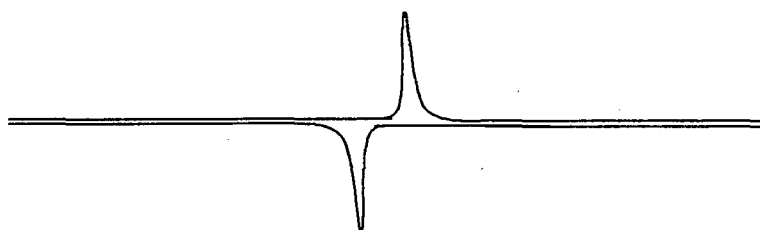


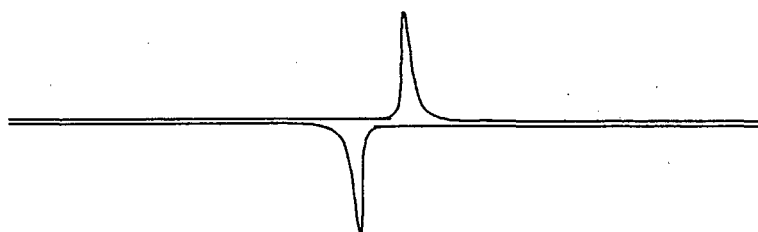
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



TESE

“QUITOSANA COMO POLÍMERO MODIFICADOR DE ELETRODOS SÓLIDOS”



REINALDO CARVALHO SILVA

ORIENTADOR PROF. IVAN GONÇALVES DE SOUZA

FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA

FEVEREIRO DE 2000

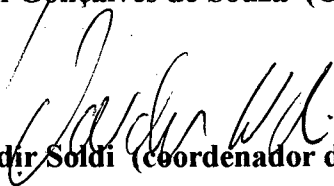
QUITOSANA COMO POLÍMERO MODIFICADOR DE ELETRODOS SÓLIDOS

REINALDO CARVALHO SILVA

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do grau de Doutor em Química e aprovada em sua forma final pelo orientador e demais membros da banca examinadora.

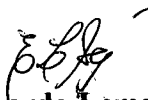


Prof. Dr. Ivan Gonçalves de Souza (Orientador)

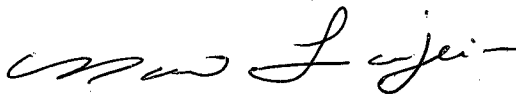


Prof. Dr. Valdir Soldi (coordenador do curso de Pós-graduação em Química)

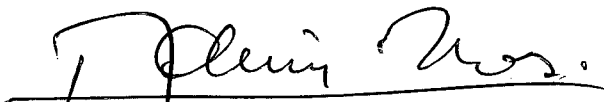
Banca examinadora



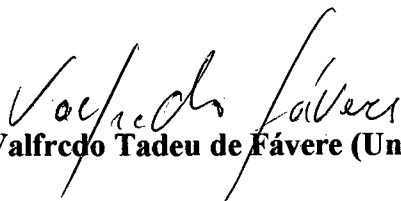
Prof. Dr. Eduardo Lemos de Sá (Universidade Federal do Paraná)



Prof. Dr. Mauro César M. Laranjeira (Universidade Federal de Santa Catarina)



Prof. Dr. Ademir Neves (Universidade Federal de Santa Catarina)



Prof. Dr. Valfredo Tadeu de Fávère (Universidade Federal de Santa Catarina)

Thesis

As defesas de tese são tão assépticas!

Tão puras e tão arrumadas.

E ao mesmo tempo, tão distantes da realidade que as gerou!

Elas não contam a história

Dos fragorosos erros e geniais intuições

Dos tropeções no escuro

E do progresso sem método

Dos inusitados acertos

Ou do sofrimento e da vontade de desistir.

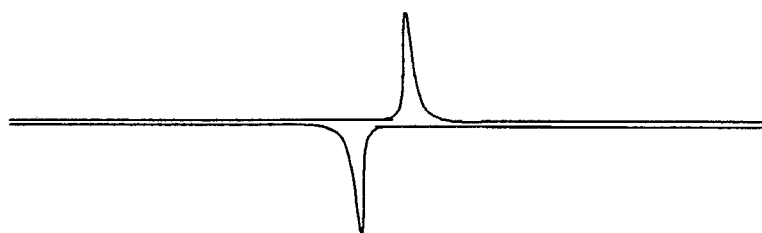
Com início, meio e “happy end”

As teses contam uma história que não ocorreu.

As teses mentem.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a Roberto, Vívian, Rafael e Bruno.



AGRADECIMENTOS

Assinado por poucos, este trabalho, em realidade, contou com a participação de muitas pessoas. Somos extremamente gratos a

Prof. Ivan G. Souza, pela orientação.

Prof. Eduardo Lemos de Sá, pela atenta revisão da parte escrita, com valiosas sugestões.

Prof. Mauro M. Laranjeira, pela co-orientação.

Prof. Orlando Fatibello-Filho pela atenta revisão da parte escrita, cessão de grafite eletroquímico, tecido de batata doce e orientação da parte experimental final.

Prof. Adilson Curtius, pelo estímulo, por preciosos conselhos e pela facilidade no uso de diversos equipamentos.

Prof. Ademir Neves, pela paciente orientação em química do rutênio e eletroquímica e por, no momento exato, haver incluído pentaaminrutênio em sua bagagem. A seus gentis orientandos Cristina, Adolfo e Maurício, pelo contínuo e profícuo diálogo sobre química de coordenação e eletroquímica.

Prof. César Franco e em especial seus orientandos: Marcos de Paula, Ilana e Marlon, pela gentil cessão de $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ e ácido trifluoroacético, além do profícuo diálogo sobre eletroquímica.

Prof. Eduardo Stadler (*in memoriam*), pela cessão de potenciostato e outros materiais, além de orientações sobre voltametria.

Profa. Teresa Cristina pelo sempre gentil atendimento.

Prof. Clóvis Rodrigues, pela entusiástica, gentil e competente orientação na síntese e voltametria de polímeros redox de quitosana.

Prof. Almir Spineli por, no momento exato, mostrar-nos onde ficavam os picos voltamétricos da platina.

Profa. Lígia Furlan, pela atenciosa, simpática e eternamente bem-humorada orientação sobre fisico-química da quitosana.

Joni Stolberg, pelas atenciosas orientações sobre fisico-química da quitosana.

Prof. Valfredo de Fávère, em cuja tese obtivemos preciosas informações.

Nezi Júlio Neto, funcionário responsável pelo laboratório de graduação de química quantitativa, pela infinita boa vontade que nos possibilitou o irrestrito uso do potenciostato.

Profa. Dirce Pozebon e prof. Valderi Dressler, por muitas coisas, mas em especial pelas determinações de rutênio por espectrometria de massas.

José Borba Bento, pelas valiosas orientações na redação da monografia.

Edgard Ganzarolli, pela infinita generosidade com que dispõe de seu tempo em favor dos demais e por representar para todos nós, da analítica, um elevado e irresistível padrão de qualidade.

Profa. Angélica Marin, pelo estímulo à reflexão.

Prof. Arilson Lehmkuhl, por orientações no domínio da informática.

César Giacomozzi, por inúmeras orientações no domínio da informática.

Prof. Anchieta Gomes por valiosos conselhos.

Profs. Alfredo Tibúrcio, Valdir Soldi e Marli Silveira Soldi, por orientações sobre diálise de polímeros e cessão da membrana dialítica.

Prof. Emerson Meyer, por orientações sobre as reações com DCC.

Prof. Ricardo C. Silva, pela redação dos "abstracts" dos artigos.

Prof. Reinaldo Corrêa, pela revisão do português.

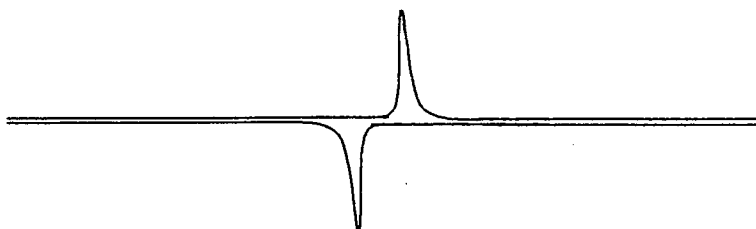
Sr. Rodrigo Martins, pela gentil cessão das penas de lula.

Camilo, Úrsula, Teresa, João e Jessee, pelo apoio e por tanto que se privaram do pai e esposo para que este trabalho pudesse ser executado e registrado por escrito.

QUITOSANA COMO POLÍMERO MODIFICADOR DE ELETRODOS SÓLIDOS

OBJETIVO

Preparar polímeros redox com matriz de quitosana (QTS), estudar algumas possibilidades de modificação de eletrodos por quitosana ou por seus polímeros redox e as aplicações analíticas de tais dispositivos.



QUITOSANA COMO POLÍMERO MODIFICADOR DE ELETRODOS SÓLIDOS

CONTEÚDO

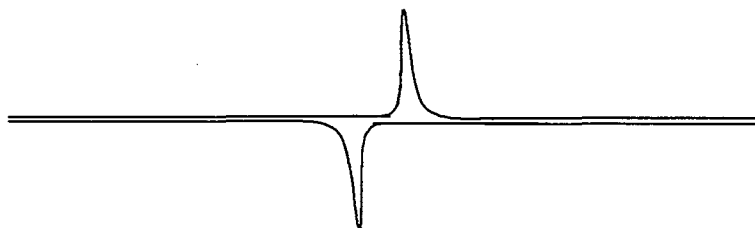
Esta monografia, submetida a aquisição de doutorado, registra, por escrito, os estudos teóricos e práticos realizados durante o período compreendido entre março de 1995 a novembro de 1999, na direção dos objetivos apresentados. A introdução (capítulo 1) abrange uma extensa revisão da literatura pertinente, procurando alcançar todos os fundamentos importantes para o desenvolvimento dos trabalhos experimentais e compreensão dos resultados encontrados, em seus múltiplos aspectos. Este capítulo divide-se em sete partes, como se discrimina abaixo.

| | |
|--|----|
| 1.1) Fundamentos de voltamperometria..... | 1 |
| 1.2) A matriz polimérica, sua estrutura, reatividade e propriedades elétricas..... | 15 |
| 1.3) Biossensores..... | 53 |
| 1.4) Imobilização de enzimas..... | 59 |
| 1.5) Conexão elétrica de centros redox de enzimas com eletrodos..... | 65 |
| 1.6) Biossensores e sistemas FIA..... | 72 |
| 1.7) Rutênio e os polímeros redox..... | 79 |

Em seguida, o capítulo 2 apresenta os resultados experimentais, organizados em: experimental (materiais, equipamentos e métodos), resultados, discussões e conclusão. Este capítulo divide-se em seis partes, discriminadas abaixo.

| | |
|---|-----|
| 2.1) Construção de eletrodos artesanais..... | 85 |
| 2.2) Estudos com o polímero redox de quitosana modificada por piridina e ligada a pentacianoferrato(II)..... | 85 |
| 2.3) Síntese e estudos com o polímero redox QTS-[Ru(bpy) ₂ Cl] ⁺²⁺ , derivado de quitosana e bisbipybisclororutênio(II)..... | 97 |
| 2.4) Síntese e estudos com o polímero redox QTS-[Ru(NH ₃) ₅] ^{2+/3+} , derivado de quitosana e cloreto de pentaaminmonoclororutênio(III)..... | 122 |

| | |
|--|-----|
| 2.5) Desenvolvimento de um sistema em fluxo para determinação de oxigênio dissolvido usando célula com eletrodo modificado pelo polímero QTS-[Ru(NH ₃) ₅] ^{2+/3+} | 136 |
| 2.6) Estudo de aplicação do polímero QTS-[Ru(NH ₃) ₅] ^{2+/3+} em biossensor usando tecido de batata doce desidratado como fonte de peroxidase..... | 146 |
| Lista de figuras..... | vi |
| Lista de tabelas..... | ix |
| Lista de siglas, símbolos e abreviaturas..... | x |
| Resumo..... | xii |
| Abstract..... | xvi |



