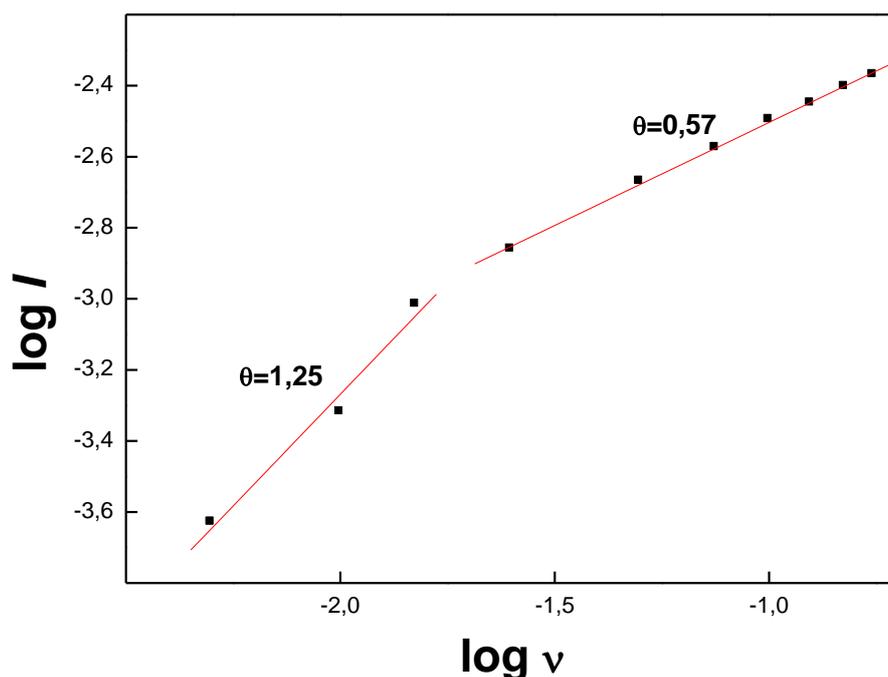


Figura 8: Representação do processo de transferência eletrônica do tipo misto (adsortivo e difusional) através do logaritmo das correntes de pico anódica pelo logaritmo da variação da velocidade de varredura.

Verificou-se como a transferência eletrônica opera por processo adsortivo em determinados intervalos de velocidades de varredura (5 a 15 mV s^{-1}) nos eletrodos modificados com (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' trimetilamônio. A determinação de processo adsortivo diretamente na superfície do eletrodo correlaciona coeficiente angular θ tendendo a 1 em gráfico $\log I$ vs. $\log v$ e coeficientes angulares tendendo a 0,5 apontam para controle de processo mediado por controle difusional de espécies eletroativas. A difusão foi observada para velocidades iguais ou superiores a 25 mV s^{-1} [100, 101].

A Figura 9 mostra o gráfico de potencial de pico pelo logaritmo das velocidades de varredura, tornando possível o cálculo da constante de transferência eletrônica calculado neste trabalho.

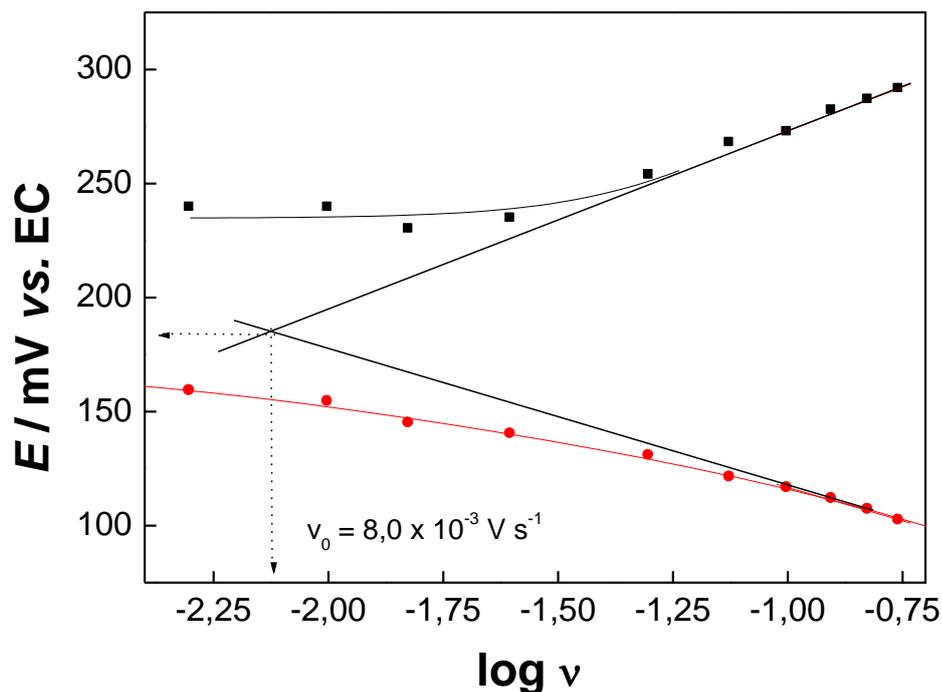


Figura 9: Estudo da varredura de potencial pela variação do logaritmo da velocidade de varredura em monocamadas de tiol funcionalizado em eletrodo de ouro.

Os coeficientes de transferência eletrônica (α_a) e a constante aparente de velocidade de transferência eletrônica (k_e) foram calculados pelo diagrama de Tafel de acordo com o método descrito por Laviron [102]. Para altos valores de velocidade de varredura ($>50 \times 10^{-3} \text{ V s}^{-1}$), a dependência do potencial de pico em função do *logaritmo* velocidade de varredura torna-se linear, e a partir desta relação é possível determinar os coeficientes de transferência eletrônica pelo coeficiente angular da reta [102, 103].

A constante aparente de transferência eletrônica é dada pela Equação 04:

$$k_e = \frac{2,303\alpha n F v_0}{RT} \quad (04)$$

R , n , F e T representam a *Constante dos Gases* ($8,314 \text{ V C mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), número de elétrons envolvidos no processo (1 elétron), *Constante de Faraday* ($96485,4 \text{ C mol}^{-1} \text{ e}^-$) e temperatura absoluta (298 K), respectivamente. Através da intersecção da extrapolação da parte linear anódica e catódica na Figura 9 é possível se obter v_0 igual a $8,0 \times 10^{-3} \text{ V s}^{-1}$. O coeficiente de transferência eletrônica α (0,23) foi calculado através da Equação 05.

A Equação 05 é representada por:

$$\text{coef. angular} = \frac{2,303RT}{(1-\alpha)nF} \quad (05)$$

O valor da constante de transferência eletrônica, k_e , obtido experimentalmente foi igual a $0,16 \text{ s}^{-1}$. Este valor apresentou-se maior quando comparado aos valores de constante de transferência eletrônica em monocamadas auto-organizadas na literatura [104]. A Tabela 5 relata valores de constantes de transferência eletrônica encontradas na literatura. O elevado valor da constante de transferência eletrônica aparente, apresentada pelas SAMs de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio, foi atribuído a interação do grupo terminal (amina quaternária) desta molécula com as moléculas de hexacianoferrato favorecendo o transporte eficiente de elétrons, através do efeito do contra-íon (K^+).

Tabela 5: Valores das constantes de transferência eletrônica das monocamadas de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e valores das constantes encontradas na literatura [104].

Tiol	$k_e \text{ (s}^{-1}\text{)}$	Ref.
Ácido mercaptopropiônico (3-mpa)	$9,9 \times 10^{-3}$	[104]
Ácido lipóico (ALP)	$7,4 \times 10^{-3}$	[104]
Ácido mercaptoundecanóico (11-amu)	$4,1 \times 10^{-5}$	[105]
Octanotiol	$1,6 \times 10^{-2}$	[106]
9 - (Fenildiazenil) fenoxi nonano-1-tiol (ANT) e Nonanetiol (NT) e fotoinduzida cis-trans conformação de azobenzeno	$1,0 \times 10^{-4}$	[107]
1-Octadecanotiol	$2,6 \times 10^{-7}$	[108]
Tetradecanotiol	$2,0 \times 10^{-5}$	[109]
(11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio	$1,6 \times 10^{-1}$	*

* Elaborada pelo autor, a partir de dos dados básicos da pesquisa.

5.1.4 Estudo da velocidade de varredura no eletrodo de ouro quimicamente modificado com SAM formadas por (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio pré-concentradas como mediador eletrônico hexacianoferrato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$

Após o estudo cinético do eletrodo modificado, em solução de ferro-ferricianeto de potássio, foi realizada a imobilização do íon hexacianoferrato por troca-iônica, a fim de verificar a eficácia desta molécula como mediador de elétrons na superfície do ouro modificado.

A caracterização eletroquímica foi realizada em dois diferentes tempos de pré-concentração com hexacianoferrato: 1 hora e 2 horas, verificando desta forma, a melhor transferência eletrônica. O tiol funcionalizado em estudo apresenta no seu grupo terminal uma amina quaternária carregada positivamente, o que demonstra que a troca iônica ocorreu entre três moléculas do tiol e uma molécula de hexacianoferrato (Figura 10), desfavorecendo o surgimento de “*pinholes*” (defeitos), o qual torna exequível o processo de transferência eletrônica, contribuindo, portanto para ocorrência do efeito eletrocatalítico.

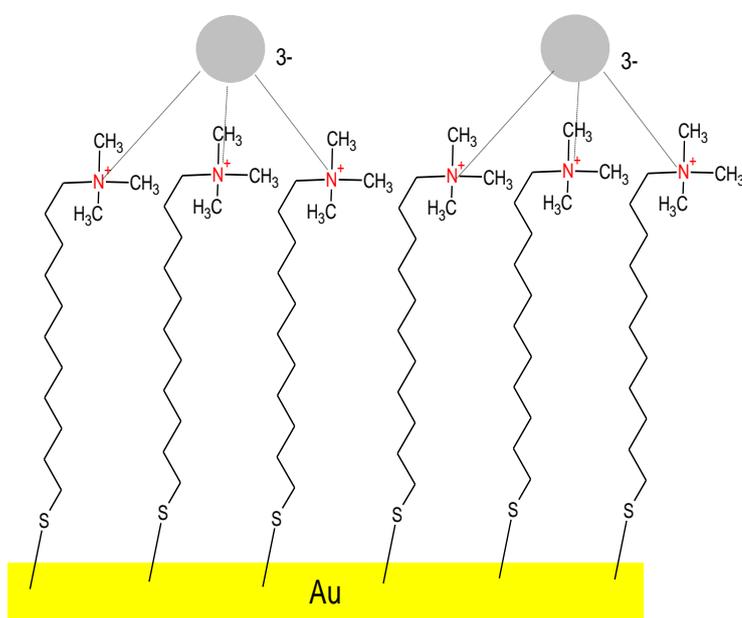


Figura 10: Representação esquemática do estudo de pré-concentração com $\text{Fe}[\text{CN}]_6^{3-}(\text{aq})$ (●³⁻) em SAM de (11- mercaptopundecil)-*N,N,N',N'',N'''*-trimetilamônio. **Fonte:** Elaborada pelo autor, a partir de dos básicos da pesquisa.

O comportamento eletroquímico para SAM contendo $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{3-}$ apresentou semelhança, quando aplicado os períodos de 1 hora e 2 horas de tempo de pré-concentração. O potencial do par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ do hexacianoferrato localizou-se próximo a 0,18V e 0,16V, respectivamente (Figura 11 e 12).

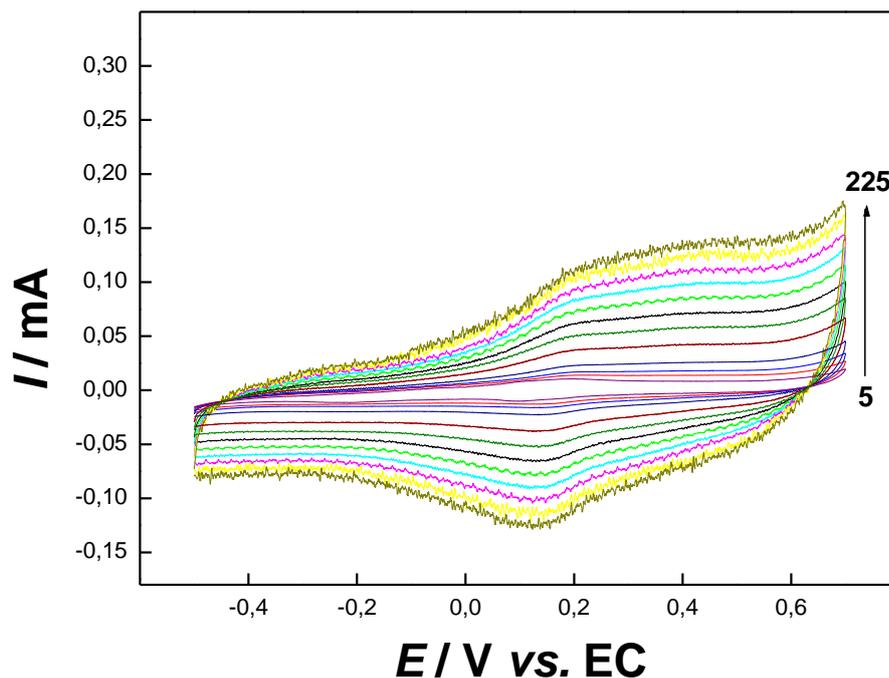


Figura 11: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio, pré-concentrado em ferricianeto de potássio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ durante 1 hora em cloreto de potássio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$.

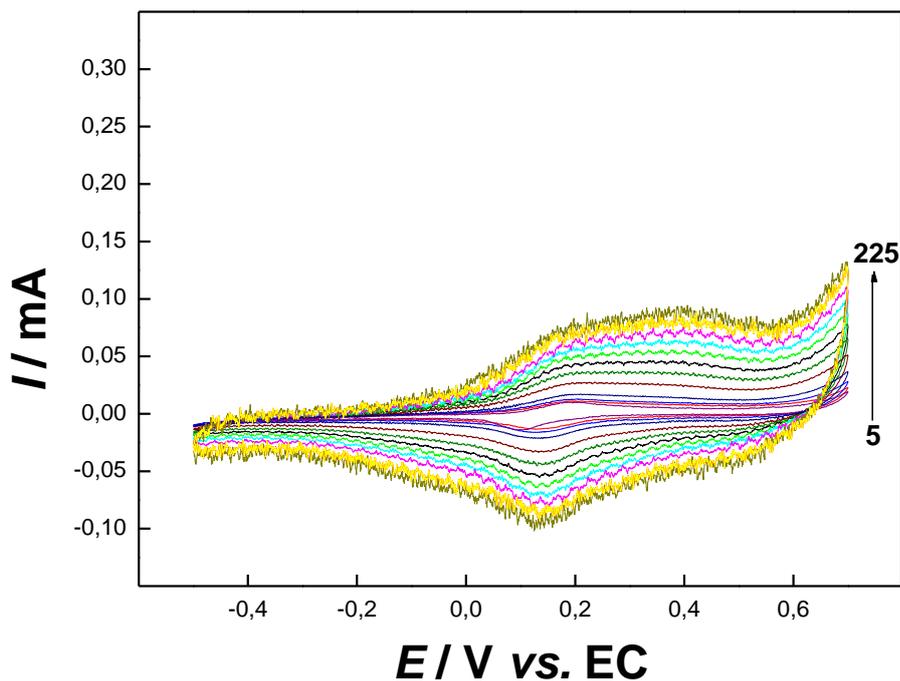


Figura 12: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio, pré-concentrado em ferricianeto de potássio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ durante 2 horas em cloreto de potássio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$.

As correlações lineares, apresentadas nas Figuras 13 e 14, demonstram que o processo de transferência eletrônica é controlado por mecanismo adsorptivos que ocorrem diretamente na superfície eletródica.

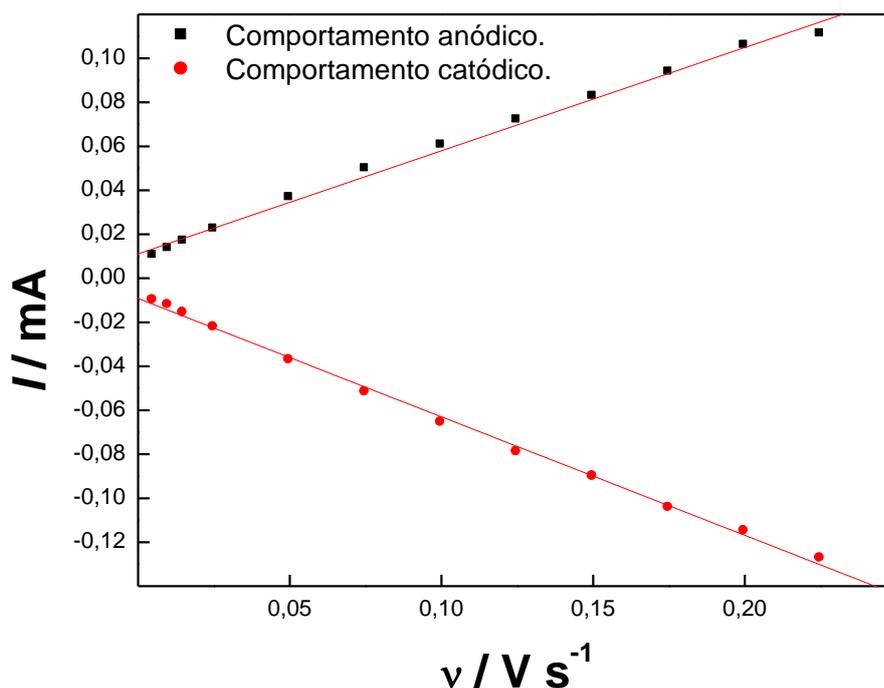


Figura 13: Dependência das correntes de picos em função da velocidade de varredura de potenciais para o par redox Fe³⁺/Fe²⁺ em SAM formadas com (11- mercaptoundecil)-N',N'',N''' trimetilamônio e pré-concentrados durante 1 hora com K₃[Fe(CN)₆].

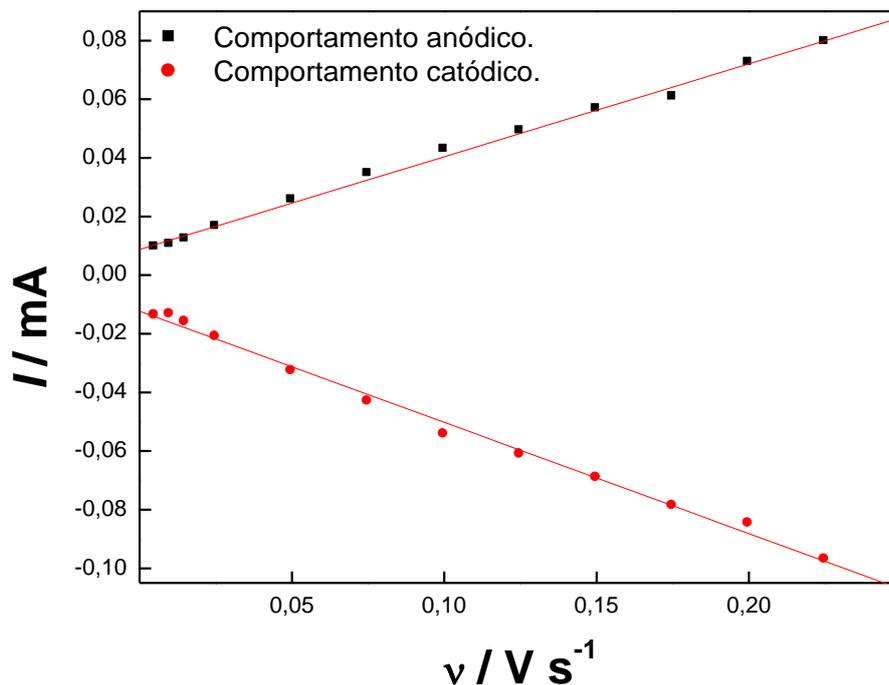


Figura 14: Dependência das correntes de picos em função da velocidade de varredura de potenciais para o par redox Fe³⁺/Fe²⁺ em SAM formadas com (11- mercaptoundecil)-N',N'',N''' trimetilamônio e pré-concentrados durante 2 horas com K₃[Fe(CN)₆].