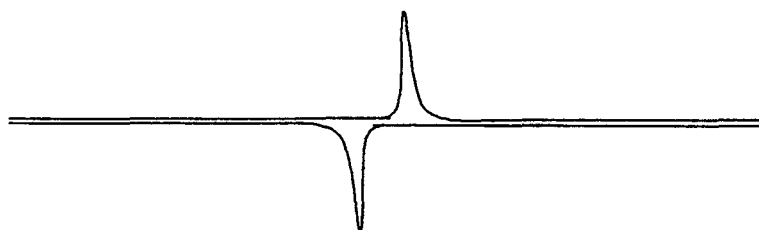
QUITOSANA COMO POLÍMERO MODIFICADOR DE ELETRODOS SÓLIDOS

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 01. Representação esquemática dos vetores de velocidade de..... | 2 |
| Figura 02. Perfis de concentração de espécie eletroativa nas imediações de um eletrodo..... | 3 |
| Figura 03. Potencial aplicado e corrente resultante..... | 3 |
| Figura 04. Perfil de concentrações em potencial tal que haja apenas..... | 4 |
| Figura 05. Linearidade de corrente versus concentração da espécie eletroativa, obtida..... | 5 |
| Figura 06. Correntes não-faradaicas a potencial constante..... | 7 |
| Figura 07. Estrutura de carga na região vizinha ao eletrodo e curva do potencial..... | 7 |
| Figura 08. Correntes não-faradaicas a potencial variado..... | 8 |
| Figura 09. Corrente obtida ao variar o potencial em região de espécies..... | 9 |
| Figura 10. Perfis de concentração da espécie eletroativa em valores de potenciais que..... | 9 |
| Figura 11. Se o potencial for ciclado como mostra à esquerda, a corrente..... | 10 |
| Figura 12. Preparação de quitina..... | 15 |
| Figura 13. Estrutura da quitina 100% acetilada..... | 16 |
| Figura 14. Desacetilação de quitina..... | 17 |
| Figura 15. Ligações de hidrogênio que provocam..... | 20 |
| Figura 16. A influência de pH e força iônica sobre a viscosidade de..... | 22 |
| Figura 17. Diferentes conformações de cadeias poliméricas de quitosana controlam a..... | 22 |
| Figura 18. Coagulação de argila coloidal por polieletrólito catiônico..... | 27 |
| Figura 19. Taxas de extração de alguns íons metálicos sobre 200mg de quitosana..... | 31 |
| Figura 20. Diferentes possibilidades interativas entre um íon metálico e a quitosana..... | 34 |
| Figura 21. Quitosana protonada como extrator de Cr VI..... | 36 |
| Figura 22. Representação simbólica do efeito do íon sulfato..... | 37 |
| Figura 23. Curva de corrente vs potencial para filme de quitosana seca..... | 40 |
| Figura 24. O voltamograma ao lado foi obtido com o eletrodo de..... | 43 |
| Figura 25. Espectro na região do infravermelho para quitosana..... | 46 |
| Figura 26. Curvas de titulação para solução de quitosana protonada por HCl..... | 51 |
| Figura 27. Biossensores: produção e transdução do sinal analítico..... | 53 |
| Figura 28. Biossensor de Clark (1962)..... | 54 |
| Figura 29. Dosador de medicamento auto-regulado..... | 56 |

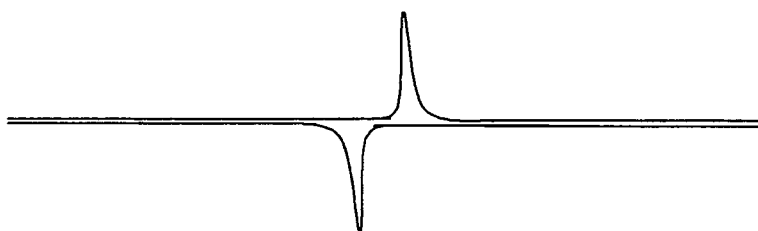
| | |
|--|-----|
| Figura 30. Titulação amperométrica de cloro residual em águas..... | 65 |
| Figura 31. Bromato como mediador na oxidação eletrolítica da glicose..... | 66 |
| Figura 32. Oxidação eletrolítica da glicose com mediação enzimática..... | 67 |
| Figura 33. Oxigênio como mediador difusional na oxidação eletrolítica..... | 68 |
| Figura 34. Ferroceno como mediador não difusional da glicose oxidase..... | 69 |
| Figura 35. Polímeros redox..... | 70 |
| Figura 36. Etapas fundamentais da análise química instrumental..... | 73 |
| Figura 37. Etapas fundamentais das determinações em fluxo contínuo..... | 73 |
| Figura 38. Instrumentação em FIA..... | 76 |
| Figura 39. Voltamograma do polímero redox QTS- $[Fe(CN)_5]^{3-}$ | 94 |
| Figura 40. Sinal correspondente à prata acumulada na superfície do..... | 104 |
| Figura 41. Sinal de prata com picos mais simétricos..... | 105 |
| Figura 42. Sinal de prata após polimento da superfície..... | 106 |
| Figura 43. Modelo estrutural para a superfície do eletrodo de..... | 107 |
| Figura 44. Voltamograma do polímero redox QTS- $[Ru(bpy)_2Cl]^+$ | 109 |
| Figura 45. Espectros de absorção molecular em UV-Vis para as..... | 110 |
| Figura 46. Voltamograma após síntese <i>in situ</i> em meio aquoso..... | 112 |
| Figura 47. Voltamograma após síntese <i>in situ</i> em meio orgânico..... | 113 |
| Figura 48. Voltamograma durante a síntese aquosa <i>in situ</i> | 114 |
| Figura 49. Voltamograma durante a síntese aquosa <i>in situ</i> | 115 |
| Figura 50. Sobreposição do voltamograma do quinto ciclo da Figura 46 com..... | 116 |
| Figura 51. Voltamograma durante a síntese <i>in situ</i> em DMA..... | 117 |
| Figura 52. Sobreposição do primeiro voltamograma com aquele obtido após..... | 118 |
| Figura 53. Voltamograma do polímero redox QTS- $[Ru(bpy)_2Cl]^+$ reticulado à..... | 119 |
| Figura 54. Protótipo de biossensor e sua resposta à glicose..... | 120 |
| Figura 55. Avaliação do rendimento relativo da reação <i>ex situ</i> através da..... | 128 |
| Figura 56. Espectro de absorção molecular do polímero redox QTS- $[Ru(NH_3)_5]^{3+}$ | 129 |
| Figura 57. Voltamograma do polímero redox QTS- $[Ru(NH_3)_5]^{3+/2+}$ | 131 |
| Figura 58. Voltamogramas de eletrodo modificado pelo..... | 132 |
| Figura 59. Voltamogramas do eletrodo modificado pelo..... | 133 |
| Figura 60. Peça contendo eletrodo base da célula amperométrica tubular..... | 137 |
| Figura 61. Peça que constitui o eletrodo auxiliar da célula amperométrica tubular..... | 138 |

| | |
|---|-----|
| Figura 62. Célula amperométrica tubular..... | 138 |
| Figura 63. Diagrama de fluxos para estudos sobre determinação de..... | 139 |
| Figura 64. Voltamograma de oxigênio dissolvido na célula amperométrica tubular..... | 141 |
| Figura 65. Diagrama obtido, no sistema ilustrado na Figura 60, para..... | 142 |
| Figura 66. Curva analítica para oxigênio dissolvido..... | 144 |
| Figura 67. Voltamogramas para peróxido de hidrogênio com diferentes..... | 149 |
| Figura 68. Curvas analíticas para peróxido de hidrogênio..... | 151 |



QUITOSANA COMO POLÍMERO MODIFICADOR DE ELETRODOS SÓLIDOS**LISTA DE TABELAS**

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Polímeros derivados da quitosana por reações de Schiff..... | 38 |
| Tabela 2. Biossensores Eletroquímicos..... | 55 |
| Tabela 3. Comportamento eletroquímico do polímero redox QTS ^{py} [Fe(CN) ₅] ^{2-/3-} em..... | 90 |
| Tabela 4 - λ _{máx} das espécies de rutênio..... | 130 |
| Tabela 5. Resposta voltamétrica a oxigênio dissolvido obtida por vários eletrodos..... | 134 |
| Tabela 6. Correntes de pico nos fiagrama x OD..... | 143 |
| Tabela 7. Correntes catódicas x concentração de H ₂ O ₂ | 150 |



QUITOSANA COMO POLÍMERO MODIFICADOR DE ELETRODOS SÓLIDOS

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ag/AgCl – Eletrodo de referência de prata-cloreto de prata com solução saturada de KCl.

AMP - Monofosfato de adenosina.

ATP - Trifosfato de adenosina.

Bpy - O ligante bipyridina.

CENA - Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

C / C_s – Relação entre as concentrações de uma espécie eletroativa: no seio da solução e na superfície do eletrodo.

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio.

DCC – Diciclohexilcarbodiimida.

DMA – Dimetilacetamida.

DMF - Dimetilformamida.

Dpr – Desvio padrão relativo.

E – Enzima.

ΔE – Diferença de potencial elétrico.

ECS – Eletrodo de referência de calomelano com solução saturada de KCl.

EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético.

E_{pa} e E_{pc} – Potencial de pico anódico e potencial de pico catódico.

E^0 – Potencial redox padrão (diferença de potencial versus eletrodo padrão de hidrogênio).

$E_{1/2}$ – Potencial de meia-onda.

EtOH – Etanol.

ex situ – Fora do local. Longe da superfície do eletrodo.

FAD – Dinucleotídeo de flavina e adenosina.

Fc – Ferroceno.

Fc^+ - Ferricínio.

FIA – Análise por injeção em fluxo.

HTFA – Ácido trifluoroacético.

i – Corrente elétrica.

ipc e ipa – Corrente de pico catódica e corrente de pico anódica.

in situ – No local. Na superfície do eletrodo.

in vivo – No organismo vivo.

NAD – Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida.

NADH – Forma reduzida do dinucleotídeo de adenina e nicotinamida.

pX – Inverso do logaritmo da atividade do íon X.

Py ou py – O ligante piridina ou o grupo piridil.

QTS – A matriz polimérica de quitosana.

QTS-NH₂ – Quitosana não modificada.

QTS-NH₃⁺ – Quitosana não modificada e protonada.

QTS[^]py – Quitosana modificada por piridil via ponte CH₂.

QTS[^]py-[Fe(CN)₅]^{2+/3+} – O polímero redox de quitosana modificada por piridil, contendo o complexo pentacianoferrato.

QTS[^]pyH⁺ – Quitosana modificada por piridil via ponte CH₂, protonado no N piridínico.

QTS-[Ru(bpy)₂Cl]⁺²⁺ – O polímero redox de quitosana modificada pelo complexo bisbipymonoclororutênio (II).

QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+} – O polímero redox de quitosana modificada pelo complexo pentaminrutênio (III).

RMN – Ressonância magnética nuclear.

TBD – Tecido de batata doce desidratado.

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina.

USP – Universidade de São Paulo.

Uv-vis – Região do espectro do ultravioleta e visível.

vs – Versus. Em relação a. Tendo como referência.

λ_{máx} – Comprimento de onda correspondente ao pico de absorbância.

δ - Espessura da camada de difusão de Nernst.

QUITOSANA COMO POLÍMERO MODIFICADOR DE ELETRODOS SÓLIDOS

RESUMO

A primeira intenção deste trabalho foi a de produzir um biossensor em que a enzima glicose oxidase estivesse ancorada à superfície eletródica via polímero redox de quitosana. A mediação da transferência eletrônica, entre o centro redox enzimático e o eletrodo, seria promovida pelo complexo metálico do polímero redox. Partiu-se, então, de $\text{QTS}^{\text{py}}[\text{Fe}(\text{CN})_5]^{2-/3-}$, um polímero de quitosana (QTS) modificada por piridil e $[\text{Fe}(\text{CN})_5]^{3-}$. Este polímero foi produzido no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, apresentando-se como um sólido avermelhado, solúvel em ácido acético 2% aquoso e contendo $1,08 \times 10^{-3}$ mol Fe/g de polímero. Alguns estudos foram feitos com tal metalo-polímero: a influência do pH sobre o comportamento voltamétrico; a estabilidade frente à luz, tempo e temperatura; a imobilização na superfície eletródica por formação de filme e o acoplamento à enzima glicose oxidase (comportamento voltamétrico como biossensor para glicose). Os resultados obtidos nesta etapa mostraram que o polímero estudado perdia sua hidrofiliabilidade em pH 7, acarretando acentuada queda nas correntes de pico e aumento no afastamento entre os potenciais de pico nos voltamogramas quando comparados ao pH 3. Os filmes obtidos na superfície de eletrodos de carbono vítreo e epóxi grafitada por evaporação da solução que dissolvia o polímero, embora estáveis a tempo e temperatura, não foram aderentes, soltando-se no eletrólito de suporte. O acoplamento à glicose oxidase não foi efetivo também. Este problema foi explicado por um cálculo da carga líquida do polímero. Revelando-se um poliânion, o polímero redox disponibilizado não seria capaz de efetivo acoplamento à outra estrutura polianiónica como glicose oxidase.

Esta primeira etapa permitiu situar melhor o problema da imobilização de enzimas em eletrodos via acoplamento a um polímero redox de quitosana e, considerando que os resultados obtidos não foram favoráveis ao uso de $\text{QTS}^{\text{py}}[\text{Fe}(\text{CN})_5]^{2-/3-}$ para a construção de biossensores, o trabalho foi redirecionado no sentido de: obter um outro polímero redox de quitosana que fosse bastante hidrofílico e catiônico, mesmo em pH 7; sua imobilização sobre a superfície de um eletrodo sólido e seu efetivo acoplamento a glicose oxidase.

A segunda etapa deste trabalho diz respeito a diversos estudos sobre a síntese de um polímero redox por reação de quitosana com o complexo $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$. Em quase todos, a reação de quitosana com o complexo foi conduzida em meio homogêneo, com água como solvente, ficando a aquação do complexo por conta do íon prata, que retira o cloro da esfera de coordenação. Em meio heterogêneo, um estudo foi realizado com quitosana sólida, usando dimetilacetamida ou dimetilformamida como solvente para o complexo. Em dois estudos, tentou-se a síntese *in situ*, partindo-se de um eletrodo de carbono vítreo modificado covalentemente por quitosana em lugar do polímero livre em solução. Em outros três estudos, partindo-se do princípio de que, sendo mais duro, Ru III teria maior chance de ligar-se ao NH_2 da quitosana, tentou-se produzir o polímero redox *in situ*, pondo-se em contato quitosana (depositada sobre eletrodo de ouro ou platina) com o complexo em água ou dimetilacetamida. Nestes casos, o potencial foi aplicado num valor tal que pudesse promover a oxidação $\text{Ru II} \rightarrow \text{Ru III}$. Uma vez imobilizado covalentemente sobre carbono vítreo, o polímero redox preparado *ex situ* foi estudado por voltametria cíclica. Verificou-se o acoplamento entre o polímero redox produzido *ex situ* e a glicose oxidase, ambos em solução. Estudou-se a resposta à glicose de um protótipo de biossensor com filme de polímero redox-enzima. Os resultados alcançados nesta etapa revelaram que um polímero redox catiônico com matriz de quitosana, solúvel em meio neutro aquoso com centro mediador de $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}^+$ e perfeitamente acoplável à glicose oxidase pode ser obtido reagindo-se uma solução aquosa de quitosana no pH 6, com $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ClOH}_2^+$. Estas condições de reação precisaram ser mantidas por 5h à temperatura de 70°C. Alternativamente, o polímero redox pode ser produzido na própria superfície do eletrodo. Nesta versão, uma solução aquosa ácida de quitosana foi gotejada na superfície do eletrodo e após a evaporação do solvente, o eletrodo foi mergulhado em solução de $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ (em dimetilacetamida). Depois disto, foi aplicado um potencial apropriado para, eletroquimicamente, gerar Ru III. Estas condições foram mantidas por 4h. O grau de rutenação alcançado nestas sínteses foi de apenas 2%. Este baixo valor provavelmente foi a causa de deslocamentos dos potenciais de pico nos voltamogramas não menores que 100mV, devido à queda ôhmica. A imobilização do polímero redox sobre a superfície do eletrodo não foi resolvida nesta etapa. Um bom sinal eletroquímico após imobilização

covalente do polímero redox preparado *ex situ* não foi possível e o mesmo resultado foi alcançado pela reação da quitosana previamente ancorada. Tais conclusões determinaram o redirecionamento do trabalho no sentido de uma nova síntese de um polímero redox com mais elevado conteúdo de Ru. Provavelmente este polímero produzisse um voltamograma cíclico mais próximo da ausência de deslocamento dos potenciais de pico com correntes intensas e estáveis. Procurou-se um complexo cujo centro metálico fosse de Ru III. Uma vez que neste estado de oxidação, o rutênio é mais duro que Ru II, possivelmente propiciaria reação mais favorável com o grupo amino da quitosana. Secundariamente, buscou-se um ligante que fosse mais duro que bipyridina, porque está associado a valores mais baixos de $E_{1/2}$, inibindo interferências.

A terceira etapa do trabalho consistiu na síntese de um novo polímero redox por reação de quitosana com $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$ e sua resposta voltamétrica a oxigênio dissolvido. Basicamente, a síntese *ex situ* aquosa seguiu a mesma estratégia descrita para $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$: após remoção por prata do cloro da esfera de coordenação, o complexo foi reagido com solução aquosa de quitosana. A reação foi conduzida em pH 3 e em pH 5 e acompanhada por espectroscopia na região do ultravioleta, que permitiu avaliar o rendimento relativo nos dois casos. Após purificação por diálise, o rendimento absoluto foi avaliado pelo grau de rutenação, via espectrometria de massas. A solução do polímero redox obtido e purificado foi evaporada sobre a superfície de eletrodo metálico e o comportamento eletroquímico avaliado por voltametria cíclica. Este polímero foi imobilizado covalentemente sobre carbono vítreo. Comparou-se a resposta voltamétrica a oxigênio dissolvido, obtida por eletrodos de carbono (carbono vítreo, pasta de carbono e epóxi grafitada) não modificados e modificados pelo polímero redox $\text{QTS}-[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{2+/3+}$.

Apesar das previsões favoráveis ao complexo de rutênio III em relação ao do rutênio II, a síntese aquosa usando $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{OH}_2]^{3+}$ conduziu ao grau de rutenação, obtido por espectrometria de massas, de apenas 0,75%. Este resultado foi alcançado para pH 5 que mostrou-se melhor que o pH 3. Quando imobilizado covalentemente sobre carbono vítreo, o voltamograma do polímero redox $\text{QTS}-[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{2+/3+}$ ficou longe da situação ideal para espécie imobilizada na superfície do eletrodo, mas apesar disto, descobriu-se que este

eletrodo respondia a oxigênio dissolvido de modo mais sensível que o eletrodo não modificado. Este mesmo padrão foi seguido pelos outros eletrodos de carbono.

Na quarta etapa deste trabalho construiu-se uma célula amperométrica tubular usando epóxi grafitada modificada pelo polímero redox QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+} como eletrodo de trabalho. Com esta célula montou-se um sistema em fluxo para determinação de oxigênio dissolvido em soluções aquosas, cuja calibração foi feita por intermédio do método titulométrico de Winckler. Apesar do ruído gerado por pequenas cavidades de nitrogênio (usado para desaerar as soluções), o sistema operou a cerca de 30 amostras h⁻¹, gerando curvas analíticas com sensibilidade de 1,21 μA / mgO₂ L⁻¹ e coeficiente de correlação de 0,996. O limite de detecção, desaerando as soluções com nitrogênio comum, foi 1,171 mg L⁻¹. O sinal de uma solução com 7,529 mg O₂ L⁻¹ não demonstrou interferência quando foram misturados 4 mg Cl₂ L⁻¹.

A quinta etapa deste trabalho diz respeito ao uso do polímero redox QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+} como mediador de uma oxi-redutase. Os testes foram no sentido da construção de um biossensor, usando tecido de batata doce desidratado (TBD) como fonte de peroxidase. Este material foi imobilizado em um eletrodo de pasta de carbono. O sinal voltamétrico em eletrólito desaerado, para crescentes concentrações de H₂O₂, foi estudado em diferentes versões: eletrodo de pasta de carbono sem modificações; eletrodo de pasta de carbono contendo apenas o polímero mediador QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+}; eletrodo de pasta de carbono contendo só TBD e eletrodo de pasta de carbono contendo TBD + o polímero QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+}. A fim de comparar a eficiência mediadora do polímero com a do oxigênio nas condições estudadas, foi feito mais um ensaio: eletrodo de pasta de carbono contendo só TBD em eletrólito saturado de O₂. Os resultados obtidos, arranjados sob a forma de curvas analíticas, mostraram linearidade e sensibilidade bem superiores para o caso “TBD + polímero mediador”.

ABSTRACT**CHITOSAN AS SOLID ELECTRODES MODIFIER-POLYMER**

The first intention of this work was to produce a biosensor in which the glucose oxidase enzyme was immobilized over electrode surface by means of a chitosan redox polymer. The process of electron transfer mediation between the redox center of enzyme and the electrode would be provided by means of the metal complex of redox polymer. It started, then, from QTS^{py}[Fe(CN)₅]^{2-/3-}, a redox-polymer where chitosan (QTS) was modified with piridil and [Fe(CN)₅]³⁻. This polymer was produced in the Departamento de Química of Universidade de Santa Catarina being a red solid, soluble in 2% aqueous acetic acid and having an iron content of $1,08 \times 10^{-3}$ mol Fe/g of polymer. Many studies were carried out concerning this metal-polymer: the pH influence in the voltammetric behavior, the stability over light, time and temperature, the immobilization on electrode surface by means of film formation and the coupling to glucose oxidase (voltammetric behavior as glucose biosensor). The results obtained in this stage shows that the polymer loses its hidrofilycity in pH 7, wIELDING to voltammograms having a decrease in the peak current and increase in the displacement of peak potentials when compared to pH 3. Films formed over glassy carbon and graphite loaded epoxi surfaces by dropping the polymer solution and providing solvent evaporation, although stables to time light and temperature, didn't adhere well, being lost onto electrolyte solution. The coupling to glucose oxidase was not effective either. This problem was explained by a polymer net charge calculation. Showing to be a polianionic structure the available polymer wouldn't be able to effective coupling with another polianionic structure such as glucose oxidase.

This first step allows a better view of problem on electrode enzyme immobilization by means of a chitosan redox-polymer and, taking in account that reached results are not favorable to the use of QTS^{py}[Fe(CN)₅]^{2-/3-} in the construction of glucose biosensor, the aims of this work were turned to the synthesis of another chitosan redox-polymer that could be very hydrophilic and cationic even on pH 7, its immobilization over a solid electrode surface and its effective coupling to glucose oxidase.

The second step of this work is related to many studies on synthesis of a redox polymer through reaction of chitosan with the $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ complex. In almost all the attempts, the reaction was conducted in homogeneous media using water as solvent, being the aquation of the complex done by means of silver ion which is needed to displace chlorine atom of coordination sphere. In heterogeneous media one study was carried out, using solid chitosan and dimethylacetamide or dimethylformamide as solvent to the complex. In two studies was experimented the synthesis *in situ* using a chitosan covalently modified vitreous carbon electrode instead of free polymer in solution. In another three studies, taking in account that Ru III, being harder than Ru II, possibly could be easily linked to NH_2 chitosan group, it was experimented the synthesis of redox polymer *in situ* by reacting chitosan on the gold or platinum electrode surface with water or dimethylacetamide as solvent for complex. In these cases the potential was applied in such a value that could promote the oxidation $\text{Ru II} \rightarrow \text{Ru III}$ in the complex. The *ex situ* prepared redox-polymer once immobilized over vitreous carbon was studied by cyclic voltammetry. It was verified the coupling between the *ex situ* prepared redox-polymer and glucose oxidase, both in solution. It was studied the response to glucose of a biosensor prototype using an enzyme-redox-polymer film. The reached results on this step shows that a cationic redox-polymer based on a chitosan matrix and soluble in an aqueous neutral media, having mediation center of $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}^+$ and perfectly linkable to glucose oxidase could be obtained, through the reaction of chitosan aqueous solution in the pH of 6 with $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ClOH}_2^+$. Those conditions of reaction must be maintained for 5 hours in the temperature of 70°C . Alternatively the redox-polymer could be produced on the electrode surface itself. In this version, a chitosan aqueous acid solution was dropped on the electrode surface and after solvent evaporation, the electrode was dipped on a dimethylacetamide solution of $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$. After this a suitable potential was applied to the system in order to electrochemically produce Ru III. Those conditions were kept for 4 hours. The ruthenation degree obtained on this synthesis was only 2%. This poor value probably was the cause of a displacement on cyclic voltammogram peak potentials not less than 100mV due of ohmic drop. The problem of redox-polymer immobilization over the electrode surface was not solved in this step. A good electrochemical signal after covalent immobilization of the *ex situ* prepared redox-polymer

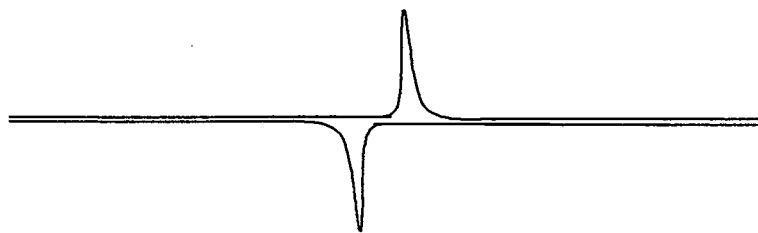
was not possible and the same result was achieved by reacting chitosan previously immobilized over electrode surface. Such conclusions turned the work in the way of a new synthesis producing a redox-polymer having higher Ru content. Probably this polymer would produce a cyclic voltammogram nearer of null peak potential displacement, intense and stable currents. It was planned to use a complex where the metallic center had Ru III. Once in this oxidation state ruthenium is harder than Ru II possibly it would have more favorable reaction with the chitosan amino group. Besides this a harder ligand than bipyridine was intended too, because this is related to lower $E_{1/2}$ values and lower interference.