A transferência eletrônica ocorreu-se entre as moléculas de [Fe(CN)₆]³⁻ imobilizadas sobre a superfície do eletrodo de ouro modificada com monocamadas auto-organizadas de (11-mercaptoundecil)-N',N'',N''' trimetilamônio. Para processos

adsortivos, a concentração de espécie eletroativa (Γ) das monocamadas auto-organizadas sobre a superfície do eletrodo, foi calculada a partir do declive linear da relação de corrente de pico em função da velocidade de varredura, representado pela Equação 06 [98]:

$$I_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} A \Gamma v \quad (06)$$

onde I_p é a corrente de pico (A), n o número de elétrons ($n=1$), F constante de Faraday (96485,4 C mol⁻¹ e⁻), A área da superfície do eletrodo (0,96 cm²), Γ a concentração das espécies eletroativas (mol cm⁻²), R a constante dos gases (8,314 C K⁻¹ mol⁻¹), T temperatura (298K), e v a velocidade de varredura (V s⁻¹).

A pré-concentração durante o período de 60 minutos apresentou maior valor de cobertura da superfície, Γ igual a $1,56 \times 10^{-9}$ mol cm⁻², quando comparada com o estudo realizado em 120 minutos ($\Gamma=1,05 \times 10^{-9}$ mol cm⁻²). Os baixos valores de concentrações eletroativas corroboram com valores encontrados na literatura [104, 110].

5.2 Formação e caracterização de monocamadas auto-organizadas mistas (SAM mistas)

A auto-organização das moléculas de diferentes tióis sobre o substrato de ouro é influenciada por interações de Van der Waals entre os grupos metílenos da cadeia carbônica, possibilitando segregação de fases. A estabilidade das SAMs está diretamente ligada à quantidade destes grupos, uma vez que, quanto maior a cadeia carbônica, maiores as interações entre as moléculas de mesma identidade química [48, 111, 112]. A formação de diferentes domínios é factível através da formação de monocamadas com distintos adsorbatos, permitindo uma ampla variedade de composições estruturais [113]. Portanto, o critério de seleção para a escolha dos tióis funcionalizados foi o tamanho da cadeia carbônica, bem como suas diferenças estruturais (tamanho da cadeia carbônica principal e diferentes grupos terminais), a fim de assegurar uma modificação efetiva do eletrodo para o desenvolvimento de sensores químicos.

As monocamadas mistas foram formadas com (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol sobre a superfície de ouro. O grupo terminal ferroceno é capaz de sofrer oxidação reversível através da geração

de um cátion-radical como ilustrado na Figura 15, portanto são utilizados como mediadores de elétrons [22, 49, 114, 115].

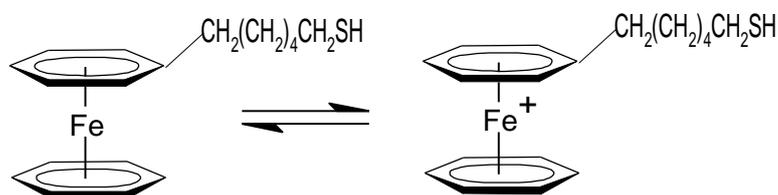


Figura 15: Representação esquemática da oxidação do 6-(ferrocenil)hexanotiol.

A caracterização dos eletrodos quimicamente modificados com SAM mista é imprescindível, uma vez que a mesma fornece informações sobre transferência eletrônica de espécies redox, o grau de recobrimento, o excesso superficial, entre outras propriedades.

O estudo do efeito da concentração dos tióis de interesse para a formação de monocamadas mistas, foi realizado frente a espécies redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, visto que, o grau de interação destas moléculas é controlado por suas propriedades físicas e químicas, pela organização e pela presença de irregularidades nas SAM [116, 117].

O estudo eletroquímico foi realizado a fim de verificar a influência do aumento da concentração do tiol com menor cadeia carbônica sobre a transferência eletrônica. O mecanismo de transporte de elétrons está relacionado com a não formação de “*pinholes*” (defeitos), uma vez que o mesmo é realizado através de túneis [110].

A auto-organização das monocamadas mistas, formadas por soluções equimolares de (11-mercaptoundecil)-*N',N'',N'''*-trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (proporção 1:1), está esquematicamente representada nas Figuras 16 e Figura 17 (proporção 1:2). O esquema foi elaborado de acordo com a descrição da formação de monocamadas evidenciada na literatura, portanto a formação e a auto-organização são representadas hipoteticamente por essas Figuras [22, 48, 111, 113, 117].

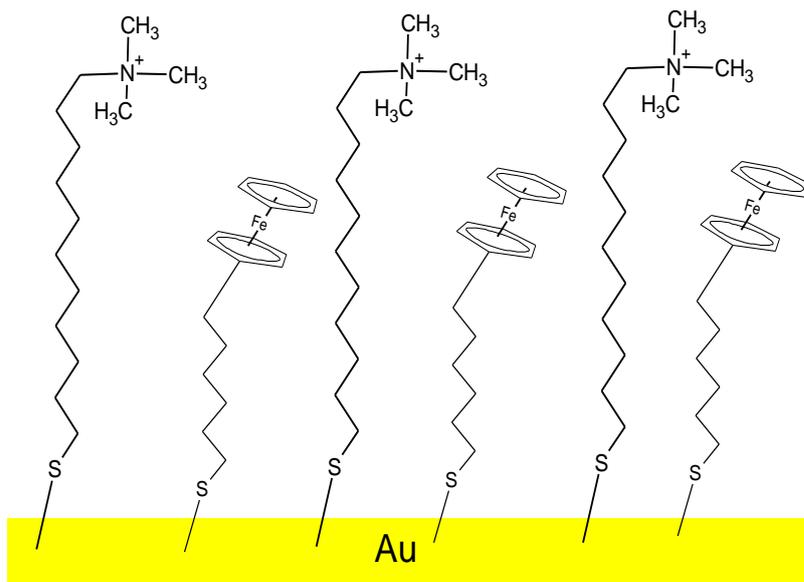


Figura 16: Representação esquemática de monocamadas auto-organizadas mistas de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (proporção 1:1, respectivamente). **Fonte:** Elaborada pelo autor, a partir de dos básicos da pesquisa.

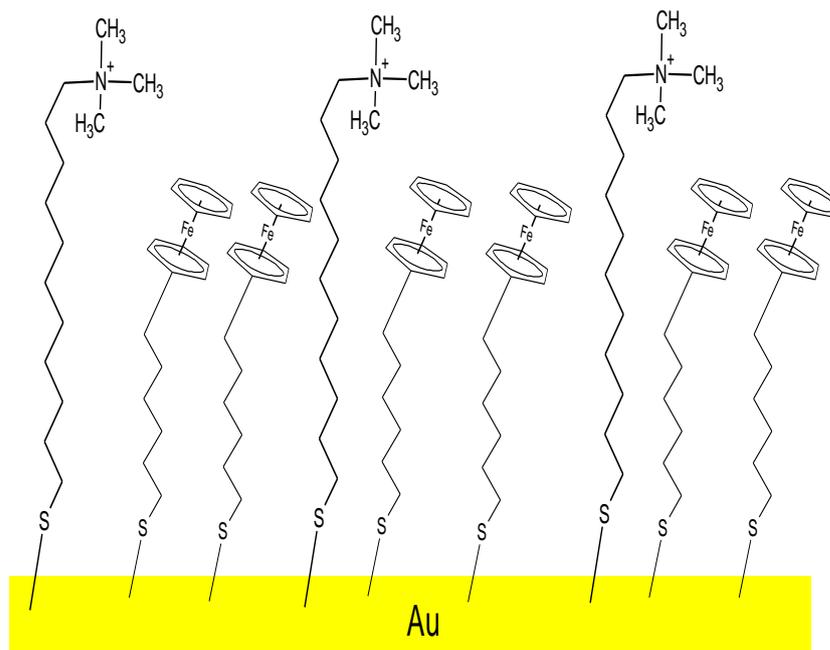


Figura 17: Representação esquemática de monocamadas auto-organizadas mistas de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (proporção 1:2, respectivamente). **Fonte:** Elaborada pelo autor, a partir de dos básicos da pesquisa.

5.2.1 Estudo da velocidade de varredura em solução de hexacianoferrato (II) e (III) de potássio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Os estudos voltamétricos iniciais para o eletrodo quimicamente modificado com SAM mistas foram realizados em ferri-ferrocianeto de potássio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em

solução aquosa de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 18 e 19), no intervalo de potencial entre $-0,50\text{V}$ e $0,80\text{V}$ vs. EC.

O perfil eletroquímico para monocamadas mistas apresentou-se altamente resistivos, uma vez que voltamogramas cíclicos exibiram perfis inclinados e estreitos. O efeito electrocatalítico foi evidenciado com o aumento do sinal analítico tanto anódico quanto catódico. O par redox apresentado pelas monocamadas mistas é correspondente aos pares redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (oxidação) e $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (redução).

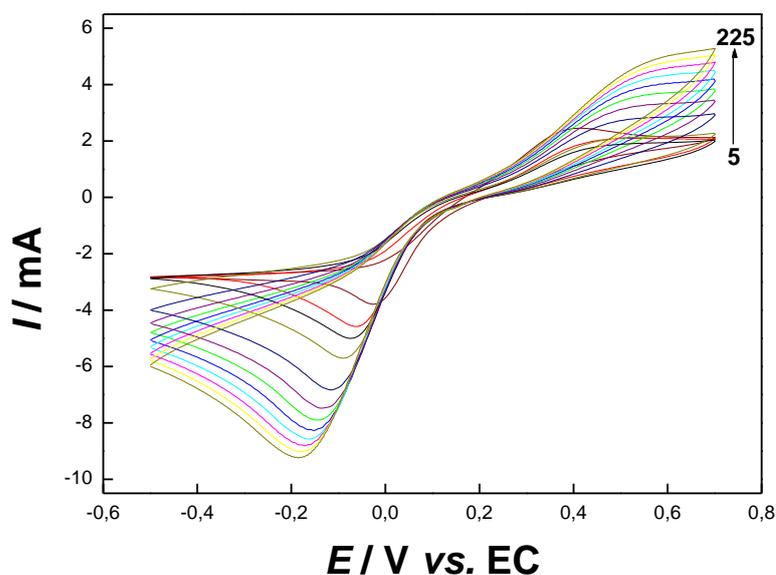


Figura 18: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol na proporção (1:1) em solução de hexacianoferrato (II) e (III) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

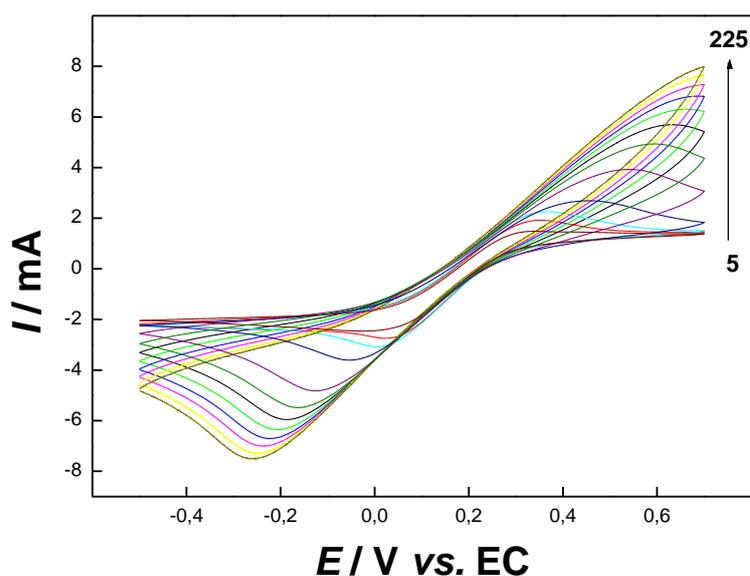


Figura 19: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol na proporção (1:2) em solução de hexacianoferrato (II) e (III) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

O estudo do logaritmo da corrente em função do logaritmo da velocidade de varredura foi realizado através dos valores de magnitudes de correntes anódicas dos voltamogramas cíclicos das Figuras 18 e 19. Pode-se notar a dependência linear do $\log I$ versus $\log v$ (Figuras 20 e 21). Para SAMs mistas (1:1), esta linearidade foi observada para valores de velocidades de varreduras iguais ou superiores a 15 mV s^{-1} , apresentando coeficientes angulares iguais a 0,38.

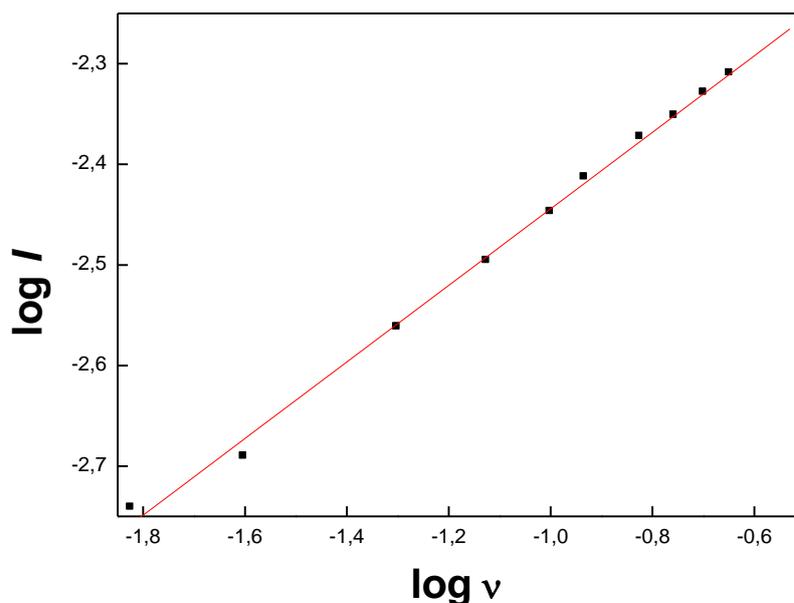


Figura 20: Estudo do comportamento de transferência eletrônica através dos valores do logaritmo das correntes anódicas e catódicas em função do logaritmo das velocidades de varredura, em monocamadas mistas (1:1) em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ em $\text{KCl } 0,50 \text{ mol L}^{-1}$.

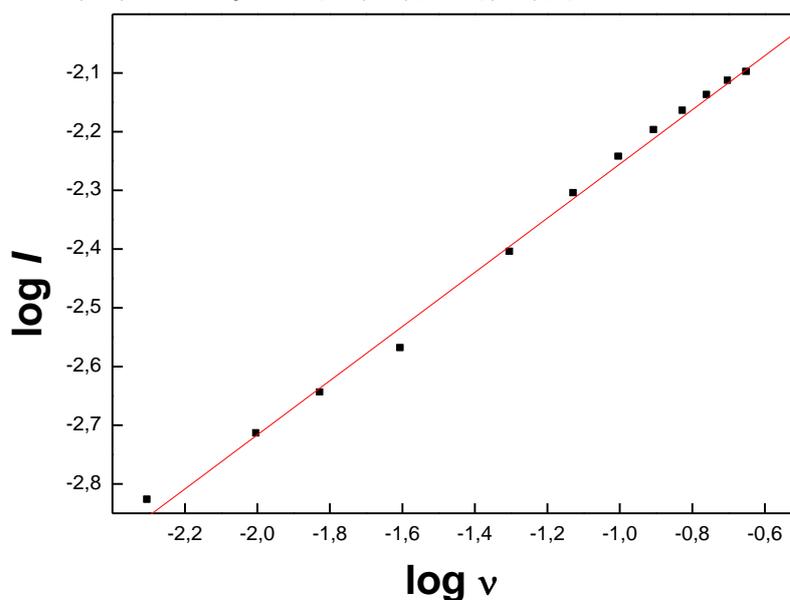


Figura 21: Estudo do comportamento de transferência eletrônica através dos valores do logaritmo das correntes anódicas e catódicas em função do logaritmo das velocidades de varredura, em monocamadas mistas (1:2) em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ em $\text{KCl } 0,50 \text{ mol L}^{-1}$.

Nas SAMs mistas (1:2), como observado na Figura 21, a linearidade foi evidenciada de no intervalo de velocidade de varredura de 5 a 225 mV s^{-1} , e coeficiente angular igual a 0,46, para $\log I$ versus $\log v$.

Os valores de coeficientes angulares próximos a 0,50 confirmam que o processo de transferência eletrônica para as monocamadas mistas em solução de hexacianoferrato (II) e (III) é controlado difusionalmente [93, 94].

Os coeficientes de transferência eletrônica anódico (α_a) e a constante aparente de transferência eletrônica (k_e) foram calculados pelo diagrama de Tafel de acordo com o método descrito por Laviron [102, 118], como citado na sessão 5.1.3. Para velocidades de varredura superiores a 50 mV s^{-1} , a dependência do potencial de pico torna-se linear com o logaritmo da velocidade de varredura e, a partir desta relação é possível determinar os coeficientes de transferência de elétrons pela inclinação angular das retas, Equação. 5:

$$\text{coeficiente angular} = \frac{2,303 R T}{(1 - \alpha)n F} \quad (05)$$

onde R , T , F e n representam a constante dos gases ($8,314 \text{ C V K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), temperatura ambiente (298 K), constante de Faraday ($96 485,4 \text{ C mol}^{-1} \text{ e}^{-}$) e o número de elétrons envolvidos no processo redox, respectivamente.

As Figuras 22 e 23 apresentam a dependência dos potenciais de picos anódicos em função do logaritmo da velocidade de varredura. Considerando-se que o número de elétrons envolvidos no processo seja igual a 1, obtém-se os coeficientes de transferência eletrônica anódicos para as monocamadas mistas formadas sobre o eletrodo de ouro nas proporções (1:1) e (1:2), iguais a 0,48 e 0,69, respectivamente.

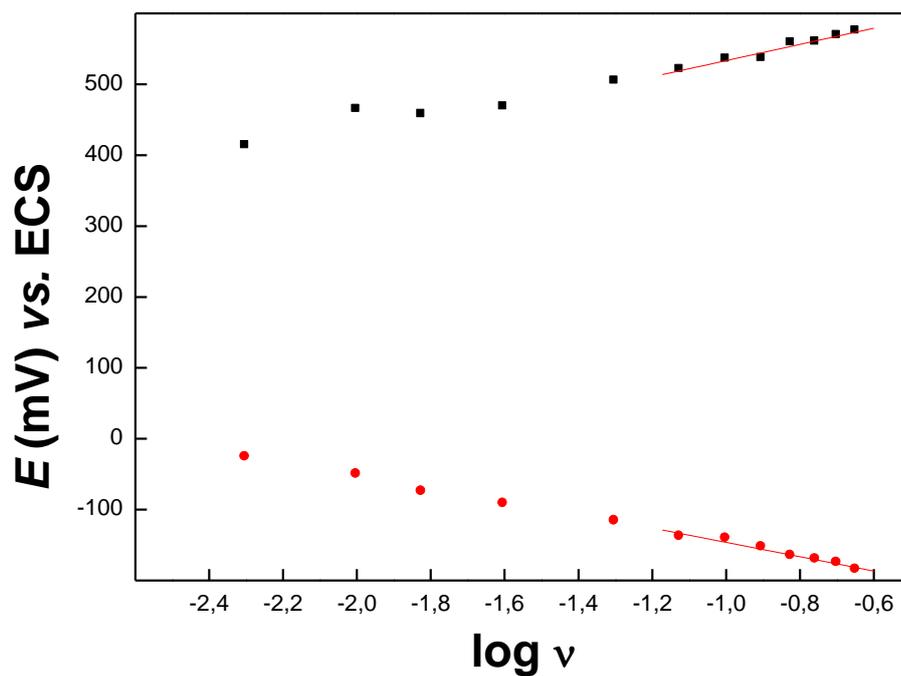


Figura 22: Estudo da varredura de potenciais pela variação do logaritmo da velocidade de varredura para eletrodos modificados com monocamadas mistas (1:1).

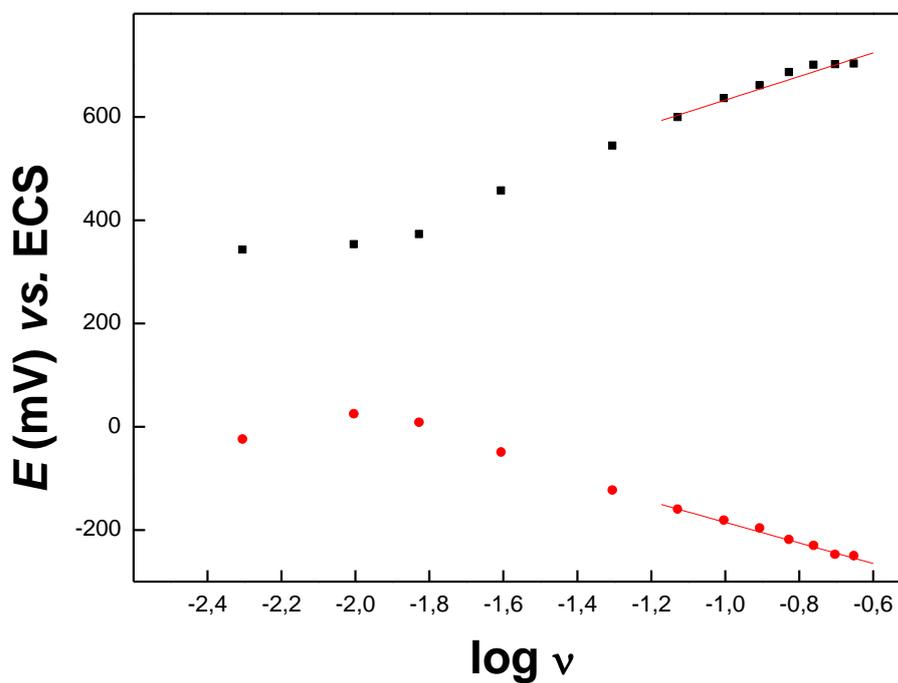


Figura 23: Estudo da varredura de potenciais pela variação do logaritmo da velocidade de varredura para eletrodos modificados com monocamadas mistas (1:1).

A constante aparente de transferência eletrônica (k_e) foi determinada pela Equação 4:

$$k_e = \frac{2,303 \cdot \alpha_a \cdot n \cdot F \cdot v_0}{R \cdot T} \quad (04)$$

O cálculo da constante aparente de transferência eletrônica estimada para a velocidade de $4,0 \times 10^{-3} \text{ V s}^{-1}$ foi de $0,17 \text{ s}^{-1}$ para monocamadas formadas com concentrações equimolares dos tiois funcionalizados (proporção 1:1). O valor observado de k_e para $T = 298 \text{ K}$, em conjunto com os valores de transferência eletrônica obtidos anteriormente, demonstram que o sistema redox é *quasi-reversível*. As monocamadas mistas na proporção 1:2 apresentaram a constante de transferência eletrônica aparente aproximadamente igual à $0,30 \text{ s}^{-1}$ ($v_0=5,0 \text{ m V s}^{-1}$).

Ao estabelecer paralelo entre o estudo da velocidade de varredura em solução aquosa de hexacianoferrato(II) e (III) (Figuras 18 e 19) para diferentes SAMs mistas pode-se verificar um maior incremento nas correntes de pico para aquelas formadas na proporção (1:2).

Ao comparar os resultados obtidos por monocamadas formadas apenas por (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e monocamadas formadas com monocamadas mistas, pode-se evidenciar que a presença de tiois com menores cadeias carbônicas contribui para um aumento na magnitude de corrente e conseqüentemente maior transferência eletrônica. Esse fato é justificado, pelo aumento da cadeia carbônica, devido a maior interação apolar da cadeia principal, dificultando a transferência eletrônica para monocamadas formadas apenas de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio.

5.2.2 Estudo da velocidade de varredura no eletrodo de ouro quimicamente modificado com SAM mistas pré-concentradas como mediador eletrônico hexacianoferrato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$

O estudo de pré-concentração no EQM foi realizado com hexacianoferrato de modo a verificar a eficiência destes mediadores de elétrons entre os tiois que formam a monocamada e a superfície de ouro através da troca iônica. O esquema da mediação de elétrons envolvida neste estudo está representado hipoteticamente pelas Figuras 24 e 25.

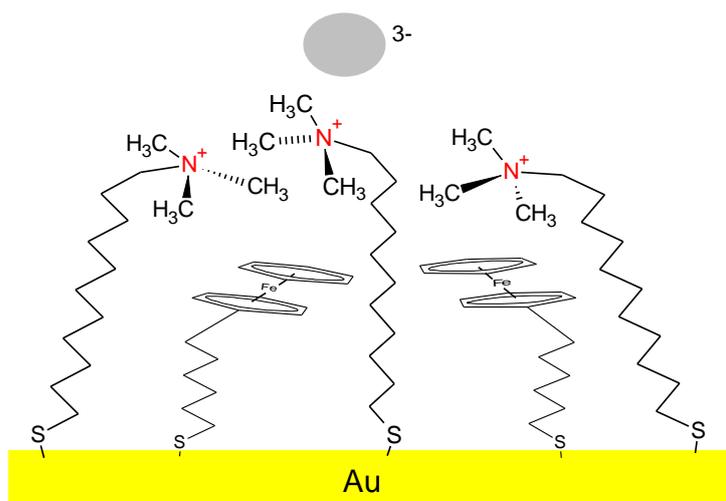


Figura 24: Representação esquemática do estudo de pré-concentração com $\text{Fe}[\text{CN}]_6^{3-}(\text{aq})$ (●³⁻) em SAM mistas (1:1). **Fonte:** Elaborada pelo autor, a partir de dos básicos da pesquisa.

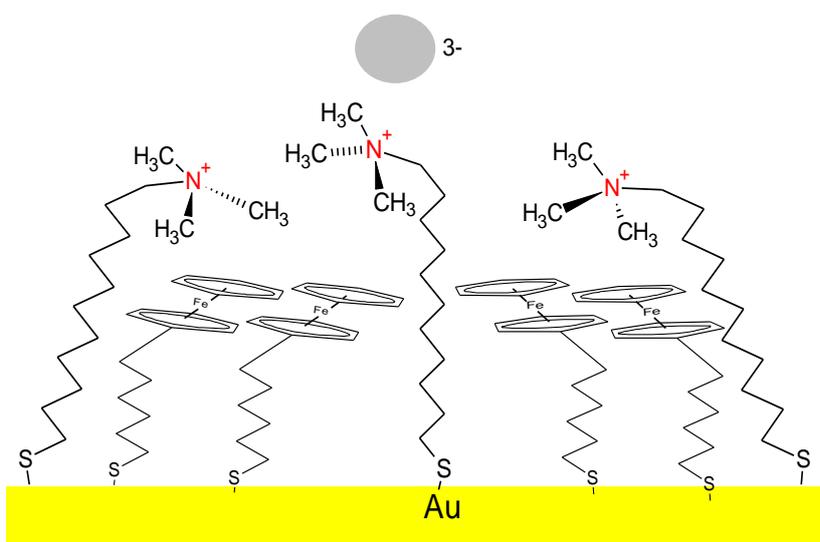


Figura 25: Representação esquemática do estudo de pré-concentração com $\text{Fe}[\text{CN}]_6^{3-}(\text{aq})$ (●³⁻) em SAM mistas (1:2). **Fonte:** Elaborada pelo autor, a partir de dos básicos da pesquisa.

A pré-concentração para tempos inferiores a 60 minutos não foi efetiva, portanto os estudos foram realizados para tempos iguais a: 1 hora, 2 horas e 3 horas.

5.2.2.1 Período de pré-concentração do mediador eletrônico durante 1 hora

A pré-concentração de hexacianoferrato em monocamadas mistas foi evidenciada através da presença de dois processos: 0,18 V referente ao pico anódico e 0,16 V referente ao pico catódico correspondentes ao par redox do hexacianoferrato imobilizado no (11-mercaptoundecil)-*N',N'',N'''* trimetilamônio e os

potenciais de pico em 0,51 V e 0,39 V, os quais correspondem, respectivamente, ao par redox do grupo ferroceno, do 6-(ferrocenil)hexanotiol. O comportamento eletroquímico apresentado por esses dois pares redox foi corroborado ao analisar separadamente as monocamadas, conforme as Figuras 26 e 27.

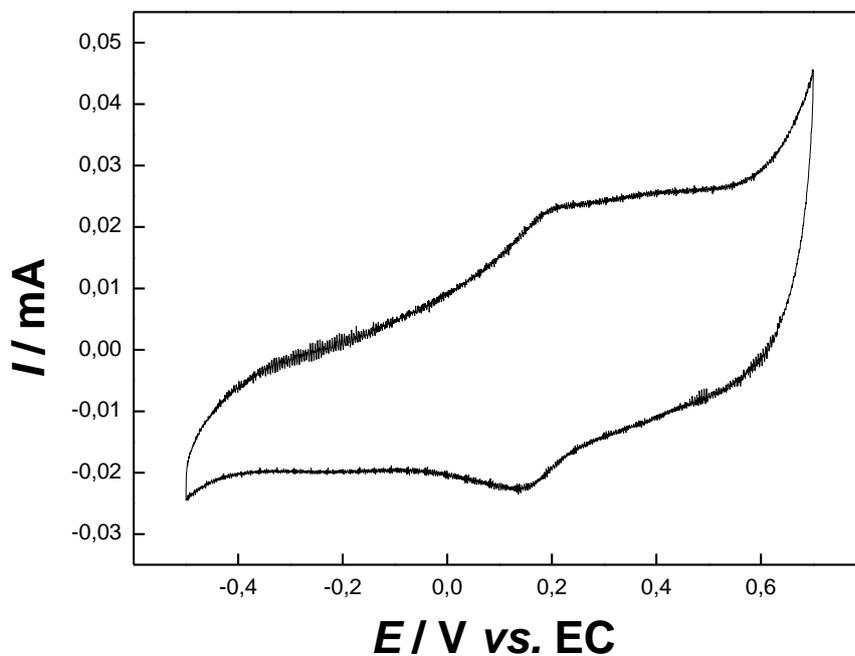


Figura 26: Voltamograma cíclico referente a SAM de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' trimetilamônio, pré-concentradas com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ durante 1 hora em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

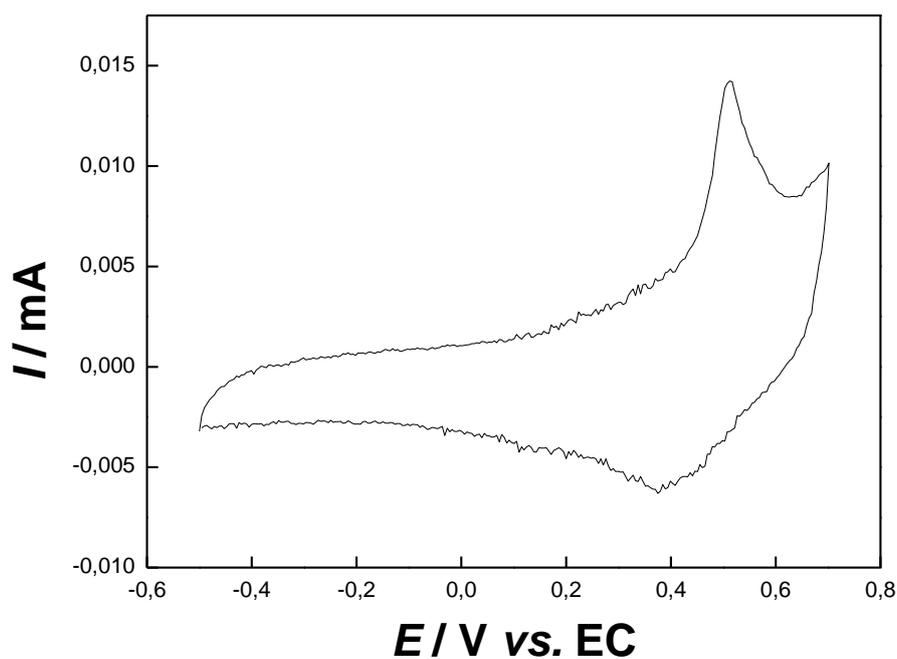


Figura 27: Voltamograma cíclico referente a SAM de 6-(ferrocenil)hexanotiol realizado em $\text{KCl } 0,50 \text{ mol L}^{-1}$ a 25 mV s^{-1} .

O estudo da velocidade de varredura realizado em um intervalo entre 5 mV s^{-1} e 225 mV s^{-1} em solução aquosa de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ apresentou comportamento voltamétrico, ilustrados nas Figuras 28 e 29, referentes a SAM mistas (1:1 e 1:2), respectivamente. Pode-se notar que o pico de redução da molécula de ferroceno não foi evidente.

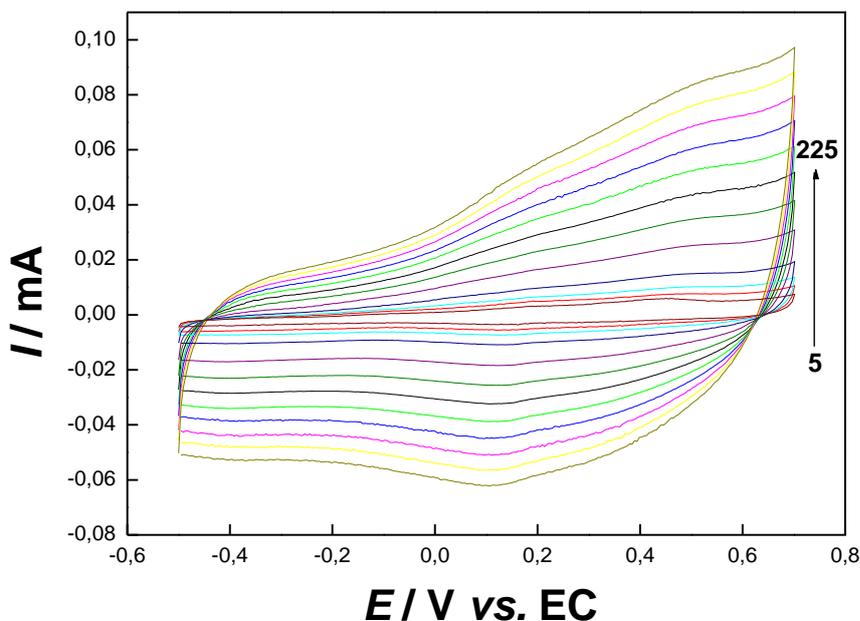


Figura 28: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:1), pré-concentrado em hexacianoferrato de potássio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ durante 1 hora em solução de cloreto de potássio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$.

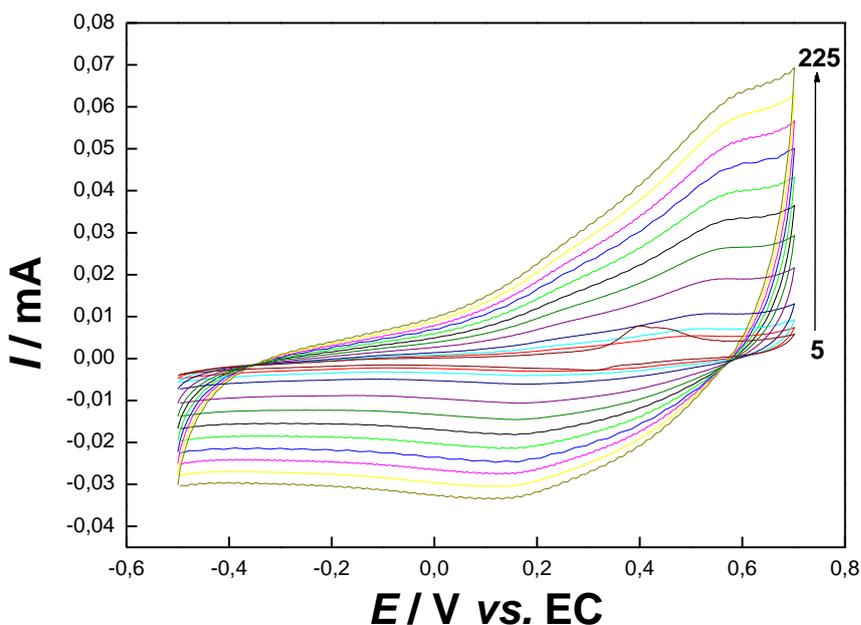


Figura 29: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:2), pré-concentrado em hexacianoferrato de potássio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ durante 1 hora em solução de cloreto de potássio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$.

A influência da velocidade de varredura é refletida no incremento das correntes de pico, sendo analisadas mais especificamente através da dependência direta das correntes de picos anódicas e catódicas em função da varredura de potenciais, ilustrado nas Figuras 30 e 31.

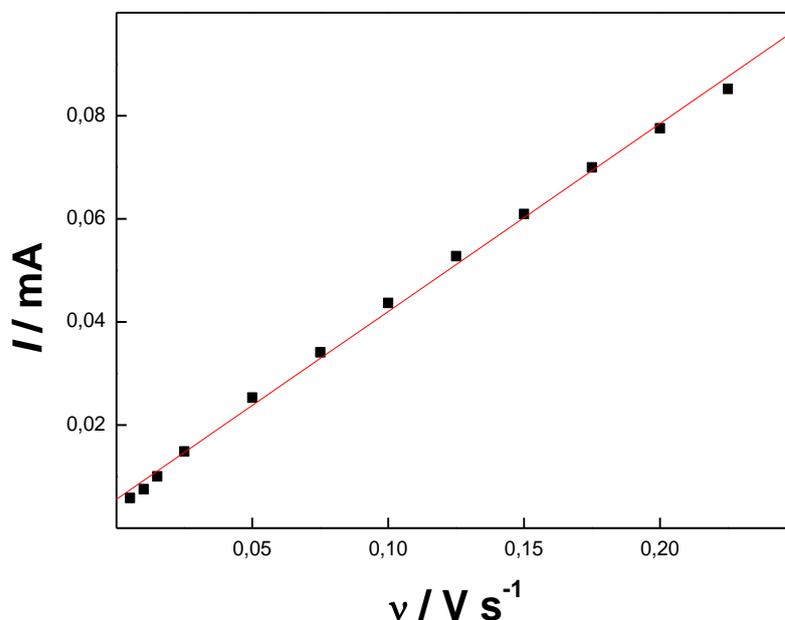


Figura 30: Dependência das correntes de picos em função da velocidade de varredura de potenciais oxidação do ferroceno no eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:1) e pré-concentrados durante 1 hora em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_{(\text{aq})}$.

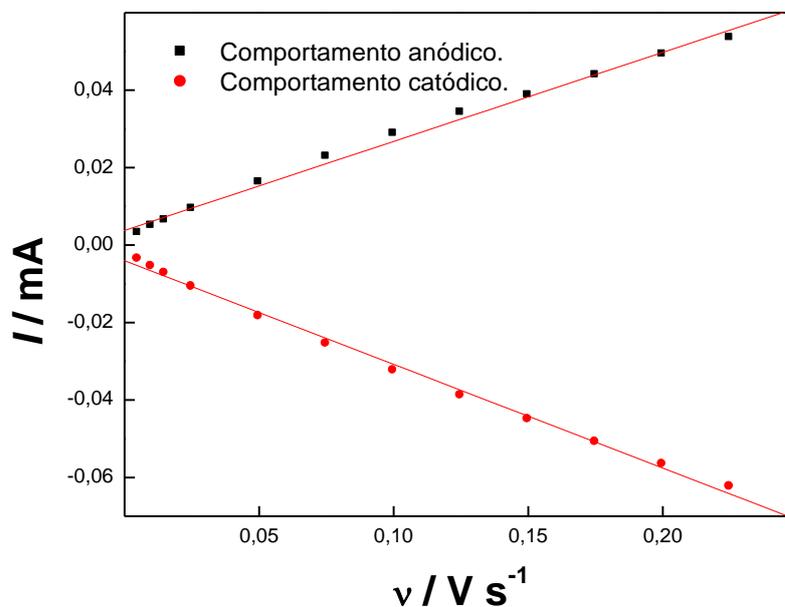


Figura 31: Dependência das correntes de picos em função da velocidade de varredura de potenciais oxidação e reduçãp do par redox do hexacianoferrato em monocamadas mistas (1:1) e pré-concentrados durante 1 hora em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_{(\text{aq})}$.