The third step of this work was the synthesis of a redox-polymer through the reaction of chitosan with $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$ and its voltammetric response to dissolved oxygen. Basically the *ex situ* in aqueous media synthesis follows the same strategy as described for $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$. After the displacement of chlorine atom in the coordination sphere by silver ions, the complex was reacted with chitosan aqueous solution. This reaction was carried out in both pH of 3 and 5 and the relative yield was measured by UV-Vis spectroscopy. After dialysis purification the absolute yield was evaluated by ruthenation degree determined by the mass spectrometry method. The prepared and purified redox-polymer solution was evaporated over a metallic electrode surface and the electrochemical behavior was evaluated by cyclic voltammetry. This polymer was covalently immobilized over vitreous carbon. The voltammetric response to oxygen was compared for vitreous carbon, carbon paste and graphite loaded epoxi electrodes modified and non-modified with the QTS- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{2+/3+}$ redox-polymer.

In spite of a favorable prediction to the Ru III complex, the aqueous synthesis using $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{OH}_2]^{3+}$ lead to a product having only 0,75% ruthenation degree, as obtained by mass spectrometry. This result was obtained by working at pH 5, which has seen to be better than pH 3. When covalently immobilized over vitreous carbon surface the QTS- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{2+/3+}$ redox-polymer had an voltammogram that was far from ideal situation expected for any surface immobilized specie but, in spite of this, it was discovered that this electrode responded to oxygen in a way that is much more sensitive than the non-modified electrode. This pattern of behavior was followed by the others carbon electrodes.

In the fourth step of this work it was constructed a tubular amperometric cell using graphite loaded epoxy modified with the QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+} redox-polymer as working electrode. Using this cell a manifold for FIA system was mounted and it was used for dissolved oxygen determination in aqueous solution. The standardization was carried out by the Winckler titrimetric method. In spite of the noise produced by small nitrogen bubbles, the system operated at 30 samples per hour producing a sensitivity of 1,21 μA / mgO₂ L⁻¹ and a correlation coefficient of 0,996. The limit of detection was 1,171 mg L⁻¹ when common nitrogen gas was used in the solution desoxygenation. A solution having 7,529 mg O₂ L⁻¹ had given a signal which was not affected when was mixed a 4 mg Cl₂ L⁻¹ solution.

The fifth step of this work is concerned with the use of the QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+} polymer as an oxi-reductase mediator. The tests were in the sense of construction of a biosensor using dry sweet potato tissue (TBD) as a peroxidase source. This material was immobilized on a carbon paste electrode and the voltammetric signal was studied in various electrode configurations for increasing H₂O₂ concentrations, using deoxygenated electrolyte. The electrodes configuration were unmodified carbon paste electrode, a carbon paste electrode containing only the QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+} mediator polymer, a carbon paste electrode containing only TBD and a carbon paste electrode containing TBD + QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+} polymer. In order to establish a comparison with the mediation efficiency of the polymer against oxygen, it was made one more essay using carbon paste electrode containing only TBD in an O₂ saturated electrolyte. The obtained results were arranged in an analytical calibration curves and shows linearity and sensitivity much better for the TBD + mediator polymer case.



CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

1.1- Eletroquímica: voltametria e amperometria

Há dois grupos de técnicas eletroquímicas de especial interesse para os propósitos deste trabalho: a voltametria cíclica e a amperometria. A estrutura eletroquímica mais simples, relacionada aos nossos objetivos, é composta de um par de eletrodos mergulhados em uma solução. A energia elétrica aplicada à solução, via eletrodos, é controlada através da diferença de potencial elétrico, medida em volt, a eles aplicada. Mudando a diferença de potencial, muda também a energia e, quando esta energia atinge valores apropriados, um processo redox pode ser induzido na solução. A corrente elétrica, medida em ampères, que atravessa o circuito é determinada pela taxa em que os processos redox ocorrem na interface eletrodo-eletrólito. Neste esquema simplificado, a voltametria abarca o conjunto de técnicas em que avalia-se a corrente gerada em um sistema como o descrito, durante uma varredura de potenciais aplicados aos eletrodos. A amperometria consiste em medir a corrente produzida quando fixa-se o potencial em um valor, prévia e criteriosamente escolhido. Neste caso, a corrente passa a depender de outras variáveis que afetam a cinética dos processos redox, sendo a concentração da espécie eletroativa aquela de interesse para a química analítica¹⁻⁴.

Quando se trata de estudar um processo redox, especialmente rica em informações é a voltametria cíclica. Neste caso, após transpor a região de potenciais onde ocorre uma oxidação ou redução, o sentido da varredura é invertido permitindo obter informações sobre a reversibilidade dos processos. A escala de tempo do experimento é determinada pela velocidade de varredura. Fácil de realizar, a voltametria cíclica tornou-se ferramenta imprescindível quando se trata de caracterizar processos ocorrentes na superfície do eletrodo.

A seguir, apresenta-se discussão um pouco mais minuciosa destas técnicas, principiando pela **amperometria hidrodinâmica**.

-
1. Denaro, A. R.- Fundamentos de Eletroquímica. Editora Edgard Blucher, São Paulo, 1974.
 2. Skoog and Leary- Principles of Instrumental Analysis. 4th edition, Saunders Publishing, 1992.
 3. Faulkner, L. R. - Journal of Chemical Education 60:4 (1983) 262.
 4. Evans, D. H.; O'Connell, K. M.; Petersen, R. A.; Kelly, M. J.- Journal of Chemical Education 60:4 (1983) 291.

Devido ao atrito com as superfícies, um fluido que circula ao longo de um eletrodo plano em um sistema em fluxo, apresenta um perfil de velocidade ilustrado pela Figura 1.

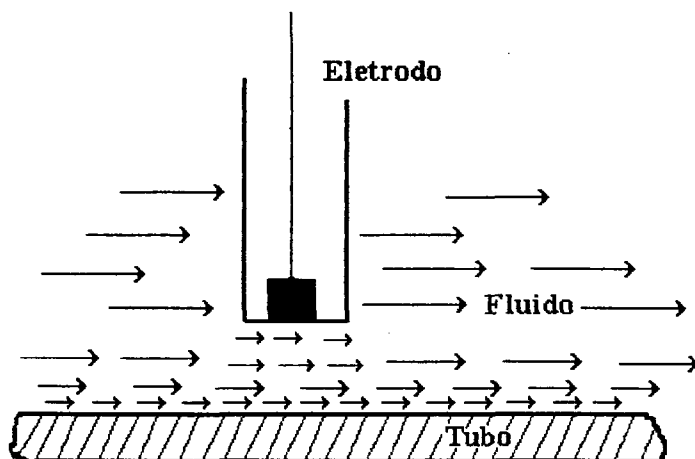


Figura 1. Representação esquemática dos vetores de velocidade de um fluido que percola um tubo atravessado por um eletrodo.

Ou seja: a velocidade do fluido cai com a proximidade das superfícies do tubo ou do eletrodo, de tal modo que, na imediata superfície do eletrodo, há uma camada estagnada, denominada **camada de difusão de Nernst**. Nesta região, o acesso da espécie eletroativa ao eletrodo se fará predominantemente por difusão.

Supondo que o eletrodo esteja corretamente polarizado, a espécie eletroativa sofrerá redução ou oxidação, a fim de acomodar suas concentrações das formas oxidada e reduzida em acordo com a equação de Nernst. Resulta então um gradiente de concentração da espécie eletroativa que determina a migração da forma oxidada ou reduzida até a superfície do eletrodo ou afastando-se dela. A espécie que foi gerada na superfície do eletrodo tenderá a afastar-se e a espécie reagente tenderá a migrar de regiões mais afastadas para a superfície. Como a velocidade de difusão é limitada pelo coeficiente de difusão da espécie eletroativa, sempre haverá um gradiente de concentração da espécie em solução. Este gradiente pode ser avaliado pelas curvas a seguir, representando, inicialmente, o comportamento de eletrodo em um sistema estático (Figura 2).

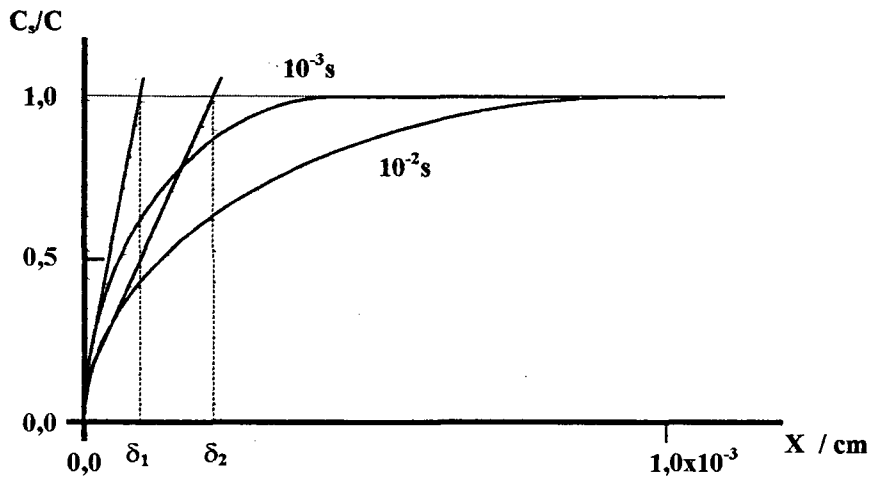


Figura 2. Perfis de concentração de espécie eletroativa nas imediações de um eletrodo

C_s - Concentração na superfície do eletrodo.

C - Concentração no seio da solução

X - Distância em relação à superfície do eletrodo.

$\delta_{1,2}$ - Camada de difusão (região em que o transporte é por difusão)

A corrente produzida é proporcional ao gradiente de concentração na superfície do eletrodo, ou seja, à inclinação das curvas no trecho inicial. Esta inclinação cai com o tempo (Figura 2), a corrente se comportando da mesma maneira. Isto é o que mostra a Figura 3.

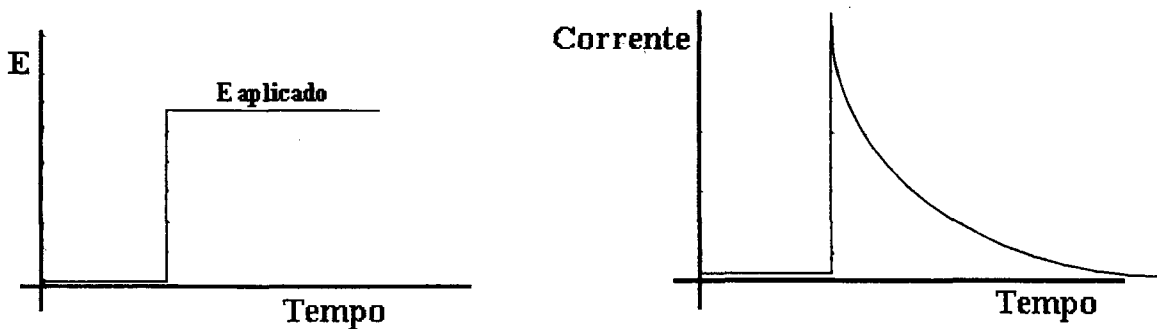


Figura 3. Potencial aplicado e corrente resultante

Para um sistema em fluxo, os perfis de concentração mostrados se modificam, pois a camada de difusão é muito mais estreita. Então o tempo deixa de ser importante, os perfis apenas mudam com o potencial aplicado. Em um potencial suficientemente negativo para reduzir virtualmente toda a forma oxidada da espécie eletroativa ($C_s/C = 1/1000$, por exemplo), o perfil de concentração torna-se como ilustrado na Figura 4.