A dependência dos valores de magnitude de corrente ser diretamente proporcional ao incremento da velocidade de varredura caracteriza o processo de transferência de elétrons pelo confinamento de espécies eletroativas na superfície (processo adsortivo).

A partir do comportamento eletroquímico das diferentes monocamadas mistas estudadas, foram determinados os valores dos coeficientes angulares e os valores de correlação linear (R), que estão apresentados na Tabela 6, para os estudos envolvendo os valores de corrente em função dos valores de velocidade de varredura (Figuras 30 e 31).

Tabela 6: Dados obtidos para as monocamadas mistas através das equações das retas obtidas pelas Figuras 30 e 31.

Gráficos	Coeficiente angular		R _a	R _c
	Anódico	Catódico		
<i>I</i> vs. <i>v</i> (1:1)	3,64 x 10 ⁻⁴	-2,68 x 10 ⁻⁴	0,998	-0,998
<i>I</i> vs. <i>v</i> (1:2)	1,15 x 10 ⁻⁴	1,43 x 10 ⁻⁴	0,995	0,997

A cobertura de superfície (Γ) pode ser calculada, através dos valores dos coeficientes angulares da Tabela 6 e empregando-se a Equação 06:

$$I_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} A \Gamma v \quad (06)$$

As monocamadas mistas equimolares apresentaram cobertura superficial igual à 1,2 x 10⁻⁹ mol cm⁻², enquanto que as monocamadas formadas pela proporção 1:2 apresentaram Γ igual à 2,8 x 10⁻¹⁰ mol cm⁻². A cobertura superficial das espécies eletroativas do mediador eletrônico hexacianoferrato, durante o período de 1 hora, apresentou-se baixa para as monocamadas mistas (1:1) e (1:2).

5.2.2.2 Período de pré-concentração do mediador eletrônico durante 2 horas

O efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com brometo de (11-mercaptoundecil)-N',N'',N'''-trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol com pré-concentração em

ferricianeto de potássio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ foi avaliado durante o período de 2 horas. As Figuras 32 e 33 apresentam os voltamogramas cíclicos com velocidades de varredura entre 5 e 225 mV s^{-1} para o eletrodo de ouro modificado com os tióis nas proporções 1:1 e 1:2.

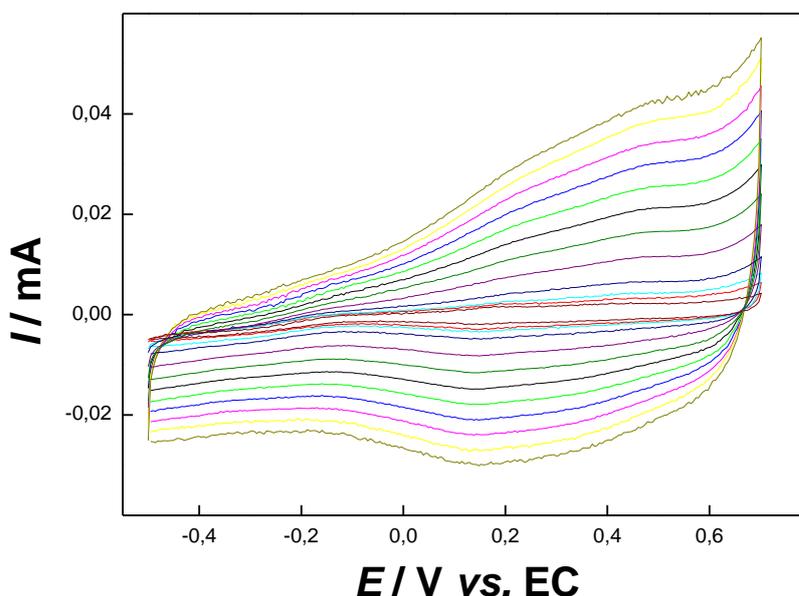


Figura 32: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:1), pré-concentrado em hexacianoferrato durante 2 horas em solução de cloreto de potássio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$.

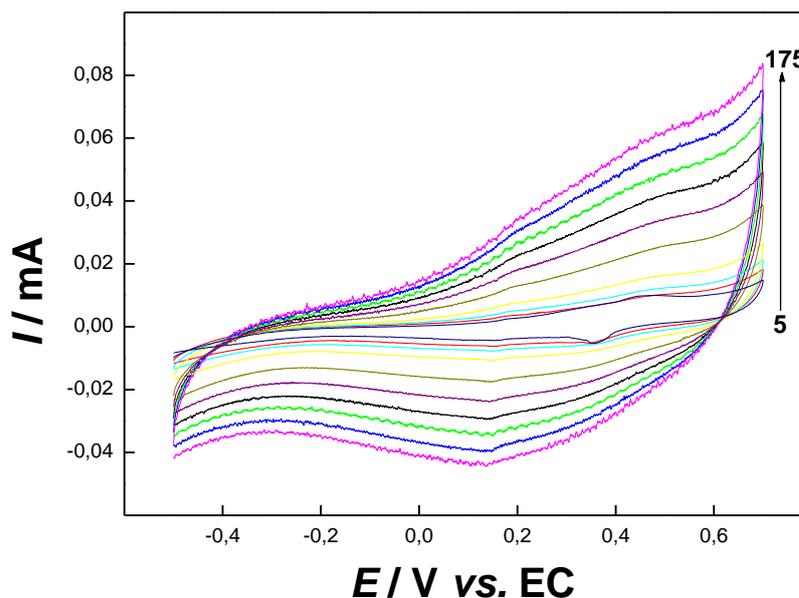


Figura 33: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e hexanotiol(1:2), pré-concentrado em hexacianoferrato durante 2 horas em solução de cloreto de potássio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$.

O confinamento das espécies eletroativas do mediador eletrônico hexacianoferrato na superfície do eletrodo de ouro modificado com SAMs mistas foi corroborado através da dependência linear das correntes de picos anódicas e catódicas obtidas pelos voltamogramas cíclicos em função da velocidade de varredura, como apresentada nas Figuras 34 e 35 [97, 98, 119]. Esta linearidade foi observada tanto para o par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ da molécula do hexacianoferrato, como para a oxidação do grupo terminal (ferroceno) do tiol funcionalizado 6-(ferrocenil)hexanotiol, evidenciando que os processos redox envolvidos foram controlados pelo contra balanço de carga sobre a superfície de ouro modificado com as SAM mistas (1:1) e (1:2).

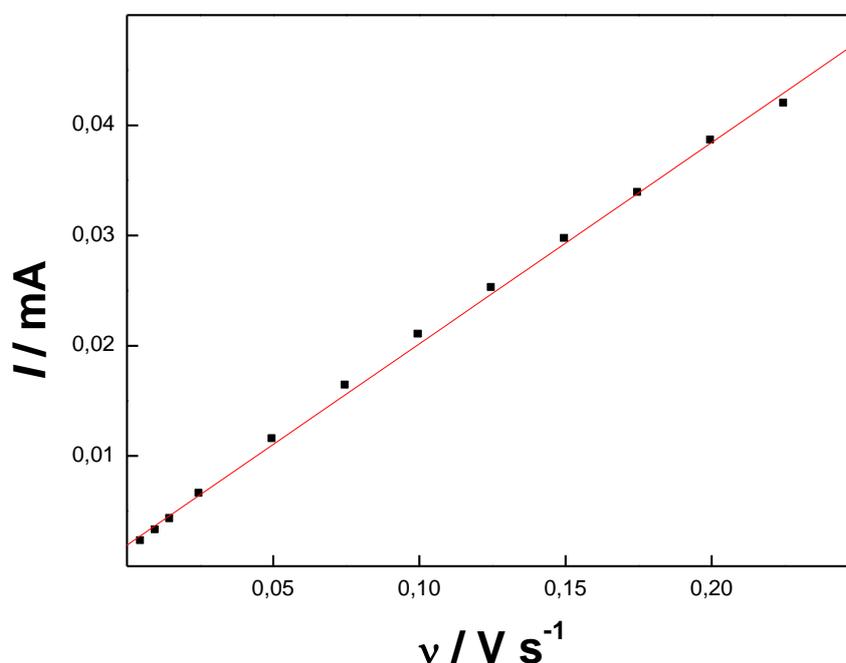


Figura 34: Dependência das correntes de picos em função da velocidade de varredura dos potenciais de oxidação do ferroceno para o eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:1).

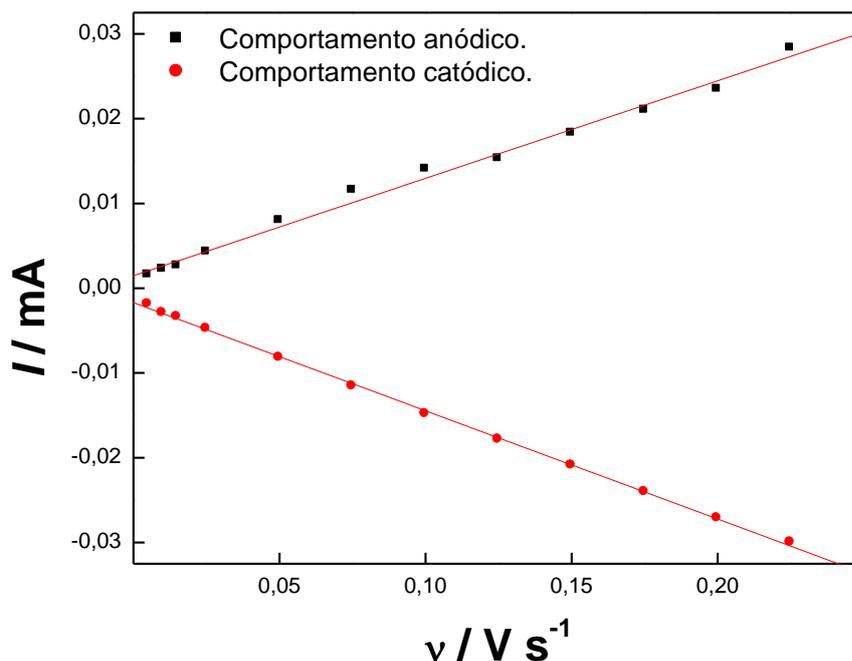


Figura 35: Dependência das correntes de picos em função da velocidade de varredura dos potenciais de oxidação e redução do par redox do hexacianoferrato em monocamadas mistas (1:1) e pré-concentrados durante 2 horas em $K_3[Fe(CN)_6]_{(aq)}$.

Vale ressaltar que do mesmo modo, observou-se linearidade entre os valores de corrente em função da velocidade de varredura de potenciais para as monocamadas mistas na proporção 1:2, por essa razão não foram representados nessa sessão.

Ao comparar a pré-concentração no período de 2 horas para diferentes tipos de SAM mistas (1:1 e 1:2), pode-se ratificar, através do aumento dos valores de corrente, uma maior transferência eletrônica para monocamadas auto-organizadas com maior proporção do tiol 6-(ferrocenil)hexanotiol.

A cobertura de superfície (Γ) foi investigada para as monocamadas mistas, conforme a Equação 06, através do coeficiente angular da relação corrente de pico em função da velocidade de varredura. O cálculo da concentração de espécies eletroativas (Γ) foi efetuado para a oxidação do hexacianoferrato (Fe^{2+}/Fe^{3+}) e do ferroceno (Fe^0/Fe^+), e os valores estão discriminados na Tabela 7.

Tabela 7: Dados obtidos para as monocamadas mistas através dos valores de coeficientes angulares obtidos pela equação da reta dos valores de corrente em função da velocidade de varredura.

Gráficos	Coeficiente angular Anódico		Γ (1:1) mol cm ⁻²	Γ (1:2) mol cm ⁻²
	(1:1)	(1:2)		
Ferroceno	$1,83 \times 10^{-4}$	$3,21 \times 10^{-4}$	$1,82 \times 10^{-9}$	$3,02 \times 10^{-9}$
Par redox: Fe ²⁺ _(aq) /Fe ³⁺ _(aq)	$1,14 \times 10^{-4}$	$2,61 \times 10^{-4}$	$1,21 \times 10^{-9}$	$2,64 \times 10^{-9}$

Apesar do aumento da concentração eletroativa apresentar-se maior para monocamadas de proporção (1:2), este aumento não foi expressivo com a diminuição da quantidade de moléculas de (11-mercaptoundecil)-N',N'',N'''-trimetilamônio sobre a superfície do eletrodo. A cobertura superficial é corroborada com valores encontrados na literatura e justifica a eficácia da transferência eletrônica das monocamadas auto-organizadas com a presença do mediador eletrônico hexacianoferrato [110].

5.2.2.3 Período de pré-concentração do mediador eletrônico durante 3 horas

O efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com brometo de (11-mercaptoundecil)-N',N'',N'''-trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:1) com pré-concentração em ferricianeto de potássio 0,10 mol L⁻¹ foi avaliado durante o período de 3 horas. O comportamento redox Fe²⁺_(aq)/Fe³⁺_(aq) do hexaciano para monocamadas mistas (1:1) foi evidenciado nos voltamogramas cíclicos para diferentes velocidades de varredura (Figura 36).

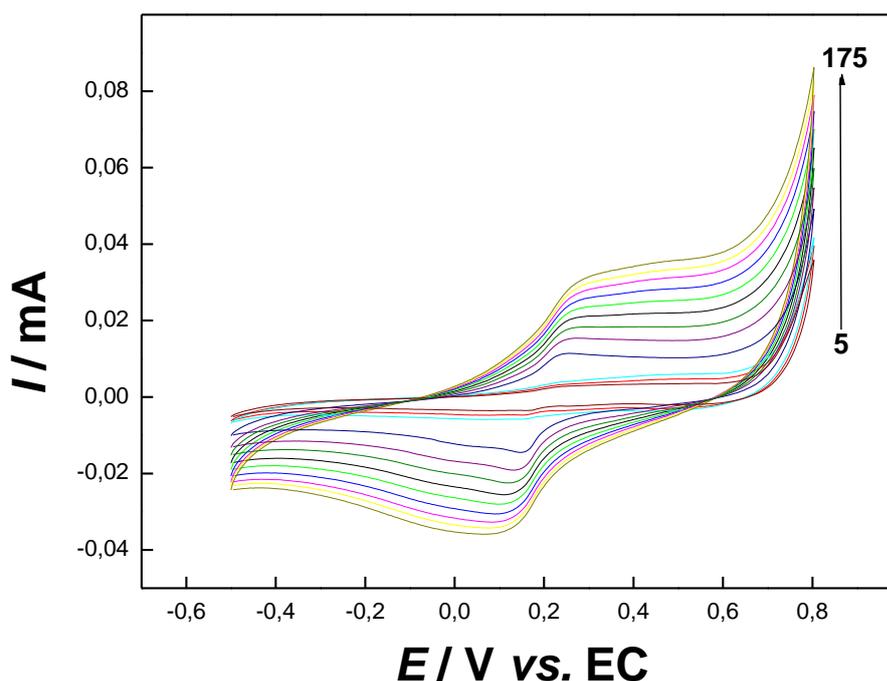


Figura 36: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:1), pré-concentrado em hexacianoferrato durante 3 horas em solução de cloreto de potássio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$.

O processo de oxidação $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ apresentou valores de pico próximos a $0,25\text{V}$, enquanto a redução ocorreu em potenciais próximos ou iguais a $0,15\text{V}$.

O comportamento eletroquímico para eletrodos quimicamente modificados com monocamadas auto-organizadas mistas (1:2) apresentou-se distinto para altas e baixas velocidades de varredura. O incremento dos valores das correntes anódicas e catódicas foi constatado para velocidades iguais e superiores a 15 mV s^{-1} (Figura 37).

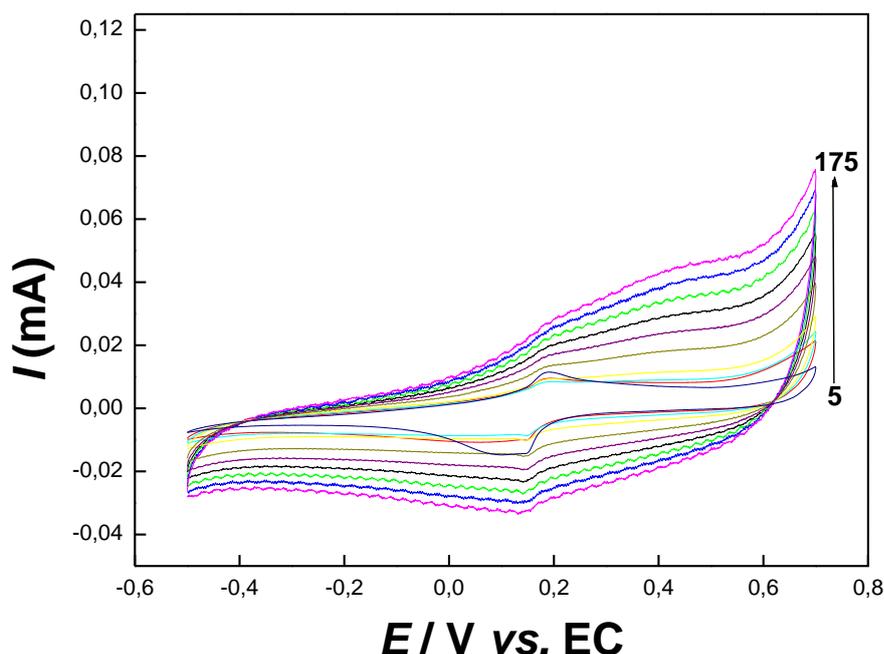


Figura 37: Efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol (1:2), pré-concentrado em hexacianoferrato durante 3 horas em solução de cloreto de potássio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$.

Não foi observada linearidade efetiva quando comparada ao intervalo de velocidade de varredura entre 5 e 225 mV s^{-1} . Entretanto, a linearidade encontrada nas regiões compreendidas nos intervalos de velocidade de varredura entre 5 e 15 mV s^{-1} e entre 25 e 225 mV s^{-1} possuem mecanismo de transferência eletrônica difusional, evidenciando que o mecanismo de eletroneutralidade ocorre pela difusão das espécies iônicas presentes em solução para as monocamadas 1:1.

O estudo da transferência de elétrons foi realizado através do logaritmo dos valores de corrente obtidos pelos voltamogramas cíclicos pelo logaritmo das diferentes velocidades de varredura utilizadas. As Figuras 38 e 38 representam a relação de $\log I$ versus $\log v$ para SAMs mistas (1:1) e (1:2), respectivamente, através da imobilização do mediador eletrônico hexacianoferrato no período de 3 horas.

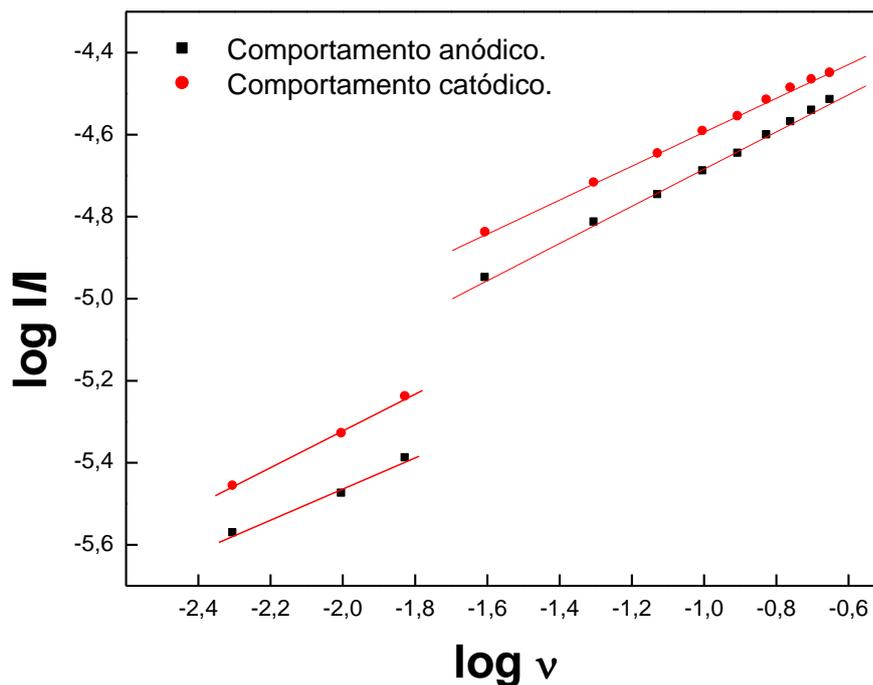


Figura 38: Estudo do comportamento de transferência eletrônica através dos valores do logaritmo das correntes anódicas e catódicas em função do logaritmo das velocidades de varredura, em monocamadas mistas (1:1) pré-concentradas durante 3 horas com hexacianoferrato.

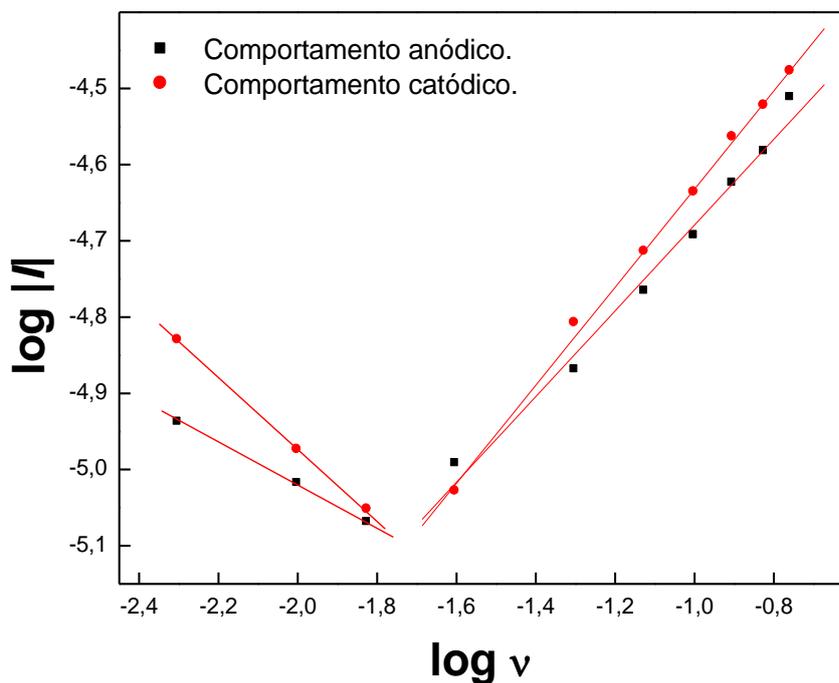


Figura 39: Estudo do comportamento de transferência eletrônica através dos valores do logaritmo das correntes anódicas e catódicas em função do logaritmo das velocidades de varredura, em monocamadas mistas (1:2) e pré-concentrados durante 3 horas em $K_3[Fe(CN)_6]$.

Verificou-se que a transferência eletrônica é realizada pela difusão nas duas regiões lineares (de 5 a 15 mV s⁻¹ e de 25 a 225 mV s⁻¹) da Figuras 38 e 39. A determinação de processo difusional correlaciona valores de coeficiente angulares tendendo a 0,50 em gráfico de log *I* versus log *v*.

Na Tabela 8 são apresentados os valores dos coeficientes angulares anódicos e catódicos e as correlações de regressão lineares (*R*) obtidos pelas equações das retas da Figura 38 e 39.

Tabela 8: Dados obtidos através das equações das retas das Figuras 38 e 39.

SAMs mistas	Gráficos	Coeficiente angular		R _a	R _c
		Anódico	Catódico		
(1:1)	Log <i>I</i> x log <i>v</i> (5 a 15 mV s ⁻¹)	0,37	0,45	0,992	0,999
	Log <i>I</i> x log <i>v</i> (25 a 225 mV s ⁻¹)	0,45	0,41	0,998	0,999
(1:2)	Log <i>I</i> x log <i>v</i> (5 a 15 mV s ⁻¹)	0,27	0,46	0,999	0,999
	Log <i>I</i> x log <i>v</i> (25 a 225 mV s ⁻¹)	0,64	0,56	0,993	0,998

De acordo com a literatura, os valores obtidos dos coeficientes angulares tanto anódicos quanto catódicos obtidos experimentalmente nos gráficos log *I* versus log *v*, apresentados na Tabela 8, são similares ao valor teórico de 0,50, ratificando assim o mecanismo de transferência eletrônica difusional. [97, 98, 119].

A concentração de espécie eletroativa (Γ) das monoamadas auto-organizadas sobre a superfície do eletrodo em processos difusionais, pode ser determinada para voltamogramas obtidos em solução aquosa à baixa velocidade de varredura, utilizando a Equação 7 [97, 98]:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad \dots\dots\dots(07)$$

Onde Γ representa a concentração de espécie eletroativa formada na superfície do eletrodo (mol cm⁻²), *Q* a carga obtida a partir da integral da área dos valores de corrente anódica ($Q = 4,911 \times 10^{-5}$ C) em função do tempo de varredura com correção de linha base (*C*), *n* o número de elétron decorrente do processo redox ($n = 1$), *F* a constante de Faraday (96485,4 C mol/e⁻), e *A* a área do eletrodo de ouro

(0,96 cm²). O estudo foi realizado para baixas velocidades de varredura $5,0 \times 10^{-3}$ V s⁻¹. O valor da cobertura superficial (Γ) para as espécies de hexacianoferrato foi $2,2 \times 10^{-9}$ mol cm⁻² e $2,9 \times 10^{-9}$ mol cm⁻² para monocamadas mistas (1:1) e (1:2), respectivamente.

De acordo com os resultados, o melhor tempo de pré-concentração do mediador eletrônico hexacianoferrato foi de 2 horas utilizando-se monocamadas com proporção 1:2 dos tióis funcionalizados para a construção do biossensor. Tais parâmetros são justificados devido a melhor transferência eletrônica em ferri-ferrocianeto de potássio destas monocamadas, apresentando maior valores de magnitude de corrente, bem como pelo processo de transferência eletrônica em solução aquosa de KCl ser controlado pelo contrabalanço de carga das moléculas de hexacianoferrato na superfície do eletrodo modificado (processo adsortivo), apresentando maior cobertura superficial quando comparado aos demais tempos estudados.

5.5 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A morfologia das monocamadas auto-organizadas foi observada por MEV. A topografia do eletrodo de ouro não modificado pode ser visualizada na Figura 40 (a). As Figuras 40 (b), 40 (c) e 40 (d) ilustram os eletrodos de ouro modificados com monocamadas auto-organizadas que podem ser visualizadas com o aumento de 1000 vezes na resolução.

As imagens de MEV das monocamadas foram extremamente finas, tornando-se um empecilho na análise de imagens com alta resolução. A microscopia do eletrodo de ouro mostra que a superfície do metal é razoavelmente plana e com baixa rugosidade (Figura 40 (a)).

A modificação com (11-mercaptoundecil)-*N',N'',N'''*-trimetilamônio observado na Figura 40 (b), possibilitou a formação de uma camada mais fina e uniforme quando comparada com a formação de monocamadas mistas de 6-(ferrocenil)hexanotiol e (11-mercaptoundeci)-*N',N'',N'''*-trimetilamônio da Figura 40 (c).

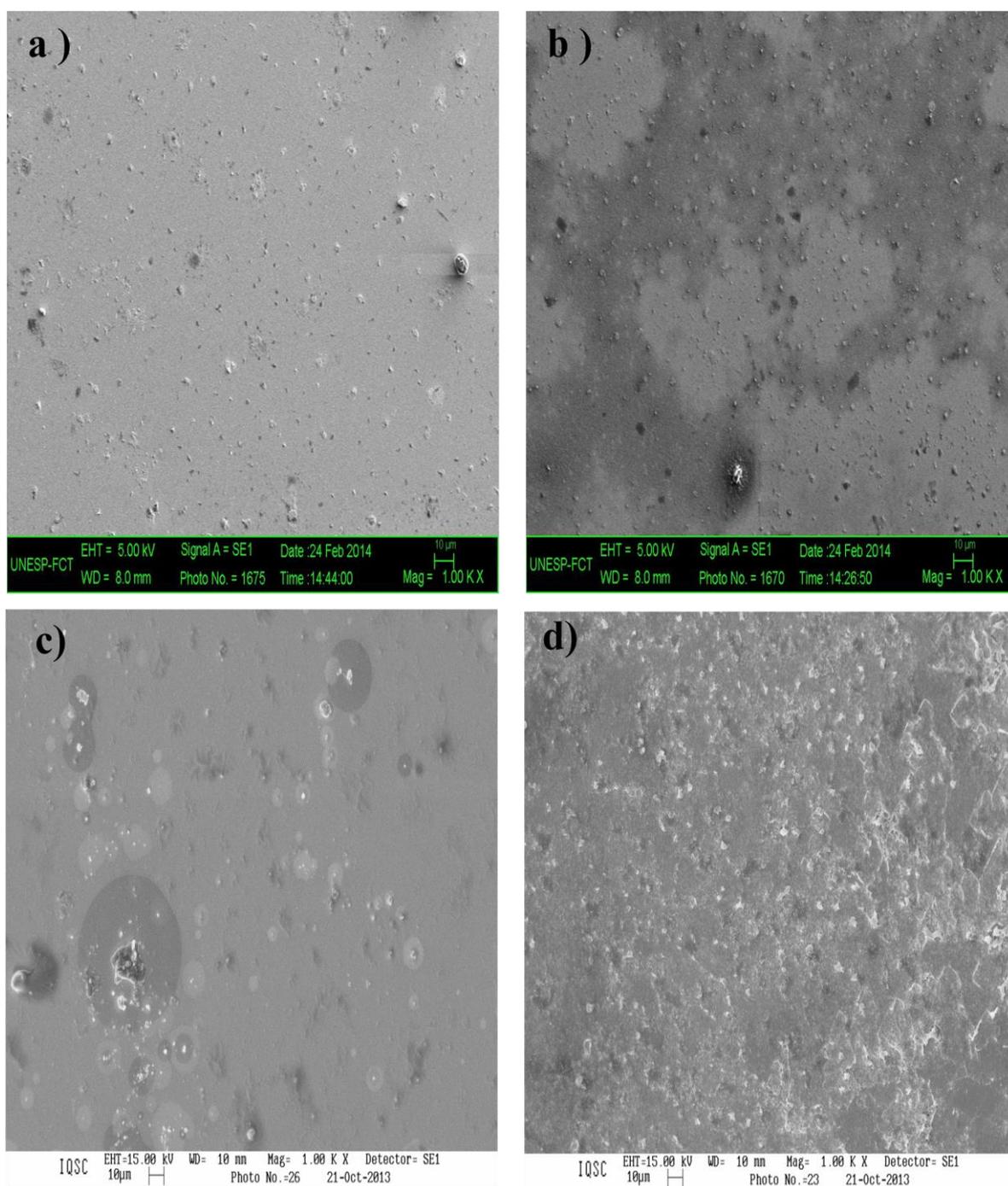


Figura 40: Imagens de MEV com diferentes morfologias. (a) eletrodo de ouro não modificado, (b) eletrodo de ouro modificado com (11- mercaptoundecil)-*N',N'',N'''*-trimetilamônio, (c) eletrodo de ouro modificado com monocamadas auto- organizadas do tipo mistas (6-ferrocenilhecanotiol e (11-mercaptoundecil)-*N',N'',N'''*-trimetilamônio), d) eletrodo de ouro modificado com monocamadas auto-organizadas do tipo mistas (6-ferrocenilhecanotiol e (11-mercaptoundecil)-*N',N'',N'''*-trimetilamônio) pré-concentrado com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ por 2 horas.

A formação de pequenos aglomerados observado na Figura 40 (c) na superfície do ouro confirma a presença do tiol funcionalizado o qual possui em sua composição a molécula de ferroceno [120, 121]. As imagens contendo monocamadas mistas apresentaram cristais na forma de “dendrito” (Figura 40 (c)), ramificações laterais com uma haste principal. Este tipo de formação confirma a presença do grupo ferroceno na superfície do eletrodo, despertando grande interesse na área de catálise eletroquímica, entre outros campos [122].

Na Figura 40 (d) observa-se a imobilização da molécula de hexacianoferrato na superfície da monocamada, uma vez que ocorre a formação de aglomerados e uma maior uniformidade na superfície do eletrodo.

5.6 Avaliação eletroquímica do biossensor em relação à resposta para espécie de interesse

5.6.1 Biossensor voltamétrico

Antes de testar a resposta do biossensor frente à diversas concentrações de glicose, o eletrodo modificado com SAMs mistas (proporção 1:2), mediador hexacianoferrato e a enzima glicose oxidase imobilizada foi submetido a varreduras cíclicas de potenciais a 25 mV s^{-1} em um intervalo de potencial de -0,50 a 0,80 V vs. EC em uma solução tampão de acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,6). Através do voltamograma foi possível observar a presença de dois pares redox: 0,21 V (pico I)/0,06 V (pico de IV) e 0,44 V (pico II)/0,31 V (pico III), atribuídos às reações redox de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e [ferroceno] a $[\text{ferroceno}]^+$, respectivamente (Figura 41).

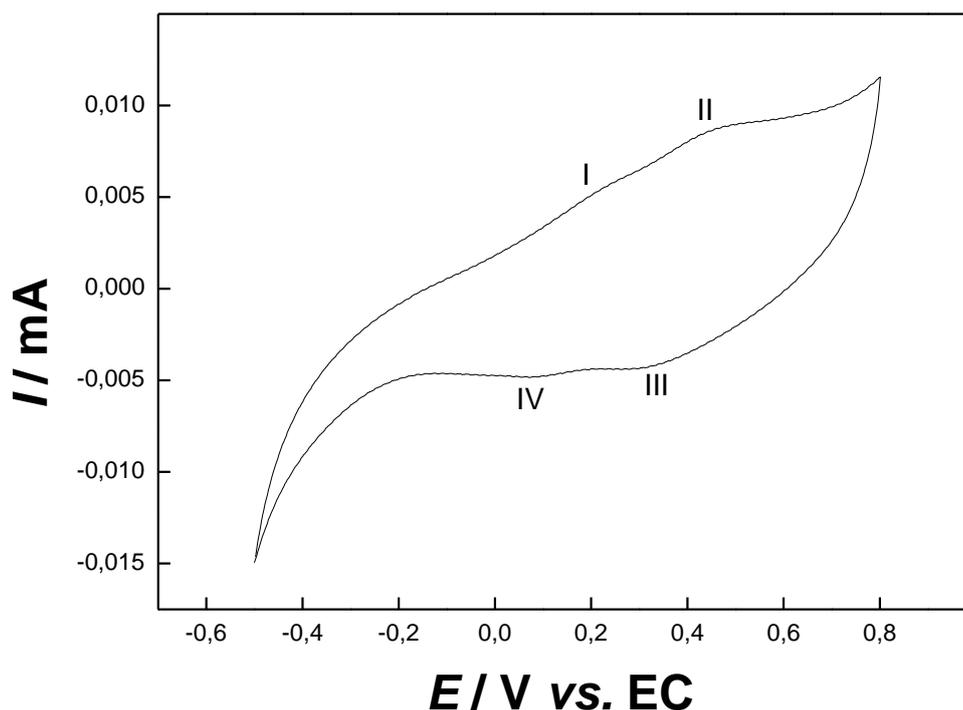


Figura 41: Voltamograma cíclico de o eletrodo de ouro modificado com monocamadas auto-organizadas (1:2, proporção) em tampão de acetato (pH = 4,6) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ a 25 mV s^{-1} .

A resposta eletroquímica do biossensor foi investigada através de adições de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de β -D-glicose em tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Através destas adições um incremento de corrente de pico anódica (pico II) e corrente de pico catódico (pico IV) foram observados. O potencial escolhido para o respectivo estudo foi o de redução (pico IV), haja vista que biossensores voltamétricos e amperométricos devem detectar glicose em potencial próximo à 0,0 V para minimizar o risco de reações interferentes e diminuir também os níveis de corrente residual e ruídos [85].

A atividade do biossensor quando testado em relação à glicose exibiu um incremento de corrente de pico catódico (+0,06 V vs. EC) fornecendo uma resposta favorável com mediador de elétrons hexacianoferrato e o centro redox da enzima glicose oxidase (FAD). A Figura 42 representa a biofuncionalidade do sensor enzimático proposto com as sucessivas adições de β -D-glicose.

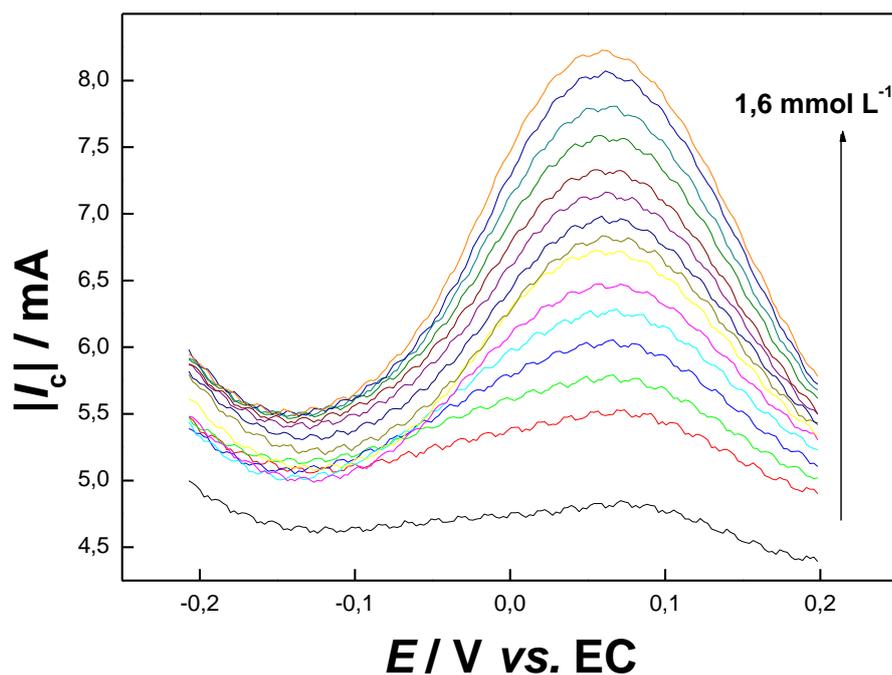
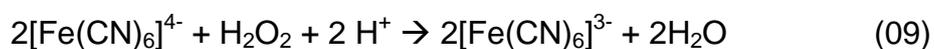
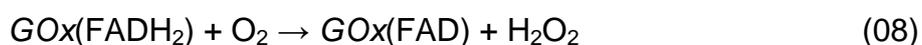
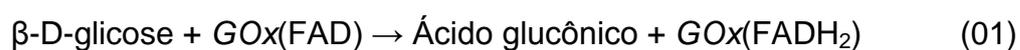


Figura 42: Resposta voltamétrica do biossensor proposto para adições sucessivas de glicose em tampão de acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 4,6$) a 25 mV s^{-1} .

O desempenho do biossensor para a glicose baseia-se no ciclo de quatro reações subsequentes, sendo as três primeiras etapas químicas (Equações 01, 08 e 09), e a quarta uma etapa eletroquímica (Equação 03), onde ocorre o processo de redução do mediador eletrônico $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ na superfície do eletrodo.



Para avaliar o desempenho do biossensor os valores de corrente de pico catódica (potencial fixo de $+0,06 \text{ V vs. EC}$) foram registrados a fim de se obter a curva analítica (Figura 43).