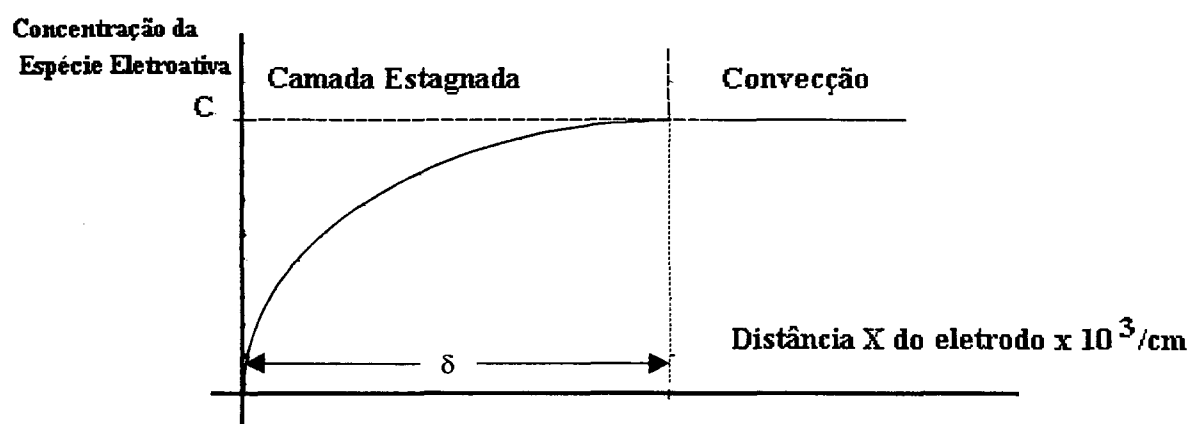


Figura 4. Perfil de concentrações em potencial tal que haja apenas uma das formas da espécie eletroativa.

Agora, a corrente alcançará um estado estacionário limitado pela velocidade de difusão da forma oxidada da espécie eletroativa, por sua vez diretamente relacionada com o gradiente de concentração $\partial c/\partial x$, (inclinação no trecho inicial da curva). Para um eletrodo plano de pequenas dimensões chega-se a²

$$i = nFAD\partial c/\partial x \quad \text{ou} \quad i = \frac{nFADC}{\delta}$$

Onde:

i = corrente em A

n = mols de elétrons / mols do analito

F = o número de Faraday = $96485C$ / mol de elétrons

A = área do eletrodo em cm^2

D = Coeficiente de difusão em cm^2s^{-1}

δ = camada de difusão de Nernst em cm

C = concentração em $mol\ cm^{-3}$

Para diferentes concentrações da espécie eletroativa em um mesmo sistema, permanecerão constantes $nFDA / \delta$, de tal modo que a corrente, nos sistemas em fluxo com eletrodo polarizado a um potencial fixo, varia linearmente com a concentração da espécie eletroativa no seio da solução (Figura 5).

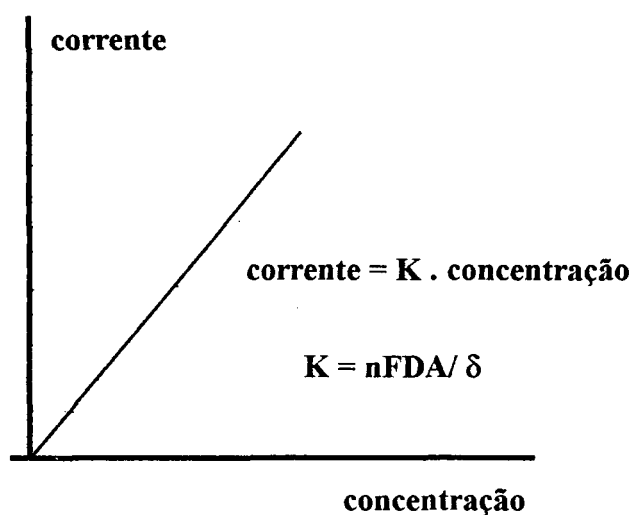


Figura 5. Linearidade de corrente versus concentração da espécie eletroativa, obtida em potencial definido.

A Importância do Eletrólito de Suporte

Em sistemas eletrolíticos, as correntes podem ser de natureza muito distinta, normalmente agrupadas em duas categorias: correntes faradaicas e não-faradaicas.

I - Correntes faradaicas. Associadas à conversão química do analito, estas correntes são sempre limitadas pelo fluxo desta espécie ao eletrodo, ou seja, pela velocidade de transporte de massa da espécie eletroativa, pois a conversão da forma oxidada na reduzida (ou vice e versa) na superfície do eletrodo é sempre um processo mais rápido que o fluxo do analito até ali. O transporte de massa até o eletrodo ocorre de três modos diferentes, simultâneos e contribuindo para ele em maior ou menor grau: a) eletromigração (íons carregados atraídos por um eletrodo carregado, determinada pelos números de transporte dos íons, por sua vez dependentes de suas cargas, concentrações e mobilidades¹⁻⁴ ; b) convecção (agitação da solução, gradiente de densidade e temperatura) e c) difusão (esta limitada pelo gradiente de concentração).

O transporte de massa convectivo praticamente inexistente na camada de Nernst, mas o transporte eletromigrativo sim, podendo introduzir muitas complicações no tratamento teórico apresentado na seção anterior. Para evitar este problema, introduz-se o eletrólito de suporte com íons muito móveis (K^+ , Cl^- , H_3O^+ etc.) em concentrações muito maiores que o analito (tipicamente 100 vezes maiores: $10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ para o eletrólito de suporte e $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para o analito). Deste modo, anulando a componente migrativa do analito, resta apenas a componente difusional e a equação de corrente difusional desenvolvida na seção anterior, passa a descrever razoavelmente bem os sistemas de amperometria hidrodinâmica.

II - Correntes não-faradaicas (capacitivas). Estas têm apenas a componente devido a eletromigração necessária para formar uma dupla camada elétrica sobre o eletrodo de trabalho. Assim que aplicamos uma diferença de potencial, mesmo em região na qual não há espécies eletroativas, momentaneamente aparece uma corrente que logo cai a zero (Figura 6).

-
1. Denaro, A. R.- Fundamentos de Eletroquímica. Editora Edgard Blucher, São Paulo, 1974.
 2. Skoog and Leary- Principles of Instrumental Analysis. 4th edition, Saunders Publishing, 1992.
 3. Faulkner, L. R. - Journal of Chemical Education 60:4 (1983) 262.
 4. Evans, D. H.; O'Connell, K. M.; Petersen, R. A.; Kelly, M. J.- Journal of Chemical Education 60:4 (1983) 291.

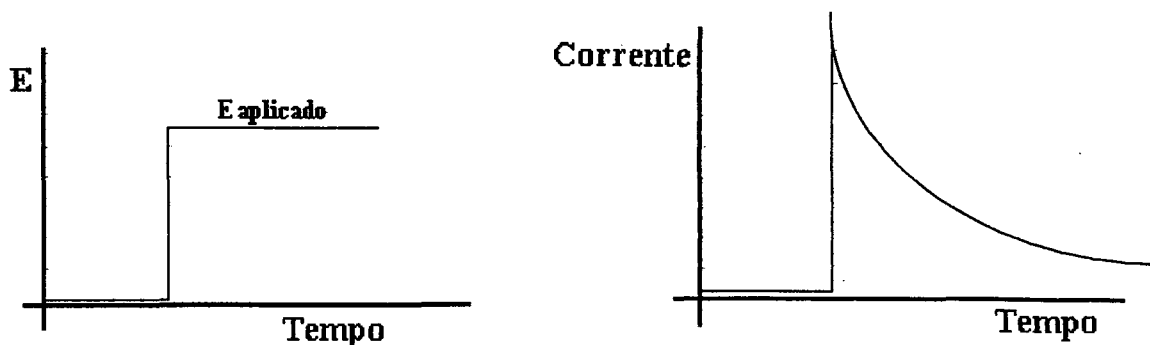


Figura 6. Correntes não-faradaicas a potencial constante.

Isto acontece porque, assim que o eletrodo é carregado, atrai para si os íons do eletrólito de suporte de carga oposta, repelindo os de mesma carga. Tais íons logo se arranjam em torno do eletrodo, parando de se movimentar. Ao pararem, geram uma estrutura de carga em volta do eletrodo conhecida como *dupla camada elétrica*: uma camada compacta de íons fortemente aderidos ao eletrodo, na qual o potencial cai linearmente com a distância e uma camada difusa, na qual o potencial cai exponencialmente com a distância em relação ao eletrodo¹⁻⁴ (Figura 7).

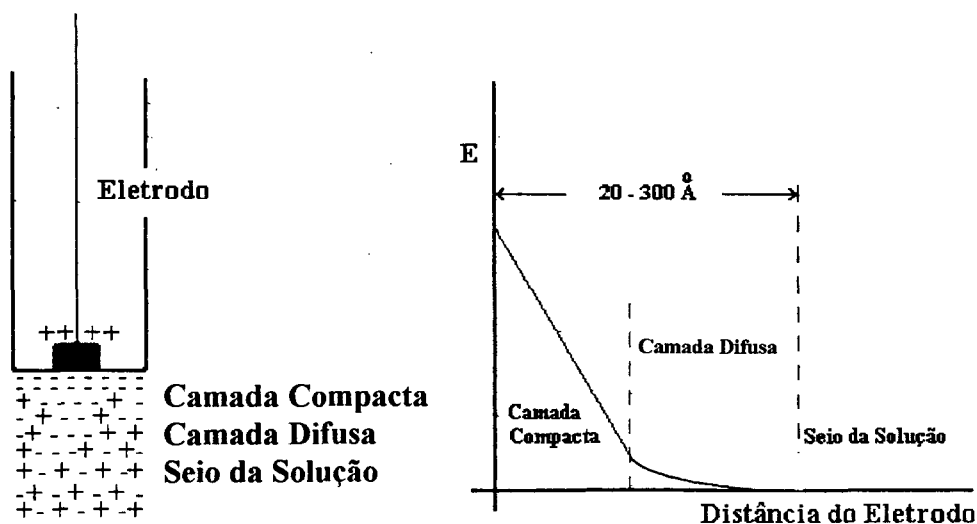


Figura 7. Estrutura de carga na região vizinha ao eletrodo e curva do potencial elétrico x distância em relação ao eletrodo: a dupla camada elétrica.

1. Denaro, A. R. - Fundamentos de Eletroquímica. Editora Edgard Blucher, São Paulo, 1974.
2. Skoog and Leary - Principles of Instrumental Analysis. 4th edition, Saunders Publishing, 1992.
3. Faulkner, L. R. - Journal of Chemical Education 60:4 (1983) 262.
4. Evans, D. H.; O'Connell, K. M.; Petersen, R. A.; Kelly, M. J. - Journal of Chemical Education 60:4 (1983) 291.

Se, em lugar de se manter constante, o potencial do eletrodo for varrido (mudado com o tempo), haverá uma contínua migração iônica, resultando numa corrente variável (Figura 8).



Figura 8. Correntes não-faradaicas a potencial variado.

Como se pode observar, em termos qualitativos não há diferenças no modo como surgem as correntes faradaicas e não-faradaicas. Deste modo, é preciso introduzir diferenças quantitativas, pois apenas as correntes faradaicas deverão estar associadas ao analito. Na voltametria, a corrente não-faradaica (também chamada capacitiva) deve ser reduzida a um mínimo, de modo que sempre seja pequena em relação à corrente faradaica difusional. Na amperometria, é possível obter bons resultados, aguardando-se um certo tempo após a aplicação do potencial⁵. Resultados favoráveis tem sido obtidos na voltametria usando eletrodos de pequenas dimensões (culminando com os ultramicroeletrodos, UME⁶) pois, embora a corrente difusional também caia com a área do eletrodo, aumenta-se a relação corrente faradaica/corrente capacitiva. A voltametria de pulso diferencial é também desenvolvida para maximizar a relação corrente faradaica/corrente capacitiva. Caso oposto observa-se na condutimetria onde, para evitar os processos eletródicos, busca-se máxima corrente capacitiva e mínima corrente faradaica. Neste último caso, não há a componente difusional, procura-se tornar constante a componente convectiva e avalia-se então a componente eletromigratória, associada ao que se deseja quantificar: o conteúdo iônico total.

5. Bertotti, M. e Pletcher, D.- Anais da Associação Brasileira de Química 46:3 (1997) 189.

6. Correia, A. N.; Mascaro, L.H.; Machado, S.A.S.; Mazo, L.H.; Avaca, L.A.- Química Nova 18:5 (1995) 475.

Voltametria Cíclica

Considere-se uma solução não agitada, na qual se submerge um eletrodo de trabalho não rotatório ou gotejante, ou seja, um eletrodo estacionário. Admita-se, na solução, uma espécie eletroativa com concentração 100 vezes menor que o eletrólito de suporte. O sinal de excitação indicado à esquerda, acarreta o voltamograma indicado à direita (Figura 9).

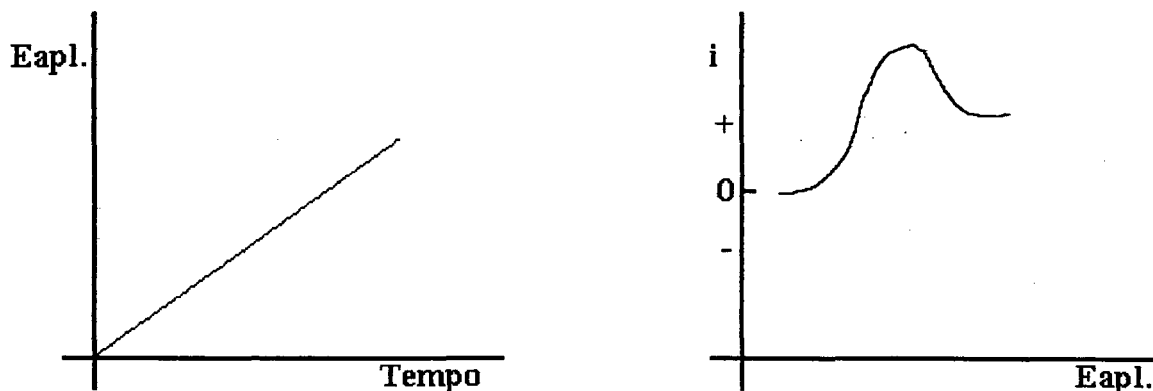


Figura 9. Corrente obtida ao variar o potencial em região de espécies eletroativas: voltametria.

Este pico é obtido porque há dois fatores simultâneos afetando o gradiente de concentração da espécie eletroativa, e por conseqüência a corrente: um, já visto, é o tempo - o gradiente de concentração cai com o aumento do tempo; o outro é o potencial aplicado, que reacomoda a relação C/C_s de acordo com a equação de Nernst (Figura 10).

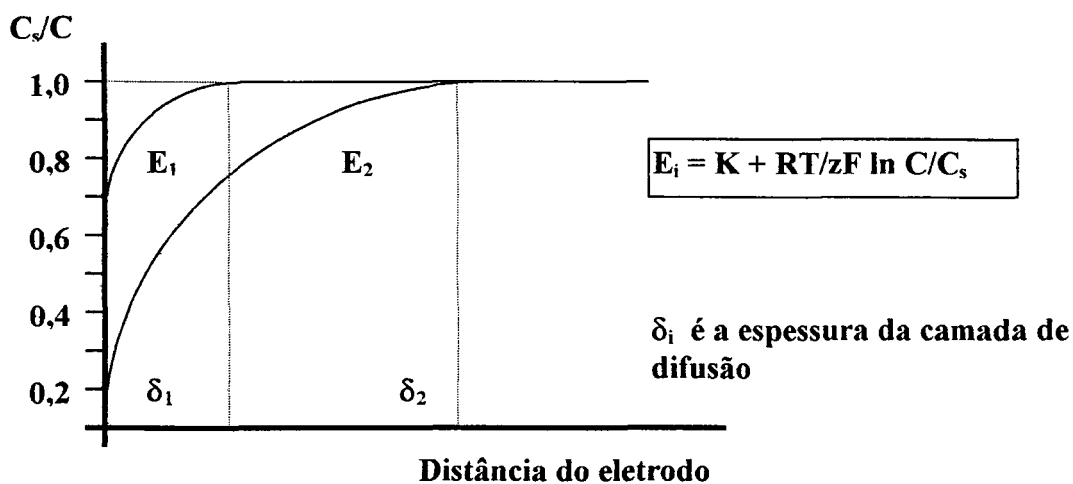


Figura 10. Perfis de concentração da espécie eletroativa em valores de potenciais que alteram a relação entre as formas oxidada e reduzida. No potencial E_1 , a relação entre a concentração da espécie na superfície do eletrodo (C_s) e no seio da solução (C) é de 0,7, tal como determina a equação de Nernst. Já no potencial E_2 , essa relação muda para 0,2 e só se torna igual a unidade a uma distância maior da superfície do eletrodo.

Observando os gráficos das Figuras 2 e 10, percebe-se que, com o tempo, a espessura da camada de difusão cresce (o que tende a diminuir o gradiente de concentração) e o potencial, mudando a relação C_s/C desde 1 até zero, aumenta o gradiente até o limite em que não há mais substância eletroativa na superfície do eletrodo, quando o gradiente se torna constante. Como a espessura da camada de difusão cresce continuamente, observa-se um máximo de corrente até o momento em que virtualmente toda a espécie presente na superfície do eletrodo é eletrolisada e, daí por diante, uma queda na corrente (como consequência do aumento de δ). Se, agora, o potencial crescer até um máximo e, em seguida for diminuído, de tal forma que o sinal de excitação seja o da esquerda da Figura 11, obtém-se o voltamograma cíclico à direita.

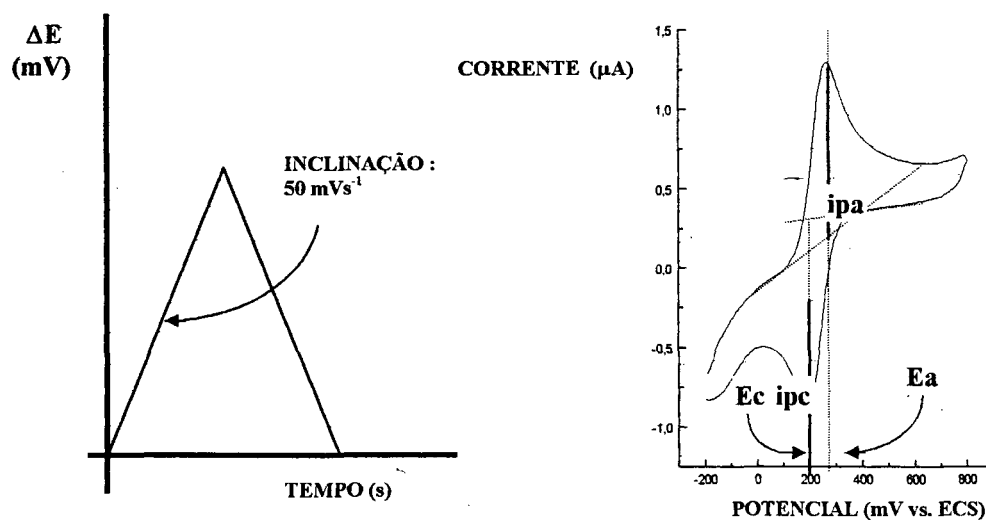


Figura 11. Se o potencial for ciclado como mostra à esquerda, a corrente se comportará como à direita, desde que haja uma espécie cujo E^0 situe-se naquela região: voltametria cíclica.

Este segundo pico (invertido em relação ao primeiro) deve-se exatamente ao processo inverso: a espécie recém oxidada pode ser reduzida novamente, gerando a espécie inicial nas imediações do eletrodo.

A voltametria cíclica é, por excelência, a ferramenta para estudar uma série de processos eletroquímicos como, no nosso caso, eletrodos modificados por polímero redox. Segundo Bard⁷: "Após a superfície de um eletrodo ter sido submetida a um tratamento adequado, é preciso provar que esta superfície realmente tenha sido modificada e estudar as propriedades e a natureza da superfície. Uma vez que se lida com uma quantidade de material muito pequena, técnicas mais sensíveis são requeridas. Geralmente deseja-se saber a quantidade de material na superfície, com que facilidade se pode reduzir ou oxidar o material, qual é a composição e estrutura e quais são suas outras propriedades químicas e físicas".

"Mesmo quantidades mínimas como monocamadas de material podem ser analisadas eletroquimicamente, uma vez que pequenas correntes podem ser medidas muito facilmente e, pela lei de Faraday, 10^{-10} mols de material são equivalentes a 10 microcoulomb ($n=1$). Assim, a voltametria cíclica de uma monocamada de material, mostra um pico com uma área equivalente à quantidade de material imobilizado na superfície do eletrodo. A localização do pico no eixo de potencial é uma medida direta do potencial redox do par na superfície. Frequentemente, este potencial é muito próximo daquele encontrado para o mesmo par em solução. Para camadas mais espessas, a resposta eletroquímica mostrará áreas maiores, representando maior quantidade de material sobre o eletrodo. Uma inspeção detalhada da natureza da resposta e da forma das curvas, pode conter informação sobre interações químicas no filme, a velocidade e mecanismo do transporte de carga através dele".

Informações também valiosas se pode obter usando diferentes velocidades de varredura⁸, ou fazendo ciclos sucessivos nas mesmas condições⁹. Por sua natureza exploratória, a voltametria cíclica está para a amperometria como os espectros de absorção molecular estão para a espectrofotometria. É na varredura de potenciais que se escolhe o potencial apropriado para a amperometria, da mesma forma que o $\lambda_{\text{máx}}$ é escolhido na varredura espectral.

7. Bard, A.J.- Journal of Chemical Education 60:4 (1983) 302.

8. Paul, H.J.; Leddy, J.- Analytical Chemistry 67 (1995) 1661.

9. Shigeara, K.; Oyama, N.; Anson, F.C.- Journal of American Chemical Society 103 (1981) 2552.

Tratamento teórico das correntes na voltametria cíclica

A corrente de pico na voltametria cíclica é dependente de uma série de variáveis, de acordo com a equação de Randles-Sevcik (válida para processos reversíveis ocorrendo na temperatura de 298K):

$$i_{\text{pico}} = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2}$$

Sendo: v = velocidade de varredura de potenciais em $V s^{-1}$

n = mols de elétrons/mol de analito

i_{pico} = corrente de pico em A

A = área do eletrodo em cm^2

D = coeficiente de difusão do analito em $cm^2 s^{-1}$

C = Concentração do analito em $mol cm^{-3}$

Um par redox que rapidamente troca elétrons com o eletrodo, regenerando integralmente a espécie inicial após reversão do potencial é chamado de par **reversível**. Alguns critérios de reversibilidade podem ser estabelecidos diretamente dos voltamogramas cíclicos. Em primeiro lugar, as correntes de pico catódica e anódica devem ser iguais:

$$\frac{i_{pa}}{i_{pc}} = 1$$

Sendo: i_{pa} = corrente de pico anódica

i_{pc} = corrente de pico catódica

Quanto aos potenciais, o valor do E^0 em si é importante,

$$E^0 = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}$$

ou seja, o potencial padrão situa-se a igual distância entre E_{pa} (potencial de pico anódico) e E_{pc} (potencial de pico catódico).

Um par redox reversível fornece $\Delta E = \frac{59,2}{n} \text{ mV} \quad (25^\circ\text{C})$ sendo,

$$\Delta E = [E_{pa} - E_{pc}] \quad \text{e} \quad n = \text{mols de elétrons/mol de analito.}$$

Assim, qualquer barreira difusional ou reações acopladas que determinem uma lenta transferência de elétrons do/para o eletrodo, aumentará a separação entre os picos.

É importante ressaltar que a situação ideal de $\Delta E = 59,2\text{mV}$ é válida para espécies eletroativas em solução. Para espécies imobilizadas na superfície, uma vez que não há difusão para longe do eletrodo, o ΔE , idealmente, será zero.

Se aplicável na descrição de um evento eletroquímico, a equação de Randles-Sevcik poderá permitir inferências muito interessantes. Realizando a voltametria em diferentes velocidades de varredura e colocando-se em gráfico a corrente de pico vs. (velocidade de varredura)^{1/2}, a obtenção de linearidade permite concluir que o sistema comporta-se de acordo com a lei de Randles-Sevcik e, portanto, é controlado por difusão. O coeficiente angular da reta obtida é igual a

$$2,69 \times 10^5 \text{ n}^{3/2} \text{ A D}^{1/2} \text{ C}$$

de modo tal que se pode obter uma destas grandezas, se conhecemos todas as outras. Assim, a voltametria de soluções de ferrocianeto, padrão bem conhecido na eletroquímica, permite calcular a área efetiva do eletrodo, parâmetro distinto da área geométrica. A determinação dos coeficientes de difusão também pode ser feita e a aplicação analítica é bem evidente, pois a corrente de pico é diretamente proporcional à concentração. Novamente é preciso ressaltar que a linearidade entre corrente e raiz quadrada da velocidade de varredura não ocorre para espécie eletroativa imobilizada na superfície do eletrodo. Neste caso, a linearidade é entre corrente e velocidade de varredura⁵. Comparando a equação de Randles-Sevcik com a de Nernst, fica bem claro a vantagem analítica da voltametria sobre a potenciometria. Enquanto na primeira, a variável dependente (corrente de pico) é proporcional à concentração, na última, a variável dependente (diferença de potencial) é proporcional ao logaritmo da concentração.