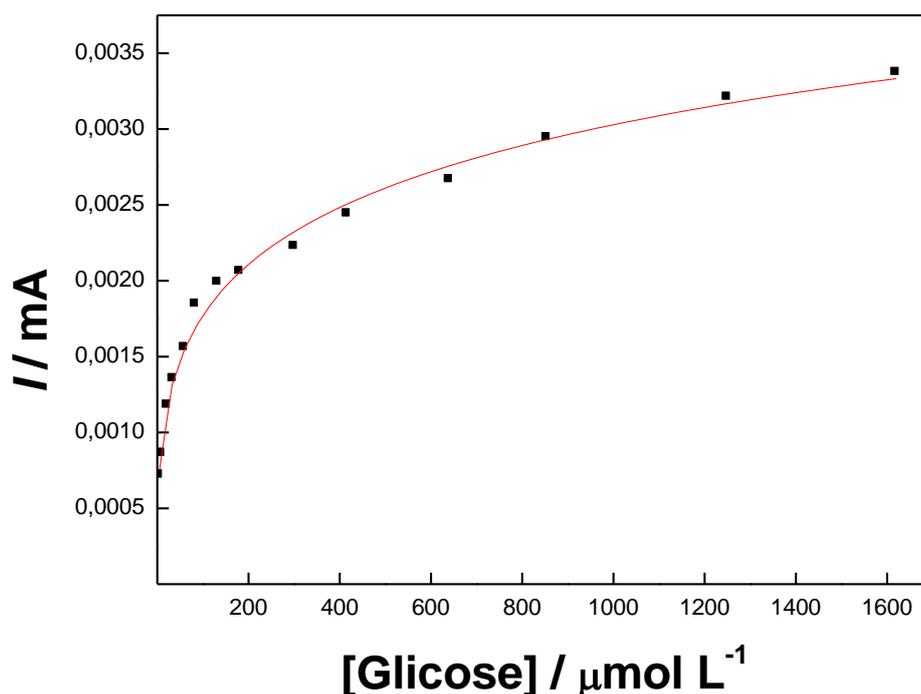


Figura 43: Curva analítica obtida através das correntes de pico catódicas em função de sucessivas adições de glicose.

Por meio da curva analítica pôde-se observar o comportamento do biossensor, onde obteve-se correntes de pico catódica linearmente dependentes da concentração de glicose na gama de resposta de $5,0 \times 10^{-5}$ a $8,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, sendo o limite de detecção igual a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A equação de regressão linear pode ser expressa por:

$$I (\mu\text{A}) = 0,34 + 4,1 [\text{glicose}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (R= 0,998)$$

A atividade enzimática do biossensor para glicose pode ser interpretada através da equação de Michaelis- Menten, considerando o intervalo linear entre a magnitude de corrente e a variação da concentração de β -D-glicose. A equação de Michaelis- Menten é representada por:

$$I_{max} = \frac{nFAk_{obs}\Gamma_E[\text{glicose}]}{(K_m+[\text{glicose}])} \quad (10)$$

A partir da igualdade acima, a determinação de K_m^{ap} e I_{max} pôde ser descrita pelas equações lineares de Lineweaver-Burke (LB), conhecida pela dupla inversão da equação de Michaelis-Menten; Eadie- Hofstee (EH) [123, 124], onde o estudo é realizado através da relação $(I_{max}/[\text{glicose}])$ em função I_{max} e Hanes-Woolf,

recomendada para estudos onde o erro para o cálculo de I_{\max} fosse pequeno, sendo realizado o cálculo dos parâmetros cinéticos pela análise linear da dependência de $([glicose]/ I_{\max})$ em função da $[glicose]$. As diferentes equações lineares obtidas através do rearranjo da Equação de Michaelis-Menten estão representadas na Tabela 9.

Tabela 9 Representação das equações lineares obtidas através do rearranjo da equação de Michaelis- Menten.

Equações	Rearranjo de Michaelis- Menten	Representação
11	Lineweaver-Burk	$\frac{1}{I_{\max}} = \frac{K_m}{x[glicose]} + \frac{1}{x [glicose]}$
12	Eadie- Hofstee (EH)	$\frac{I_{\max}}{[glicose]} = \frac{x}{K_m} - \frac{I_{\max}}{K_m}$
13	Hanes-Woolf	$\frac{[glicose]}{I_{\max}} = \frac{[glicose]}{x} + \frac{K_m}{x}$

Sendo $x = nFAk_{obs}\Gamma_E$, sendo $\Gamma_E = 9,2016 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$

As representações gráficas das equações da Tabela 09 com os dados obtidos dos valores de magnitude de corrente e as concentrações de D- glicose foram utilizados para construir as Figuras de 44 a 46.

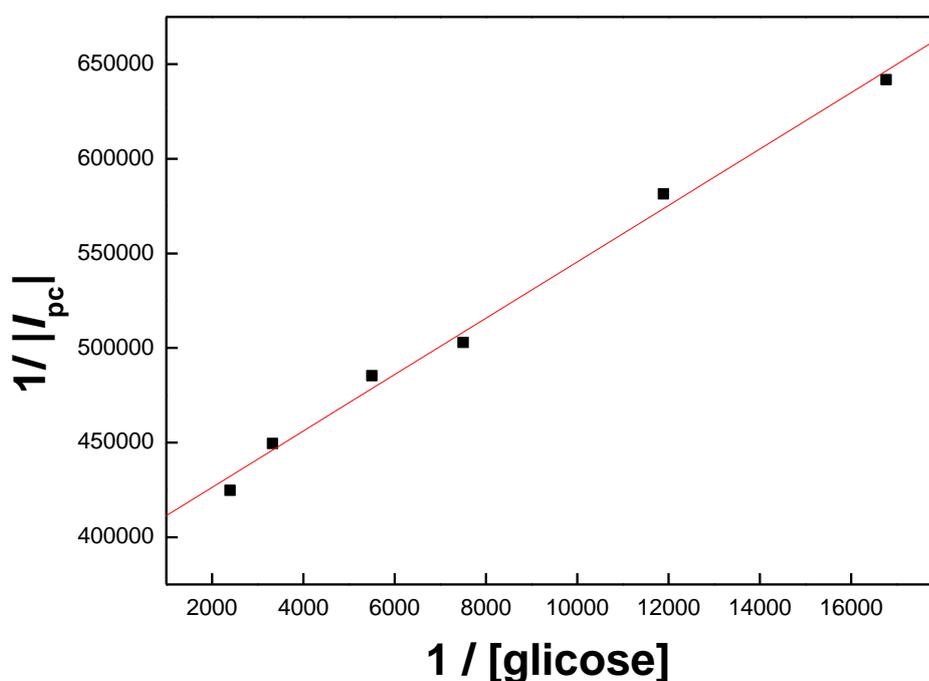


Figura 44: Representação gráfica de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos.

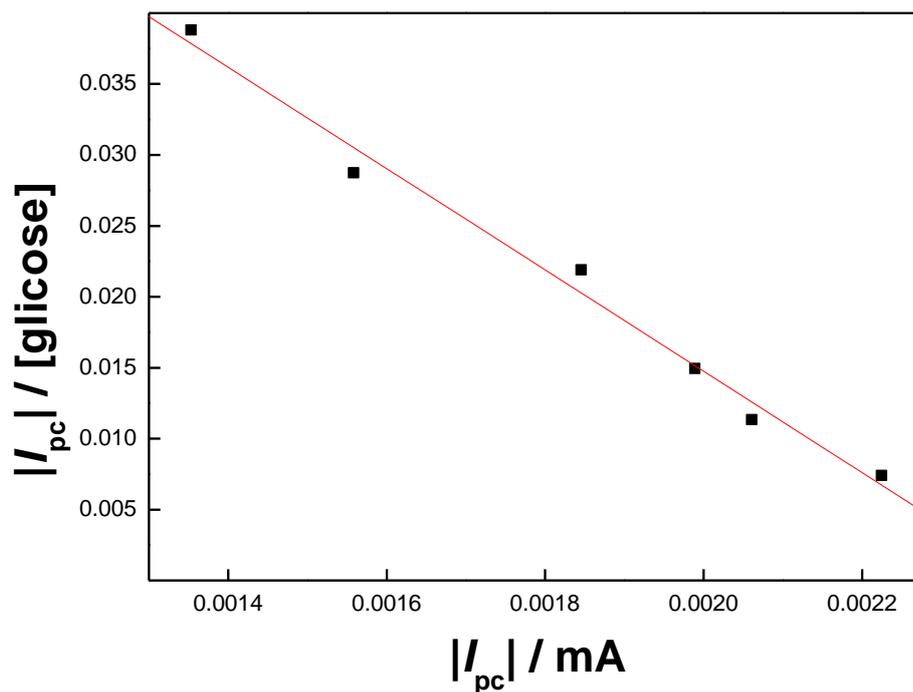


Figura 45: Representação linear de Eadie-Hofstee (EH) para determinação dos parâmetros cinéticos.

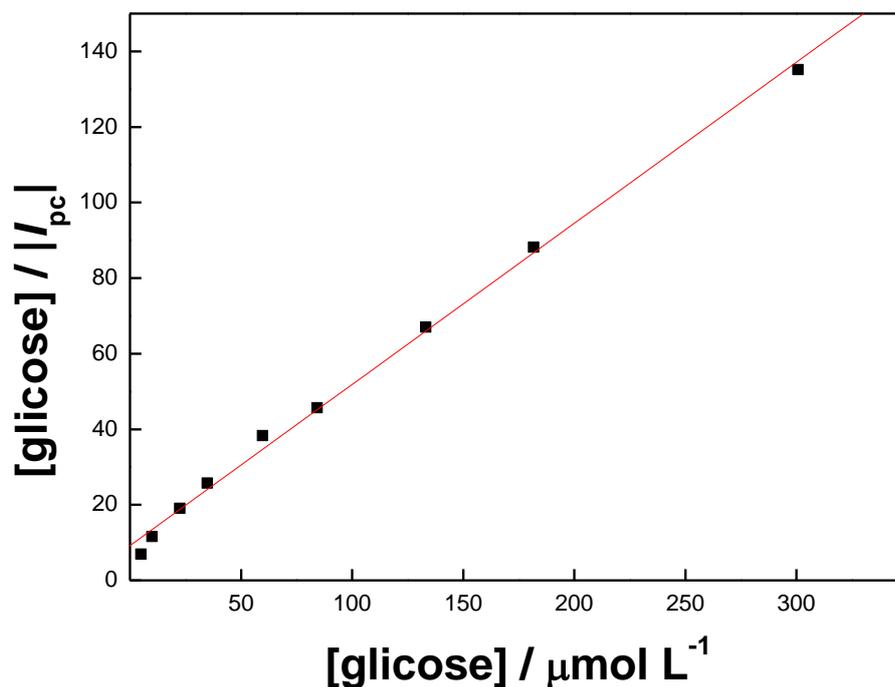


Figura 46: Representação linear de Hanes-Woolf para determinação dos parâmetros cinéticos.

O valores de K_m^{ap} , I_{max} , k_{obs} e R obtidos através das Figuras 44 a 46 são apresentados na Tabela 10. Como pode ser visto, os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten calculados a partir dos três métodos distintos são todos na mesma ordem, ou seja, 10^{-5} para K_m^{ap} e 10^{-2} para o k_{obs} . Os baixos valores de K_m^{ap}

obtidos para o biossensor baseado em Au/SAM mistas/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ /GOx reflete uma alta afinidade do analito pelo substrato. Sendo k_{obs} o número de vezes em cada local de enzima que converte substrato (glicose) em produto por unidade de tempo, pode-se evidenciar que o biossensor apresenta alta produção catalítica em pequenos intervalos de tempo. Por fim, ao denotar a região para cada representação gráfica ilustrada nas Figuras 44 a 46, a linearidade é satisfatória, pois os coeficientes de regressão são, aproximadamente, 0,996, -0,990, 0,980 para as curvas de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e Hanes, respectivamente .

Tabela 10: Valores de K_m^{ap} , k_{obs} e coeficientes de regressão linear referente as representações gráficas das Figuras de 47 a 49.

Método	K_m^{ap} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	I_{max} (μA)	k_{obs} (s^{-1})	R
Lineweaver-Burk	37	2,52	0,032	0,996
Eadie-Hofstee	28	2,45	0,027	-0,990
Hanes-Woolf	21	2,04	0,028	0,998

5.6.2 Biossensor amperométrico.

A eficácia do biossensor Au/SAMmista/ $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ /GOx foi também avaliada como sensor bioenzimático amperométrico.

Os estudos eletroquímicos foram realizados na ausência de β -D-glicose, e posteriores sucessivas adições sucessivas de uma solução padrão de β -D-glicose $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. A variação das concentrações foi de $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, obtendo o amperograma em tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH=4,6).conforme Figura 47 com potencial fixo em 0,06 V.

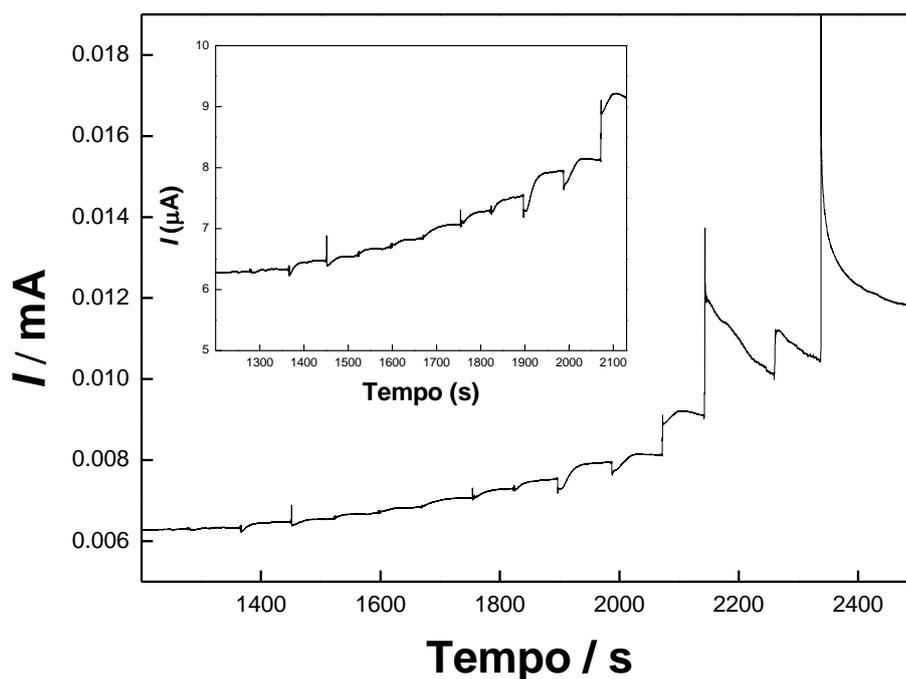


Figura 47: Resposta amperométrica do biossensor proposto para adições sucessivas de glicose em tampão de acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 4,6$) a 25 mV s^{-1} no potencial fixo de $0,06 \text{ V}$.

A confirmação da detecção de β -D-glicose pelo biossensor enzimático proposto é observada pelo aumento do incremento de magnitude de corrente após sucessivas adições do analito e a formação patamares de estabilização. Esta resposta foi significativa no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, após este intervalo não houve a estabilização da corrente.

Com base nos dados obtidos através do amperograma, obteve-se a curva analítica representada na Figura 48.

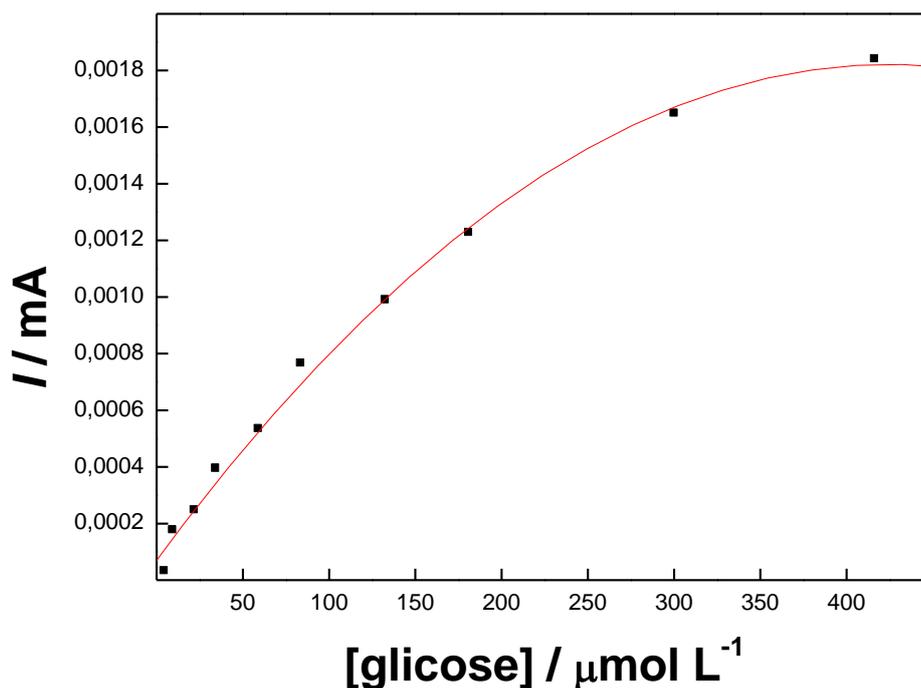


Figura 48: Curva analítica de adições de β -D-glicose para o biossensor amperométrico em solução tampão de acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH=4,6).

A curva analítica (Figura 48) é linear no intervalo de concentração de glicose entre $1,0 \times 10^{-5}$ e $8,4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, de acordo com a equação $(\Delta I / A) = 1,52 \times 10^{-7} + 0,0062 [\text{Glicose}] (\text{mol/L})$, resultando em um coeficiente de correlação linear (R) de 0,990 e um limite de detecção de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. O desvio padrão foi de 4,3 %.

A atividade enzimática do biossensor para glicose pode ser interpretada através da equação de Michaelis-Menten, considerando o intervalo linear entre a magnitude de corrente e a variação da concentração de β -D-glicose.

As constantes de Michaelis-Menten foram: 27, 24, $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de acordo com as equações de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e Hanes-Woolf, respectivamente. As constantes catalíticas foram na ordem de 10^{-2} s^{-1} (0,040; 0,032 e $0,029 \text{ s}^{-1}$ para as equações de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e Hanes-Woolf, respectivamente).

O desempenho dos biossensores amperométrico e voltamétrico desenvolvidos foi comparado com outros biossensores para determinação de glicose, recentemente publicados, baseados na utilização de diferentes materiais modificadores e diferentes técnicas de detecção conforme Tabela 11.

Tabela 11: Comparação entre o biossensor deste trabalho e os recentemente publicados.

Método de detecção	Materiais utilizados na modificação	Eletrodo	K_m^{ap} (mM)	k_{obs} (s^{-1})	LD (μ M)	Ref.
Amperometria	Nitrofenil diazônio/GOx	CV	2,95	4,25	10	[125]
Amperometria	Grafeno/ZnO/GOx	CV	0,0142	1,42	0,24	[126]
Espectroscopia do UV-vis	Nanopartículas coloidais/GOx	-	0,115	0,96	-	[127]
Amperometria	MWNTs- Chit/GOx/CdSe@Cd S	CV	0,46	-	25	[128]
Amperometria	GO _x /NH ₂ -MWCNTs	CV	0,48	1,49	9,0	[129]
Voltametria	CuSPE/ GOx	CuSPE	20,17	1,42	-	[124]
Voltametria	SAM mistas*/GOx	Au	0,037	0,032	1,0	**
Amperometria	SAM mistas*/GOx	Au	0,027	0,040	2,56	**

*SAM mistas: (11-mercaptoundecil)- *N',N'',N'''*-trimetilamônio + hexacianoferrato ; M= mol L⁻¹, CV= carbono vítreo, Au= ouro; CuSPE: eletrodo impresso de carbono banhado com cobre R: Referência; LD: limite de detecção.

**Este trabalh

Os baixos valores da constante de Michaelis-Menten e da constante catalítica quando comparados com os biossensores existentes na literatura comprovam a eficácia do biossensor para glicose de 2ª geração. É importante ressaltar que ambos os tipos de biossensores estudados, voltamétricos e amperométricos, apresentaram respostas eficazes na determinação de glicose.