5. Bertotti, M. e Fletcher, D.- Anais da Associação Brasileira de Química 46:3 (1997) 189.

1.2- Quitina, quitosana e suas possibilidades eletroquímicas

A quitina é um polímero natural de massa molar média em torno de $2,5 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, sendo o principal constituinte do exoesqueleto de insetos e crustáceos como baratas, camarões, siris, etc. Este biopolímero também comparece em certos fungos e na estrutura esquelética dos lulas, chamada popularmente de "pena do lula". O processo de extração e purificação, partindo de resíduos sólidos da indústria pesqueira (consequentemente importante do ponto de vista ambiental) é simples, consistindo na eliminação de carbonato de cálcio, pigmentos (melaninas e carotenóides) e proteínas. Embora já haja processos mais modernos, menos dispendiosos em tempo e originando um produto de qualidade superior, apenas como ilustração, apresenta-se o esquema da Figura 12¹⁰.

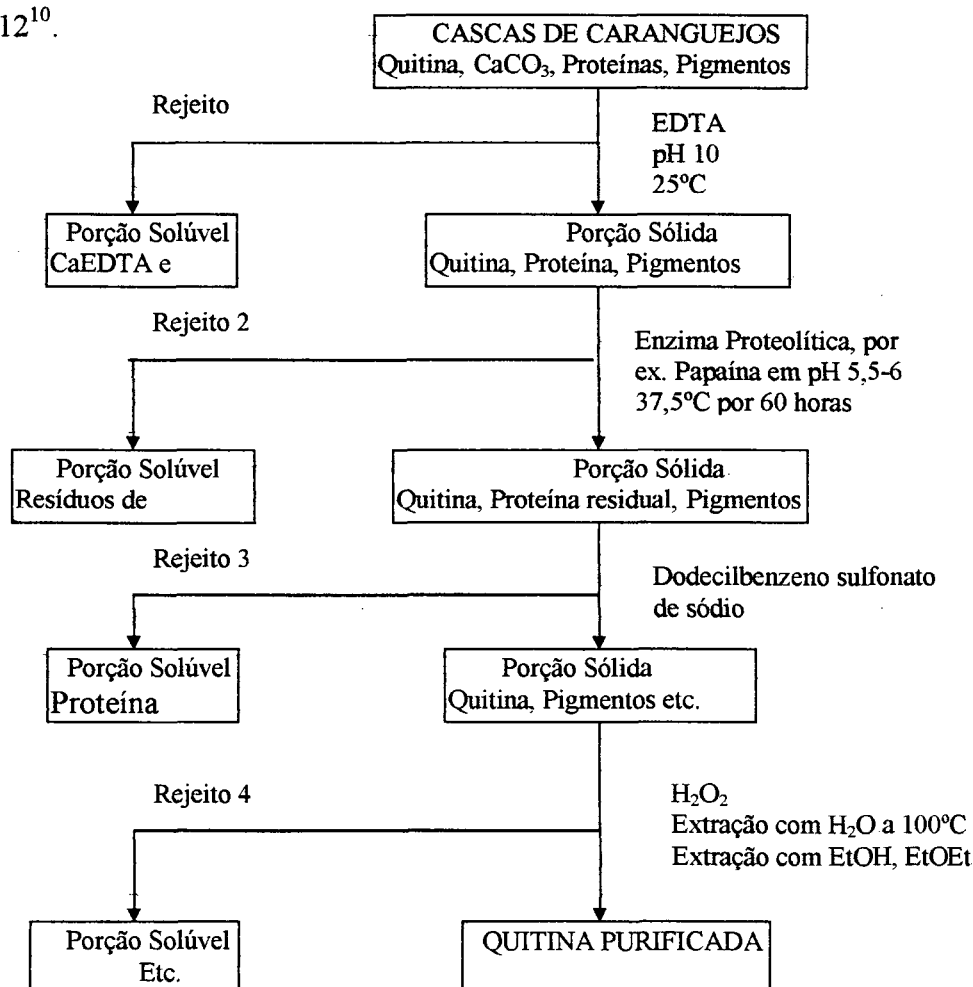


Figura 12. Preparação de quitina.

A quitina e seu análogo desacetilado, a quitosana, apresentam muitas aplicações em diversos domínios tecnológicos: como polieletrólito na floculação de colóides; como material isolante em transformadores de tensão elétrica; como fase estacionária em cromatografia; como extrator de íons metálicos; na dietética, como inibidor da absorção de lipídios; como condimento alimentar, na geração do sabor tostado; como formador de filme adesivo; como aditivo de fumo e cosméticos; como formador de membrana fotográfica ou de permeabilidade seletiva e outras. Este trabalho foca as possíveis aplicações analíticas de quitosana, como polímero modificador de eletrodos: enzimáticos e não-enzimáticos.

Muitas das propriedades físico-químicas da quitina podem ser diretamente relacionadas à estrutura de sua unidade monomérica, representada na Figura 13.

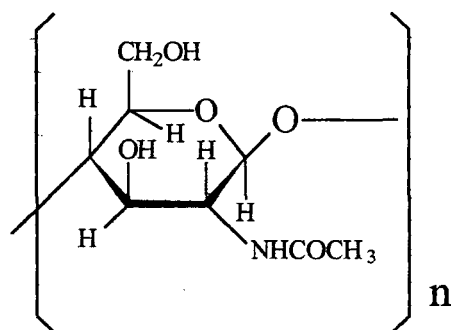


Figura 13. Estrutura da quitina 100% acetilada

Portanto, o polímero pode ser quimicamente chamado de poli N-acetil D-glicosamina, ou mais rigorosamente, (1→4)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glicano. A observação desta estrutura conduz a algumas considerações interessantes do ponto de vista do presente trabalho.

Celulose e quitina

A primeira constatação é a similaridade existente entre a quitina e um outro poliglicídio constituinte do "esqueleto" dos vegetais, a celulose. Realmente, a diferença essencial reside no grupo amino N-substituído por acetil, ausente no caso da celulose. Fica bastante claro a semelhança funcional entre os dois polímeros, colocados na natureza com a finalidade primeira de fornecer rigidez aos vegetais, insetos, crustáceos etc.

Quitina e quitosana

Outro ponto importante, diz respeito a condição imposta inicialmente de um polímero 100% acetilado. Na natureza isto não ocorre e, toda quitina apresenta, em um pequeno grau, unidades monoméricas nas quais o nitrogênio não apresenta o grupamento acetil, estando, portanto como nitrogênio amínico NH_2 . É exatamente aí que existe a articulação com um polímero correlato, artificialmente produzido a partir da quitina, a quitosana. Quando se trata a quitina (espécie em que comparecem em grande número unidades monoméricas acetiladas) por soluções aquosas concentradas de hidróxidos iônicos, ocorre em graus variados, a desacetilação do polímero (Figura 14). Quitosana, portanto, é o nome vulgar atribuído genericamente ao polímero no qual a contribuição de unidades monoméricas contendo o grupamento NH_2 é suficiente para tornar o polímero solúvel em ácidos fracos diluídos.

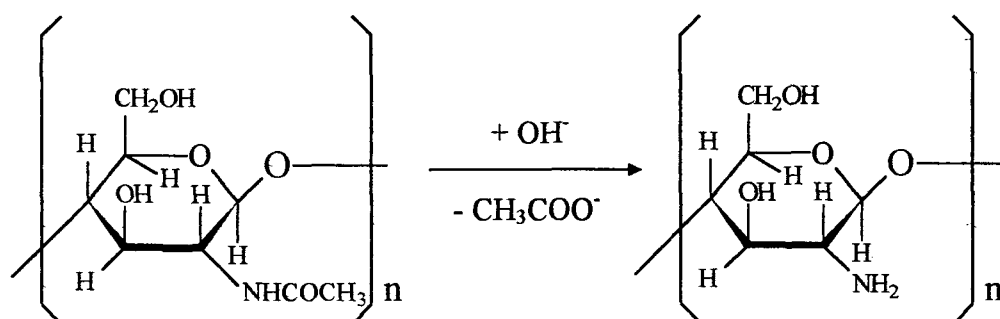


Figura 14. Desacetilação de quitina

Fica claro, portanto, que não há uma separação rígida entre estes dois polímeros, uma vez que não se tratam aqui de substâncias diferentes, mas de diferentes *materiais*. Todavia, é possível lançar mão de condições tais que produzam uma quitosana 100% desacetilada, espécie chamada de poli D-glicosamina ou, mais rigorosamente, de (1→4)-2-amino-2-desoxi-β-D-glicano. Outra diferença entre quitina e quitosana é a massa molar média. Durante o aquecimento necessário ao processo de preparação da quitosana, inevitavelmente ocorre um certo grau de degradação da matriz polimérica, com perda de viscosidade das soluções do polímero, associada a diminuição da massa molar média. Assim, a literatura¹⁰ reporta para a quitina $2,5 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ e para a quitosana $4 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. É muito interessante mencionar aqui o trabalho de Domard e Rinaudo¹⁸, mostrando o alargamento dos picos de cromatografia de permeação por gel para soluções de quitosana, em determinações realizadas com 48h de intervalo. Os autores descrevem este efeito como *envelhecimento* de quitosana e justificam a mais larga distribuição de massas molares por um processo de *aglomeração* de cadeias do polímero.

Há vários processos de preparação de quitosana a partir de quitina descritos na literatura. Em quase todos, a obtenção de um elevado grau de desacetilação custa o preço de diminuição da massa molar média. Em suas extensas revisões, Muzzarelli^{10,11} descreve todos estes processos. Por exemplo, Fujita recomenda misturar 10 partes (em peso) de quitina, 10 partes de NaOH 50% m/v e 100 partes de parafina líquida, e, sob agitação, aquecer por 2h a 120°C. Verter em água fria, filtrar e lavar, resultando num produto 92% desacetilado (a massa molar média não é relatada). Quando não houver interesse na quitina em si, pode-se usar o procedimento de Peniston e Johnson aquecendo as estruturas esqueléticas, com solução de NaOH.

Da mesma forma que é possível preparar quitosana a partir de quitina, é também possível, havendo interesse, acetilar quitosana por anidrido acético em metanol¹², obtendo assim quitinas diferenciadas em função do tempo e concentração do reagente.

10. Muzzarelli, R.A.A. - Chitin. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978.

11. Muzzarelli, R.A.A.; Jeniaux, C.; Gooday, G.W. (ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press. New York, 1986.

12. Hirano, S.; Ohe, Y.; Ono, H. - Carbohydrate Research, 47 (1976) 315.

18. Domard, A.; Rinaudo, M. - Polymer Communications, 25 (1984) 55.

Solubilidade, hidrofiliçidade e inchamento

Observando a estrutura da unidade monomérica de quitina/quitosana é imediato inferir-se uma grande afinidade pela água. Mas a solubilidade em água não é tão direta, devido ao elevado grau de polimerização. Realmente, glicose, sacarose e outros glicídios de baixa massa molar são muito solúveis em água, mas amido e celulose, não. Esta hidrofiliçidade que não resulta em solubilidade, manifesta-se através de um *inchamento* (ou entumescimento) do polímero em presença de água, fenômeno bem conhecido em todos os polímeros que têm afinidade pelo solvente, aquoso ou não. O calor de inchamento de quitina (seca a 105°C) é cerca de 12 cal g⁻¹, semelhante ao das fibras de celulose¹⁰, de 17 cal g⁻¹. Por causa desta afinidade por água, verifica-se grande dificuldade de secagem de quitina ou quitosana. Todavia, curiosamente, uma vez obtido o produto seco, é bastante lento o seu processo de reabsorção de água.

Esta grande hidrofiliçidade de quitina/quitosana é muito vantajosa em relação a outros polímeros, para certas aplicações em meio aquoso. Por exemplo, para imobilizar glicose oxidase em matriz polimérica, Adam Heller¹³ precisou fazer uma série de modificações químicas na sua matriz, com o único propósito de torná-la mais hidrofílica e, conseqüentemente, mais afim com a enzima e com os fluidos biológicos onde iria atuar.