5.7 Estudo de interferentes na determinação de glicose.

A influência de compostos interferentes eletroativos na resposta do biossensor Au/SAM mistas/Fe(CN)₆³⁻/GOx frente à glicose foi investigada com sete substâncias diferentes: ácido ascórbico, ácido úrico, ácido cítrico, paracetamol (acetaminofeno), manose, frutose e galactose, ou seja, componentes de amostras biológicas, produtos alimentares e fármacos. A Figura 49 apresenta os valores de corrente dos interferentes estudados em relação ao analito de interesse (glicose).

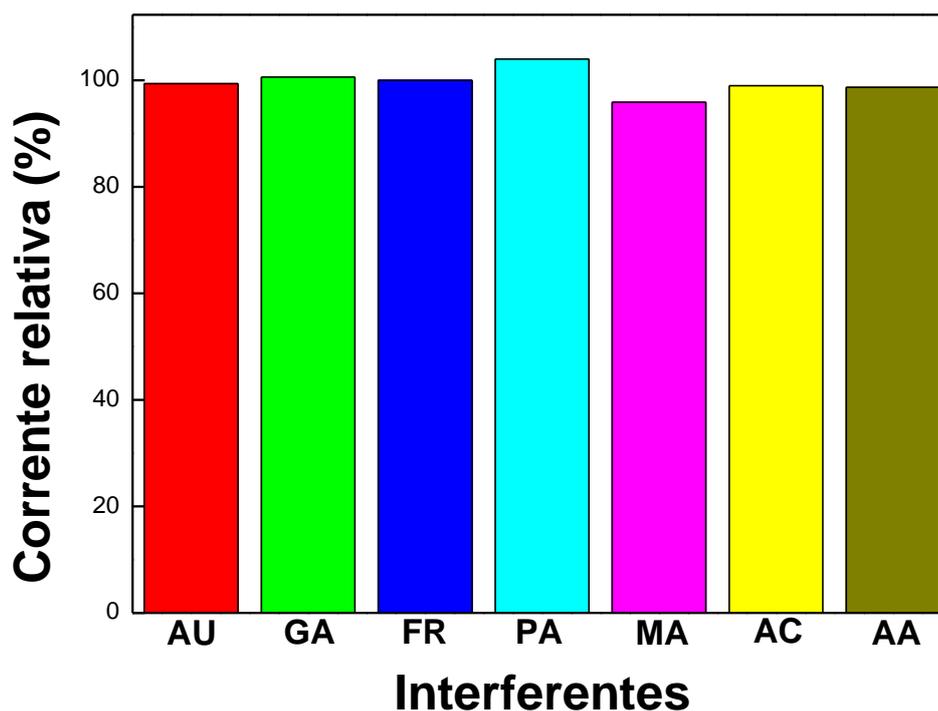


Figura 49: Corrente relativa (%) de interferentes em relação à concentração de glicose (GLU) $1,23 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. AA = ácido ascórbico; AU = ácido úrico; AC= ácido cítrico; MN= manose; GA= galactose; FR=frutose; PA = paracetamol.

Os componentes estudados foram considerados como não interferentes quando o erro relativo na medição de corrente foi menor 5%. Analisando então os interferentes estudados, o paracetamol e a manose provocaram maior diferença no sinal analítico frente à presença de glicose em solução. A presença do paracetamol influenciou o aumento da magnitude de corrente em 5%, enquanto a manose propiciou a queda de 5% do sinal analítico, aproximadamente.

Já para os demais interferentes (ácido úrico, ácido ascórbico, frutose, ácido cítrico e galactose) as influências nas correntes foram pouco significativas. Sendo a queda do sinal de corrente para ácido úrico, ácido ascórbico, ácido cítrico igual a 0,6%, 1,3% e 1%, respectivamente. Para galactose um incremento de 0,6% da corrente relativa quando comparada com uma solução de glicose na ausência de qualquer outra substância interferente foi observado.

O estudo dos possíveis interferentes na determinação de glicose não apresentou diferenças significativas nos valores de corrente relativa para a determinação do analito, confirmando a elevada seletividade ao biossensor proposto neste trabalho.

6 CONCLUSÃO

A viabilidade da formação das monocamadas auto-organizadas foi confirmada através do estudo eletroquímico por voltametria cíclica em uma solução de hexacianoferrato (III) de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As monocamadas formadas através da modificação do eletrodo de ouro durante 60 minutos em uma solução etanólica de 20 mmol L^{-1} de (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio foram as que apresentaram respostas eletroquímicas mais significativas.

A transferência eletrônica destas monocamadas auto-organizadas em solução de ferri-ferrocianeto de potássio apresentou-se do tipo misto, sendo mecanismo adsorptivo para baixas velocidades de varredura e difusionais para velocidades superiores e iguais a 25 mV s^{-1} . O valor calculado da taxa de transferência eletrônica, igual a $0,16 \text{ s}^{-1}$, apresentou-se efetivamente maior quando comparado aos valores relatados de outras monocamadas na literatura [104], corroborando a eficácia da modificação química dos eletrodos de ouro.

A pré-concentração com a mediador $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ foi efetiva, apresentando mecanismo eletrônico semelhante para diferentes tempos estudados nas monocamadas formadas por (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio. A transferência ocorre através da adsorção das moléculas na superfície do eletrodo modificado. A cobertura superficial das espécies eletroativas da molécula de hexacianoferrato apresentou-se na escala de nmol cm^{-2} , corroborando com os valores encontrados na literatura [104, 110].

O comportamento difusional apresentado no estudo da velocidade de varredura em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ foi análogo para a formação das diferentes SAM mistas ((11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio e 6-(ferrocenil)hexanotiol) quando comparado com o estudo realizado para monocamadas formadas por (11-mercaptoundecil)- N',N'',N''' -trimetilamônio.

A mediação eletrônica através do estudo de pré-concentração também foi viável com utilização do hexacianoferrato para monocamadas formadas com dois distintos tióis funcionais. Pode-se notar a similaridade entre os estudos para SAM (1:1) e (1:2), pois apresentaram transferência eletrônica controlada pelas moléculas confinadas na superfície do eletrodo modificado (mecanismo de adsorção) para 60 e 120 minutos. A transferência eletrônica é controlada pela diferença do gradiente de

concentração (difusão) para tempos de imobilização do mediador eletrônico superiores a 180 minutos.

O aumento da concentração das espécies eletroativas foi observado com a presença de maior concentração de 6-(ferrocenil)hexanotiol, porém esse incremento não foi expressivo. Os valores obtidos de cobertura superficial foram concordantes aos relatados na literatura, confirmando a eficiência do mediador hexacianoferrato na transferência eletrônica [110].

O desenvolvimento de um biossensor para determinação de glicose foi efetivo. Os rearranjos lineares da equação de Michaelis-Mentes evidencia a concordância entre os valores de K_m^{ap} e k_{obs} , confirmando também a eficácia do sensor. O biossensor apresentou uma boa seletividade frente ao ácido úrico, ácido cítrico, ácido ascórbico, manose, frutose, galactose e paracetamol.

7 ATIVIDADES FUTURAS

Posteriormente, como uma segunda etapa para a caracterização dos eletrodos quimicamente modificados por monocamadas altamente organizadas serão utilizadas:

- Microscopia de força atômica (AFM): Estudar as propriedades físicas das monocamadas (rugosidade, espessura e morfologia).
- Estudo da aplicabilidade do eletrodo modificado como biossensor em amostras reais de urina e sangue.
- Desenvolvimento de um biossensor bienzimático contendo *glicose oxidase* e *peroxidase*.
- Estudo da aplicabilidade do eletrodo modificado como biossensor de outros analitos (ácido desoxirribonucleico, peróxido de hidrogênio e ureia).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A. and KUBOTA, L. T. Self-assembled monolayers applications for the development of electrochemical sensors. **Quimica Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.
- [2] YU, Z. G.; ZAITOUNA, A. J. and LAI, R. Y. Effect of redox label tether length and flexibility on sensor performance of displacement-based electrochemical DNA sensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 812, n. p. 176-183, 2014.
- [3] MAZLOUM-ARDAKANI, M.; ABOLHASANI, M.; MIRJALILI, B. F.; SHEIKH-MOHSENI, M. A.; DEGHANI-FIROUZABADI, A. and KHOSHROO, A. Electrocatalysis of dopamine in the presence of uric acid and folic acid on modified carbon nanotube paste electrode. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 35, n. 2, p. 201-209, 2014.
- [4] KISUKURI, C. M.; MACEDO, A.; OLIVEIRA, C. C. S.; CAMARGO, P. H. C. and ANDRADE, L. H. Investigating the Influence of the Interface in Thiol-Functionalized Silver-Gold Nanoshells over Lipase Activity. **Langmuir**, v. 29, n. 51, p. 15974-15980, 2013.
- [5] KUMAR, S. A.; CHENG, H. W. and CHEN, S. M. Selective Detection of Uric Acid in the Presence of Ascorbic Acid and Dopamine Using Polymerized Luminol Film Modified Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, v. 21, n. 20, p. 2281-2286, 2009.
- [6] RICKERT, J.; WEISS, T. and GOPEL, W. Self-assembled monolayers for chemical sensors: Molecular recognition by immobilized supramolecular structures. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 31, n. 1-2, p. 45-50, 1996.
- [7] ARYA, S. K.; KONGSUPHOL, P.; WONG, C. C.; POLLA, L. J. and PARK, M. K. Label free biosensor for sensitive human influenza virus hemagglutinin specific antibody detection using coiled-coil peptide modified microelectrode array based platform. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 194, n. p. 127-133, 2014.
- [8] SUGAWARA, K.; FUKUSHI, H.; HOSHI, S. and AKATSUKA, K. Electrochemical sensing of glucose at a platinum electrode with a chitin/glucose oxidase film. **Analytical Sciences**, v. 16, n. 11, p. 1139-1143, 2000.
- [9] CHAKI, N. K. and VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, n. 1-2, p. 1-12, 2002.
- [10] MOSES, P. R.; WIER, L. and MURRAY, R. W. Chemically Modified Tin Oxide Electrode. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 1882-1886, 1975.
- [11] LANE, R. F. and HUBBARD, A. T. Electrochemistry of Chemisorbed Molecules .1. Reactants Connected to Electrodes through Olefinic

- Substituents. **Journal of Physical Chemistry**, v. 77, n. 11, p. 1401-1410, 1973.
- [12] ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURAN, N. and KUBOTA, L. T. Amperometric biosensors for phenolic compounds determination in the environmental interest samples. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.
- [13] PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D. and KUBOTA, L. T. Trends in amperometric electrodes modification for electroanalytical applications. **Quimica Nova**, v. 25, n. 6A, p. 1012-1021, 2002.
- [14] CANCINO, J. C. **Eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas de alcanotióis: Uma abordagem sobre a transferência eletrônica**. 2008. 109 f. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP.
- [15] WANG, J. Modified Electrodes for Electrochemical Sensors. **Electroanalysis**, v. 3, n. 4-5, p. 255-259, 1991.
- [16] ALBAREDA-SIRVENT, M.; MERKOCI, A. and ALEGRET, S. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 69, n. 1-2, p. 153-163, 2000.
- [17] DOWNARD, A. J. Electrochemically assisted covalent modification of carbon electrodes. **Electroanalysis**, v. 12, n. 14, p. 1085-1096, 2000.
- [18] GARCIA, C. A. B.; NETO, G. D. and KUBOTA, L. T. New fructose biosensors utilizing a polypyrrole film and D-fructose 5-dehydrogenase immobilized by different processes. **Analytica Chimica Acta**, v. 374, n. 2-3, p. 201-208, 1998.
- [19] SUN, W.; WANG, X. Z.; WANG, Y. H.; JU, X. M.; XU, L.; LI, G. J. and SUN, Z. F. Application of graphene-SnO₂ nanocomposite modified electrode for the sensitive electrochemical detection of dopamine. **Electrochimica Acta**, v. 87, n. p. 317-322, 2013.
- [20] LEI, W.; WU, Q. J.; SI, W. M.; GU, Z. Y.; ZHANG, Y. H.; DENG, J. P. and HAO, Q. L. Electrochemical determination of imidacloprid using poly(carbazole)/chemically reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 183, n. p. 102-109, 2013.
- [21] HONG, X. P. and MA, J. Y. Electrochemical study of sulfadiazine on a novel phthalocyanine-containing chemically modified electrode. **Chinese Chemical Letters**, v. 24, n. 4, p. 329-331, 2013.
- [22] KARADAG, M.; GEYIK, C.; DEMIRKOL, D. O.; ERTAS, F. N. and TIMUR, S. Modified gold surfaces by 6-(ferrocenyl)hexanethiol/dendrimer/gold nanoparticles as a platform for the mediated biosensing applications. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 33, n. 2, p. 634-640, 2013.

- [23] MERLI, D.; ZAVARISE, F.; TREDICI, I.; PESAVENTO, M. and PROFUMO, A. Characterization and Analytical Applications of a Coenzyme-A Chemically Modified Gold Electrode. **Electroanalysis**, v. 24, n. 4, p. 825-832, 2012.
- [24] TURRYAN, I. and MANDLER, D. Chemically-Modified Electrode for the Determination of Gold - an Electrochemical and Spectrophotometric Study. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 349, n. 7, p. 491-496, 1994.
- [25] PROFUMO, A.; FAGNONI, M.; MERLI, D.; QUARTARONE, E.; PROTTI, S.; DONDI, D. and ALBINI, A. Multiwalled carbon nanotube chemically modified gold electrode for inorganic as speciation and Bi(III) determination. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 12, p. 4194-4199, 2006.
- [26] BIGELOW, W. C.; PICKETT, D. L. and ZISMAN, W. A. Oleophobic Monolayers .1. Films Adsorbed from Solution in Non-Polar Liquids. **Journal of Colloid Science**, v. 1, n. 6, p. 513-538, 1946.
- [27] ALLARA, D. L. and NUZZO, R. G. Spontaneously Organized Molecular Assemblies .1. Formation, Dynamics, and Physical-Properties of Normal-Alkanoic Acids Adsorbed from Solution on an Oxidized Aluminum Surface. **Langmuir**, v. 1, n. 1, p. 45-52, 1985.
- [28] LEIGH, S. J.; PRIETO, J. L.; BOWEN, J.; LEWIS, S.; ROBINSON, A. P. G.; IQBAL, P. and PREECE, J. A. Controlling gold nanoparticle assembly on electron beam-reduced nitrophenyl self-assembled monolayers via electron dose. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 433, n. p. 181-190, 2013.
- [29] POURBEYRAM, S. and SHERVEDANI, R. K. Electrochemical monitoring of the interaction of UO₂²⁺ with immobilized DNA. **Bioelectrochemistry**, v. 92, n. p. 27-31, 2013.
- [30] LA BELLE, J. T.; FAIRCHILD, A.; DEMIROK, U. K. and VERMA, A. Method for fabrication and verification of conjugated nanoparticle-antibody tuning elements for multiplexed electrochemical biosensors. **Methods**, v. 61, n. 1, p. 39-51, 2013.
- [31] BERTOK, T.; SEDIVA, A.; KATRLIK, J.; GEMEINER, P.; MIKULA, M.; NOSKO, M. and TKAC, J. Label-free detection of glycoproteins by the lectin biosensor down to attomolar level using gold nanoparticles. **Talanta**, v. 108, n. p. 11-18, 2013.
- [32] ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533-1554, 1996.
- [33] COX, J. A.; TESS, M. E. and CUMMINGS, T. E. Electroanalytical methods based on modified electrodes: A review of recent advances. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 173-223, 1996.
- [34] CLARIDGE, S. A.; LIAO, W. S.; THOMAS, J. C.; ZHAO, Y. X.; CAO, H. H.; CHEUNKAR, S.; SERINO, A. C.; ANDREWS, A. M. and WEISS, P. S. From

the bottom up: dimensional control and characterization in molecular monolayers. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 7, p. 2725-2745, 2013.

- [35] LABORDA, E.; HENSTRIDGE, M. C.; BATCHELOR-MCAULEY, C. and COMPTON, R. G. Asymmetric Marcus-Hush theory for voltammetry. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 12, p. 4894-4905, 2013.
- [36] BISHOP, A. R. and NUZZO, R. G. Self-assembled monolayers: Recent developments and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 1, n. 1, p. 127-136, 1996.
- [37] FERREIRA, M.; CAETANO, W.; ITRI, R.; TABAK, M. and OLIVEIRA, O. N. Characterization techniques to investigate molecular-level interactions in Langmuir and Langmuir-Blodgett. **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 502-510, 2005.
- [38] PERSSON, B. A Chemically Modified Graphite Electrode for Electrocatalytic Oxidation of Reduced Nicotinamide Adenine-Dinucleotide Based on a Phenothiazine Derivative, 3-Beta-Naphthoyl-Toluidine Blue-O. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 287, n. 1, p. 61-80, 1990.
- [39] BATCHELDER, D. N.; EVANS, S. D.; FREEMAN, T. L.; HAUSSLING, L.; RINGSDORF, H. and WOLF, H. Self-Assembled Monolayers Containing Polydiacetylenes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 3, p. 1050-1053, 1994.
- [40] MIRSKY, V. M. New electroanalytical applications of self-assembled monolayers. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 6-7, p. 439-450, 2002.
- [41] MIRSKY, V. M.; VASJARI, M.; NOVOTNY, I.; REHACEK, V.; TVAROZEK, V. and WOLFBEIS, O. S. Self-assembled monolayers as selective filters for chemical sensors. **Nanotechnology**, v. 13, n. 2, p. 175-178, 2002.
- [42] SANTOS, V. N.; CABRAL, M. F.; FERREIRA, J. S.; HOLANDA, A. K. M.; MACHADO, S. A. S.; SOUSA, J. R.; LOPES, L. G. F.; CORREIA, A. N. and NETO, P. D. Study of a gold electrode modified by trans-[Ru(NH₃)₄(Ist)SO₄](+) to produce an electrochemical sensor for nitric oxide. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 16, p. 5686-5692, 2011.
- [43] PAULO, T. D.; DA SILVA, M. A. S.; PINHEIRO, S. D.; MEYER, E.; PINHEIRO, L. S.; FREIRE, J. A.; TANAKA, A. A.; DE LIMA, P.; MOREIRA, I. D. and DIOGENES, I. C. N. 5-(4-pyridinyl)-1,3,4-oxadiazole-2-thiol on gold: SAM formation and electroactivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 4, p. 711-719, 2008.
- [44] DE LIMA-NETO, P.; PARENTE, M. M. V.; MOREIRA, I. S.; DIOGENES, I. C. N.; MATTOS, O. R.; BARCIA, O. E.; SANTOS, R. P. and FREIRE, V. N. AFM and hydrodynamic electrochemical characterization of the self-assembled 1,4-dithiane on gold surface. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 603, n. 1, p. 21-26, 2007.

- [45] PORTER, M. D.; BRIGHT, T. B.; ALLARA, D. L. and CHIDSEY, C. E. D. Spontaneously Organized Molecular Assemblies .4. Structural Characterization of Normal-Alkyl Thiol Monolayers on Gold by Optical Ellipsometry, Infrared-Spectroscopy, and Electrochemistry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 12, p. 3559-3568, 1987.
- [46] DE SOUSA, J. R.; PARENTE, M. M. V.; DIOGENES, L. C. N.; LOPES, L. G. F.; NETO, P. D.; TEMPERINI, M. L. A.; BATISTA, A. A. and MOREIRA, I. D. A correlation study between the conformation of the 1,4-dithiane SAM on gold and its performance to assess the heterogeneous electron-transfer reactions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 566, n. 2, p. 443-449, 2004.
- [47] PAULO, T. D.; PINHEIRO, S. D.; DA SILVA, M. A. S.; LOPES, L. G. D.; PINHEIRO, L. S.; AQUINO, G. F. A.; TEMPERINI, M. L. A.; NETO, P. D. and DIOGENES, I. C. N. Thionicotinamide SAM on Gold: Adsorption Studies and Electroactivity. **Electroanalysis**, v. 21, n. 9, p. 1081-1089, 2009.
- [48] VERICAT, C.; VELA, M. E.; BENITEZ, G.; CARRO, P. and SALVAREZZA, R. C. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1805-1834, 2010.
- [49] CORRY, A. J.; MOONEY, A.; O'SULLIVAN, D. and KENNY, P. T. M. Synthesis, characterization and in vitro anti-cancer activity of N-(ferrocenyl)benzoyl tri- and tetrapeptide esters. **Inorganica Chimica Acta**, v. 362, n. 9, p. 2957-2961, 2009.
- [50] MA, H.; ACTON, O.; HUTCHINS, D. O.; CERNETIC, N. and JEN, A. K. Y. Multifunctional phosphonic acid self-assembled monolayers on metal oxides as dielectrics, interface modification layers and semiconductors for low-voltage high-performance organic field-effect transistors. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 41, p. 14110-14126, 2012.
- [51] CHENG, M. S.; HO, J. S.; LAU, S. H.; CHOW, V. T. K. and TOH, C. S. Impedimetric microbial sensor for real-time monitoring of phage infection of Escherichia coli. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 47, n. p. 340-344, 2013.
- [52] HE, Y.; SHAO, Q.; CHEN, S. F. and JIANG, S. Y. Water Mobility: A Bridge between the Hofmeister Series of Ions and the Friction of Zwitterionic Surfaces in Aqueous Environments. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 31, p. 15525-15531, 2011.
- [53] RUBIN, S.; BAR, G.; TAYLOR, T. N.; CUTTS, R. W. and ZAWODZINSKI, T. A. Novel approach for the preparation of metal colloid monolayers on modified surfaces. **Journal of Vacuum Science & Technology A**, v. 14, n. 3, p. 1870-1877, 1996.
- [54] YAO, X.; YANG, M. L.; WANG, Y. F. and HU, Z. B. Study of the ferrocenylalkanethiol self-assembled monolayers by electrochemical surface plasmon resonance. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 122, n. 2, p. 351-356, 2007.

- [55] DAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S. and KUBOTA, L. T. Electrochemical properties of self-assembled monolayer based on mono-(6-deoxy-6-mercapto)-beta-cyclodextrin toward controlled molecular recognition. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 4, p. 1945-1953, 2007.
- [56] LIU, J. X.; XU, X. M.; TANG, L. and ZENG, G. M. Determination of trace mercury in compost extract by inhibition based glucose oxidase biosensor. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 19, n. 1, p. 235-240, 2009.
- [57] CLARK, L. C. and LYONS, C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29-&, 1962.
- [58] MARQUES, P. R. B. O. and YAMANAKA, H. Biosensors Based on the Enzymatic Inhibition Process. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.
- [59] WANG, J. From DNA biosensors to gene chips. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 16, p. 3011-3016, 2000.
- [60] ZHANG, W.; ZHANG, X.; ZHANG, L. Y. and CHEN, G. Fabrication of carbon nanotube-nickel nanoparticle hybrid paste electrodes for electrochemical sensing of carbohydrates. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 192, n. p. 459-466, 2014.
- [61] FACCENDINI, P. L.; RIBONE, M. E. and LAGIER, C. M. Selective application of two rapid, low-cost electrochemical methods to quantify glycerol according to the sample nature. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 193, n. p. 142-148, 2014.
- [62] LI, H. J.; LI, M. J.; GUO, W. L.; DI, H. R.; FANG, C. R. and YANG, B. H. Electrochemical application of titanium dioxide nanoparticle/gold nanoparticle/multiwalled carbon nanotube nanocomposites for nonenzymatic detection of ascorbic acid. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 18, n. 2, p. 477-485, 2014.
- [63] YANG, Z. P.; ZHANG, C. J.; ZHANG, J. X. and BAI, W. B. Potentiometric glucose biosensor based on core-shell Fe₃O₄-enzyme- polypyrrole nanoparticles. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 51, n. p. 268-273, 2014.
- [64] GUPTA, V. K.; YOLA, M. L.; QURESHI, M. S.; SOLAK, A. O.; ATAR, N. and USTUNDAG, Z. A novel impedimetric biosensor based on graphene oxide/gold nanopatform for detection of DNA arrays. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 188, n. p. 1201-1211, 2013.
- [65] PRIVETT, B. J.; SHIN, J. H. and SCHOENFISCH, M. H. Electrochemical sensors. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 12, p. 4499-4517, 2008.
- [66] HANTZSCHE, E.; MATTHES, A.; NOCKE, A. and CHERIF, C. Characteristics of carbon fiber based strain sensors for structural-health monitoring of textile-reinforced thermoplastic composites depending on the textile technological

- integration process. **Sensors and Actuators a-Physical**, v. 203, n. p. 189-203, 2013.
- [67] LI, K. W.; LIU, G. G.; WU, Y. H.; HAO, P.; ZHOU, W. C. and ZHANG, Z. Q. Gold nanoparticle amplified optical microfiber evanescent wave absorption biosensor for cancer biomarker detection in serum. **Talanta**, v. 120, n. p. 419-424, 2014.
- [68] SINGH, H. K.; BASUMATARY, T.; CHETIA, D. and BEZBORUAH, T. Fiber Optic Sensor for Liquid Volume Measurement. **Ieee Sensors Journal**, v. 14, n. 4, p. 935-936, 2014.
- [69] FAN, X. D.; WHITE, I. M.; SHOPOVA, S. I.; ZHU, H. Y.; SUTER, J. D. and SUN, Y. Z. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 620, n. 1-2, p. 8-26, 2008.
- [70] MARALDO, D. and MUTHARASAN, R. Mass-change sensitivity of high-order mode of piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever (PEMC) sensors: Theory and experiments. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 143, n. 2, p. 731-739, 2010.
- [71] CHEN, M. Reconfiguration of Sustainable Thermoelectric Generation Using Wireless Sensor Network. **Ieee Transactions on Industrial Electronics**, v. 61, n. 6, p. 2776-2783, 2014.
- [72] HATAMI, M.; FARMANY, A. and SAHRAEI, R. Physisorption & Chemisorption of Oxygen Molecules on Single- and Multi-walled Carbon Nanotubes. **Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures**, v. 22, n. 5, p. 434-453, 2014.
- [73] ARDYANIAN, M.; MOEINI, M. and JUYBARI, H. A. Thermoelectric and photoconductivity properties of zinc oxide-tin oxide binary systems prepared by spray pyrolysis. **Thin Solid Films**, v. 552, n. p. 39-45, 2014.
- [74] TURNER, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 8, p. 3184-3196, 2013.
- [75] ZHANG, S.; WRIGHT, G. and YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 15, n. 5-6, p. 273-282, 2000.
- [76] MOTA, F.; ALLERSTON, C. K.; HAMPDEN-SMITH, K.; GARTHWAITE, J. and SELWOOD, D. L. Surface plasmon resonance using the catalytic domain of soluble guanylate cyclase allows the detection of enzyme activators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 4, p. 1075-1079, 2014.
- [77] KHOSHRO, H.; ZARE, H. R. and VAFAZADEH, R. Electrocatalytic measurement of H₂O₂ concentration using bis(N-2-methylphenyl-salicylidenaminato)copper(II) spiked in a carbon paste electrode. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 35, n. 2, p. 247-254, 2014.

- [78] FATIBELLO, O. C., M. D.. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n. 01, p. 28-39, 1992.
- [79] SOTOMAYOR, M. D. T.; RAIMUNDO, I. M.; NETO, G. O. and KUBOTA, L. T. Bi-enzymatic optode detection system for oxalate determination based on a natural source of enzyme. **Analytica Chimica Acta**, v. 447, n. 1-2, p. 33-40, 2001.
- [80] SOTOMAYOR, M. D. T.; TANAKA, A. A. and KUBOTA, L. T. Development of an enzymeless biosensor for the determination of phenolic compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 455, n. 2, p. 215-223, 2002.
- [81] BAI, X. Y.; CHEN, G. H. and SHIU, K. K. Electrochemical biosensor based on reduced graphene oxide modified electrode with Prussian blue and poly(toluidine blue O) coating. **Electrochimica Acta**, v. 89, n. p. 454-460, 2013.
- [82] ALVI, N. H.; RODRIGUEZ, P. E. D. S.; GOMEZ, V. J.; KUMAR, P.; AMIN, G.; NUR, O.; WILLANDER, M. and NOTZEL, R. Highly efficient potentiometric glucose biosensor based on functionalized InN quantum dots. **Applied Physics Letters**, v. 101, n. 15, p. 2012.
- [83] ARAUJO, A. N.; LIMA, J. L. F. C.; PINTO, P. C. A. G. and SARAIVA, M. L. M. F. S. Enzymatic Determination of Glucose in Milk Samples by Sequential Injection Analysis. **Analytical Sciences**, v. 25, n. 5, p. 687-692, 2009.
- [84] NEWMAN, J. D. and TURNER, A. P. F. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 20, n. 12, p. 2435-2453, 2005.
- [85] NAKABAYASHI, Y.; HIROSAKI, Y. and YAMAUCHI, O. Dipolar ruthenium(II) ammine complexes as electron transfer mediators of amperometric glucose sensors. **Bioelectrochemistry**, v. 69, n. 2, p. 216-222, 2006.
- [86] SCHUHMANN, W.; ZIMMERMANN, H.; HABERMULLER, K. V. and LAURINAVICIUS, V. Electron-transfer pathways between redox enzymes and electrode surfaces: Reagentless biosensors based on thiol-monolayer-bound and polypyrrole-entrapped enzymes. **Faraday Discussions**, v. 116, n. p. 245-255, 2000.
- [87] KRANZ, C.; WOHLSCHLAGER, H.; SCHMIDT, H. L. and SCHUHMANN, W. Controlled electrochemical preparation of amperometric biosensors based on conducting polymer multilayers. **Electroanalysis**, v. 10, n. 8, p. 546-552, 1998.
- [88] UPDIKE, S. J. and HICKS, G. P. Enzyme Electrode. **Nature**, v. 214, n. 5092, p. 986-8, 1967.
- [89] MARTINEZ, C. C. M.; TREO, E. F.; MADRID, R. E. and FELICE, C. C. Real-time measurement of glucose using chrono-impedance technique on a second generation biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 29, n. 1, p. 200-203, 2011.

- [90] FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; MELLO, L. D. and KUBOTA, L. T. Direct electron transfer: An approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 230-243, 2003.
- [91] HENDRY, S. P.; CARDOSI, M. F.; TURNER, A. P. F. and NEUSE, E. W. Polyferrocenes as Mediators in Amperometric Biosensors for Glucose. **Analytica Chimica Acta**, v. 281, n. 3, p. 453-459, 1993.
- [92] JIA, J. B.; WANG, B. Q.; WU, A. G.; CHENG, G. J.; LI, Z. and DONG, S. J. A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: Self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 9, p. 2217-2223, 2002.
- [93] XIAO, X. L.; ZHOU, B.; ZHU, L.; XU, L. L.; TAN, L.; TANG, H.; ZHANG, Y. Y.; XIE, Q. J. and YAO, S. Z. An reagentless glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on poly(methylene blue) doped silica nanocomposites. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 165, n. 1, p. 126-132, 2012.
- [94] JANEGITZ, B. C.; PAULIUKAITE, R.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A. and FATIBELLO, 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. 411-417, 2011.
- [95] STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H. and ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 159-173, 2003.
- [96] WILKINS, E. and ATANASOV, P. Glucose monitoring: State of the art and future possibilities. **Medical Engineering & Physics**, v. 18, n. 4, p. 273-288, 1996.
- [97] BRETT, C. M. A. and BRETT, A. M. O. *Electrochemistry : principles, methods, and applications*. Oxford ; New York, Oxford University Press 1993, p.
- [98] BARD, A. J. and FAULKNER, L. R. *Electrochemical methods : fundamentals and applications*. New York, Wiley 2001, p.
- [99] MATSUMIYA, M.; TERAZONO, M. and TOKURAKU, K. Temperature dependence of kinetics and diffusion coefficients for ferrocene/ferricenium in ammonium-imide ionic liquids. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 7, p. 1178-1183, 2006.
- [100] JI, X. B.; CHEVALLIER, F. G.; CLEGG, A. D.; BUZZEO, M. C. and COMPTON, R. G. The electrochemical reduction of aqueous hexamminecobalt(III): Studies of adsorption behaviour with fast scan voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 581, n. 2, p. 249-257, 2005.

- [101] RADULOVIC, V.; ALEKSIC, M. M. and KAPETANOVIC, V. An electrochemical study of the adsorptive behaviour of varenicline and its interaction with DNA. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, n. 10, p. 1409-1422, 2012.
- [102] LAVIRON, E. General Expression of the Linear Potential Sweep Voltammogram in the Case of Diffusionless Electrochemical Systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 19-28, 1979.
- [103] TEIXEIRA, M. F. S.; DOCKAL, E. R. and CAVALHEIRO, E. T. G. Sensor for cysteine based on oxovanadium(IV) complex of Salen modified carbon paste electrode. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 106, n. 2, p. 619-625, 2005.
- [104] MENDES, R. K. **Investigação dos efeitos dos procedimentos de Imobilização em Monocamadas Auto-organizadas da Enzima Peroxidase no Desenvolvimento de um Biossensor**. 2006. 1-35 f. Tese de doutorado - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- [105] COELHO, D. **Caracterização Eletroquímica de uma monocamada auto-organizada mista composta por ácido 3-mercaptopropiônico e ácido 11-mercaptoundecanóico**. 2011. 120 f. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- [106] TRAMMELL, S. A. and LEBEDEV, N. Proton-coupled electron transfer in self-assembled monolayers containing quinone compounds with different bridging groups of varying electronic conjugation. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 632, n. 1-2, p. 127-132, 2009.
- [107] NISHIMORI, Y.; KANAIZUKA, K.; KURITA, T.; NAGATSU, T.; SEGAWA, Y.; TOSHIMITSU, F.; MURATSUGU, S.; UTSUNO, M.; KUME, S.; MURATA, M. and NISHIHARA, H. Superior Electron-Transport Ability of pi-Conjugated Redox Molecular Wires Prepared by the Stepwise Coordination Method on a Surface. **Chemistry-an Asian Journal**, v. 4, n. 8, p. 1361-1367, 2009.
- [108] DIAO, P.; JIANG, D. L.; CUI, X. L.; GU, D. P.; TONG, R. T. and ZHONG, B. Studies of structural disorder of gold supported thiol-lipid bilayers. **Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology Section a-Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 337, n. p. 169-172, 1999.
- [109] CANNES, C.; KANOUEFI, F. and BARD, A. J. Cyclic voltammetry and scanning electrochemical microscopy of ferrocenemethanol at monolayer and bilayer-modified gold electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 547, n. 1, p. 83-91, 2003.
- [110] MENDES, R. K.; CARVALHAL, R. F. and KUBOTA, L. T. Effects of different self-assembled monolayers on enzyme immobilization procedures in peroxidase-based biosensor development. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 612, n. 2, p. 164-172, 2008.
- [111] ULMAN, A.; EVANS, S. D.; SHNIDMAN, Y.; SHARMA, R. and EILERS, J. E. Mixed Alkanethiol Monolayers on Gold Surfaces - Wetting and Stability

- Studies. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 39, n. p. 175-224, 1992.
- [112] DAMOS, F. S.; MENDES, R. K. and KUBOTA, L. T. Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (BIO)sensors. **Quimica Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.
- [113] HOBARA, D.; SASAKI, T.; IMABAYASHI, S. and KAKIUCHI, T. Surface structure of binary self-assembled monolayers formed by electrochemical selective replacement of adsorbed thiols. **Langmuir**, v. 15, n. 15, p. 5073-5078, 1999.
- [114] PEREIRA, C. M. P.; VENZKE, D. and TROSSINI, G. H. G. Synthesis of Bioactive Heterocyclic Ferrocene Derivatives. **Quimica Nova**, v. 36, n. 1, p. 143-152, 2013.
- [115] LEE, T. Y.; CHIANG, P. R.; TSAI, M. C.; LIN, C. Y. and HUANG, J. H. From diacetylferrocene to 1,1'-ferrocenyldiimines: Substituent effects on synthesis, molecular structure, electrochemical behavior and optical absorption property. **Journal of Molecular Structure**, v. 935, n. 1-3, p. 102-109, 2009.
- [116] MOLINERO, V. and CALVO, E. J. Electrostatic interactions at self assembled molecular films of charged thiols on gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 445, n. 1-2, p. 17-25, 1998.
- [117] LEE, J. B.; NAMGUNG, M.; LEE, S. B. and OH, S. Y. Fabrication of an electrically conductive mixed self-assembled monolayer and its application in an electrochemical immunosensor. **Ultramicroscopy**, v. 108, n. 10, p. 1352-1355, 2008.
- [118] LAVIRON, E. and ROULLIER, L. General Expression of the Linear Potential Sweep Voltammogram for a Surface Redox Reaction with Interactions between the Adsorbed Molecules - Applications to Modified Electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 65-74, 1980.
- [119] DO CARMO, D. R.; DA SILVA, R. M. and STRADIOTTO, N. R. Electrochemical study of Fe[Fe(CN)(5)NO] in graphite paste electrode. **Ecletica Quimica**, v. 27, n. p. 197-210, 2002.
- [120] LI, Z. H.; LIU, Y. Q.; MERTENS, S. F. L.; POBELOV, I. V. and WANDLOWSKI, T. From Redox Gating to Quantized Charging. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 23, p. 8187-8193, 2010.
- [121] FUJII, S.; KUROKAWA, S.; MURASE, K.; LEE, K. H.; SAKAI, A. and SUGIMURA, H. Self-assembled mixed monolayer containing ferrocenylthiol molecules: STM observations and electrochemical investigations. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 13, p. 4436-4442, 2007.
- [122] SHAH, H. H.; AL-BALUSHI, R. A.; AL-SUTI, M. K.; KHAN, M. S.; WOODALL, C. H.; SUDLOW, A. L.; RAITHY, P. R.; KOCIOK-KOHN, G.; MOLLOY, K. C. and MARKEN, F. New Multi-Ferrocenyl- and Multi-Ferricenyl- Materials via

- Coordination-Driven Self-Assembly and via Charge-Driven Electro-Crystallization. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n. 20, p. 12012-12022, 2013.
- [123] NAKABAYASHI, Y.; WAKUDA, M. and IMAI, H. Amperometric glucose sensors fabricated by electrochemical polymerization of phenols on carbon paste electrodes containing ferrocene as an electron transfer mediator. **Analytical Sciences**, v. 14, n. 6, p. 1069-1076, 1998.
- [124] KUMAR, A. S. and ZEN, J. M. Electrochemical investigation of glucose sensor fabricated at copper-plated screen-printed carbon electrodes. **Electroanalysis**, v. 14, n. 10, p. 671-678, 2002.
- [125] NASRI, Z. and SHAMS, E. A glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized onto glassy carbon electrode modified with nitrophenyl diazonium salt. **Electrochimica Acta**, v. 112, n. p. 640-647, 2013.
- [126] CHEN, H. J.; ZHU, J. J. and YU, M. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase on Graphene-ZnO Nanocomposite Modified Glassy Electrode and Its Application for Glucose Biosensing. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1243-1248, 2013.
- [127] HE, H. L.; XU, X. L.; WU, H. X.; ZHAI, Y. J. and JIN, Y. D. In Situ Nanoplasmonic Probing of Enzymatic Activity of Monolayer-Confined Glucose Oxidase on Colloidal Nanoparticles. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 9, p. 4546-4553, 2013.
- [128] HUANG, F. Y.; WANG, F.; FENG, S. Q.; LI, Y. J.; LI, S. X. and LI, Y. C. Direct electrochemistry and electrochemical biosensing of glucose oxidase based on CdSe@CdS quantum dots and MWNT-modified electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 17, n. 5, p. 1295-1301, 2013.
- [129] KHODADADEI, F.; GHOURCHIAN, H.; SOLTANIEH, M.; HOSSEINALIPOUR, M. and MORTAZAVIC, Y. Rapid and clean amine functionalization of carbon nanotubes in a dielectric barrier discharge reactor for biosensor development. **Electrochimica Acta**, v. 115, n. p. 378-385, 2014.