Mas não é muito fácil solubilizar quitina/quitosana. A solubilidade da quitina, varia um pouco de acordo com a procedência do polímero, mas, via de regra, ela é solúvel em: hexafluoroisopropanol; hexafluoroacetona; 2-cloropropanol e outros álcoois clorados; ácido fórmico 88 a 100% e também uma mistura de dimetilacetamida + cloreto de lítio. Quanto à quitosana, sua solubilidade em água é determinada pelo pH. Nas soluções aquosas ácidas, prótons deslocam-se do íon hidroxônio para o grupamento NH₂ da matriz polimérica, produzindo então um polycation. A base conjugada do ácido empregado torna-se então o contra-íon dos grupamentos NH₃⁺. A presença de uma carga efetiva na estrutura e a mútua repulsão entre as cadeias do polycation, determinam a dissolução do material. Vários ácidos, orgânicos ou minerais, podem servir a este

10. Muzzarelli, R.A.A.- Chitin. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978.

13. Heller, A.- The Journal of Physical Chemistry 96:9 (1992) 3579.

propósito, sendo o mais usado ácido acético em soluções aquosas de concentrações variáveis entre 2 e 20 %. É vital manter em mente o pKa da quitosana protonada. Situando-se em 6,3 é importante considerar que, neste valor de pH, metade dos grupos NH_2 estão protonados, sendo, portanto, abaixo deste valor que se deve esperar boa solubilidade do polímero. Elevando-se o pH a valores acima do pKa, diminui-se a hidrofiliabilidade, alcançando-se um momento no qual o polímero precipita. Em princípio, o N do grupo acetamido também pode ser, em algum grau, protonado, mas isto não é o suficiente para solubilizar quitina em ácidos diluídos.

Conformações da quitina/quitosana

Voltando a considerar a estrutura monomérica da quitina/quitosana, percebe-se a possibilidade de ligações de hidrogênio, intramoleculares (Figura 15) e intermoleculares. Pode-se inferir que tais ligações conduziram a um enovelamento estrutural da matriz polimérica, por sua vez já entropicamente favorável mesmo em outros polímeros estruturalmente bem mais simples¹³.

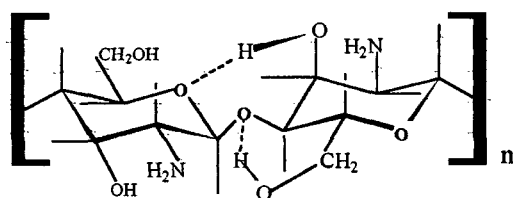


Figura 15. Ligações de hidrogênio que provocam o enovelamento conformacional em quitina/quitosana.

Citado por Muzzarelli¹⁴, Vincendon estudou tais efeitos, por RMN de prótons, para soluções de quitina em dimetil acetamida-LiCl e por difração de raios x, para quitina sólida. As conformações da quitosana são ainda mais complexas. As ligações de hidrogênio sem dúvida desempenham seu papel, pois o desenvolvimento estrutural, verificado nas proteínas pela adição de uréia, e atribuído a atenuação das ligações de hidrogênio, inter e intramoleculares, também ocorre na quitosana¹⁵. Mas há outros fatores

13. Heller, A.- The Journal of Physical Chemistry 96:9 (1992) 3579.

14. Muzzarelli, R.A.A.; Jeniaux,C.; Gooday,G.W.(ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press. New York, 1986. Página 343.

15. Muzzarelli, R.A.A.; Jeniaux,C.; Gooday,G.W.(ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press. New York, 1986. Página 341.

a serem considerados, relacionando entre si o pH, a força iônica, a concentração do polímero e o seu volume hidrodinâmico. "Em altas concentrações as moléculas de quitosana estão próximas e os contra-íons (do grupo NH_3^+) não abandonam o domínio molecular; em baixas concentrações, os contra-íons se difundem para longe do domínio molecular. A carga efetiva cresce e (devido à alta repulsão) o polímero torna-se mais estendido" ¹⁶. Este é o chamado *efeito polieletrólito*. Ele está associado ao aumento do volume hidrodinâmico do polímero, a uma viscosidade alta em relação à concentração, e pode ser completamente anulado pelo aumento da força iônica do meio, pois, inversamente, haverá diminuição da carga efetiva do polímero, favorecendo uma estrutura mais enovelada e de menor volume hidrodinâmico. Mais radical será o efeito do pH. À medida que o pH se eleva, os grupos NH_3^+ se desprotonam, e rapidamente cai a carga efetiva. Prevaecem, então as forças intramoleculares de ligação de hidrogênio que provocam enovelamento da estrutura.

Citados por Muzzarelli¹⁷, Hwang, Rha e Sinskey usaram os fatores que afetam a conformação da quitosana para produzir membranas de resistência mecânica e porosidade variáveis. O gráfico da Figura 16 foi construído com dados deste trabalho e mostra a influência do pH e força iônica sobre a viscosidade de soluções de quitosana. A Figura 17 mostra, de modo esquemático, as mudanças conformacionais do polímero, associadas às variações de porosidade das membranas de quitosana preparadas pelos autores.

16. Muzzarelli, R. A. A. - Chitin. 1^a edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 81.

17. Muzzarelli, R. A. A.; Jeniaux, C.; Gooday, G. W. (ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press, New York, 1986. Página 389.

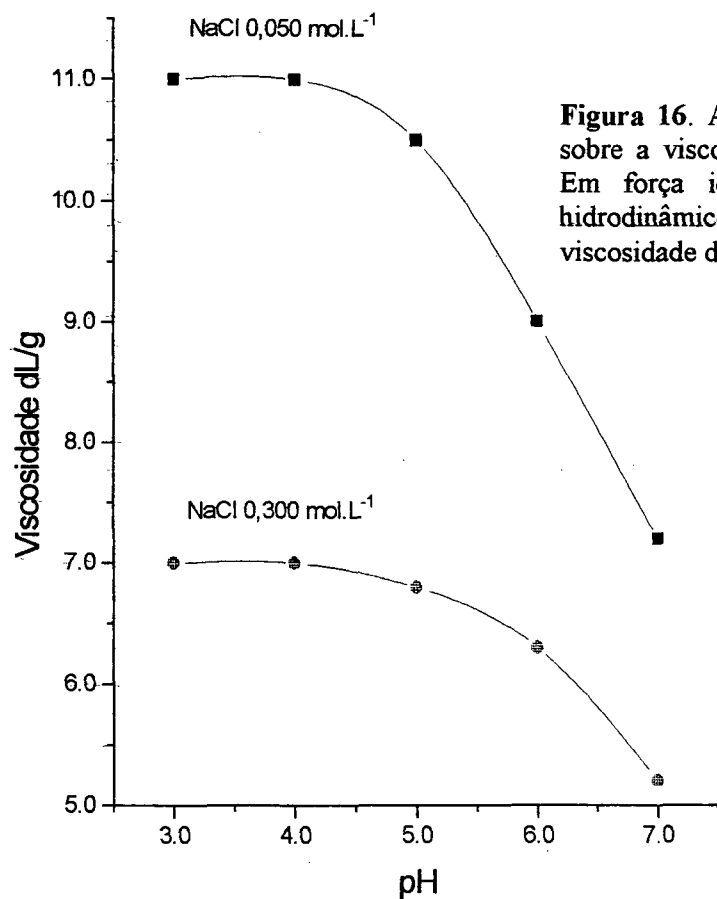


Figura 16. A influência de pH e força iônica sobre a viscosidade de soluções de quitosana. Em força iônica e pH baixos, o volume hidrodinâmico cresce, ocasionando aumento da viscosidade das soluções do polímero.

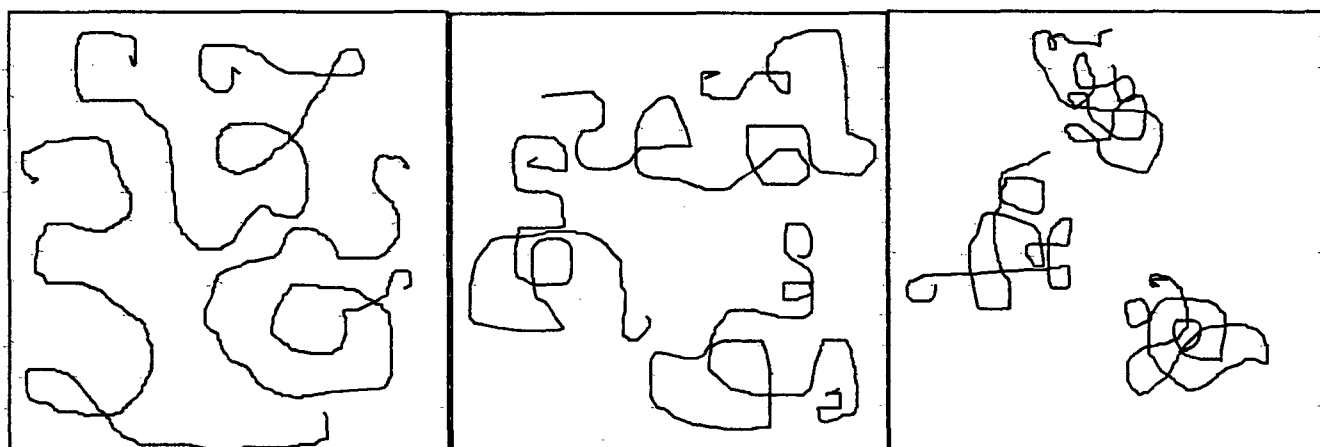


Figura 17. Diferentes conformações de cadeias poliméricas de quitosana controlam a porosidade de membranas. Da esquerda para a direita a porosidade das membranas aumenta, através da elevação de pH e/ou força iônica, devido ao enovelamento das cadeias.

Sendo assim, é importante considerar que a quitosana em solução pode assumir diversas conformações na dependência de pH, força iônica e concentração do polímero. A adição de uréia pode favorecer conformações mais distendidas, pela inibição das ligações de hidrogênio¹⁵.

Domard e Rinaudo¹⁸ mencionam o efeito bastante notável do $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ sobre a viscosidade de soluções de quitosana, associando este eletrólito a conformações mais estendidas, mesmo em pH 7. Os autores explicam o efeito especial deste sal, considerando sua forte associação ao polímero, alta solubilidade do íon acetato em água e o efeito inibidor sobre ligações de hidrogênio promovido por ele.

15. Muzzarelli, R.A.A.; Jeniaux, C.; Gooday, G.W. (ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press. New York, 1986. Página 341.
18. Domard, A.; Rinaudo, M. - Polymer Communications, 25 (1984) 55.

Imobilização e acoplamento de quitina/quitosana

Há várias estratégias de imobilização de quitina/quitosana, quase sempre partindo de soluções aquosas de quitosana, e conduzindo a diferentes resultados: monocamadas ou multicamadas moleculares; filmes, géis ou moléculas em solução; diminuindo ou mantendo o grau de hidrofiliçidade; comprometendo ou não os grupamentos NH_2 . A escolha dependerá da finalidade pretendida.

a) Imobilização por formação de filme aderente à superfície. Quando o polímero imobilizado for trabalhar a seco, pode-se lançar mão da capacidade filmogênica de quitina/quitosana. A solução ácida de quitosana pode ser gotejada sobre a superfície e simplesmente aguardar que seque por evaporação da água e/ou do ácido acético. Pode-se, também, expor a superfície umedecida pela solução a NH_3 gasoso, que, provocando desprotonamento dos grupamentos amino, conduzirá a insolubilização do material polimérico¹⁷. No caso de quitina, usa-se a solução do polímero em DMA+LiCl e, como agente coagulante, 2-propanol ou acetona¹⁷.

b) Imobilização por adsorção. A elevada massa molar média de quitina/quitosana permite prever a possibilidade de forte adsorção sobre superfícies^{19,20}. Todavia, a observação da estrutura da unidade monomérica de quitina/quitosana, revelando ausência de ligações π e presença exclusiva de elementos com átomos de pequeno tamanho como C, H, O e N, permite considerá-la *polar e dura*, aqui considerando a classificação de ácidos e bases de Pearson²¹. Desta maneira, pode-se inferir que interações efetivas só ocorrerão com estruturas também polares e duras. De fato, uma solução de quitosana que tenha sido colocada em um frasco de vidro (uma estrutura dura e polar) e ali evaporada, deixa um filme tão aderente que só pode ser extraído por enérgica raspagem. Por outro lado, a mesma operação feita em frasco de polipropileno (apolar embora duro), origina um filme que solta-se por si. Por estas mesmas considerações pode-se entender o intenso ancoramento de outros polímeros como polivinilpiridina (estrutura apolar, rica em orbitais π deslocalizados, e, portanto, tipicamente mole) sobre eletrodos de grafite (apolar e mole), por simples adsorção física^{9,19,20}. De modo inversamente análogo, não se consegue ancoramento efetivo de monocamadas de quitosana sobre eletrodos de carbono²².

9. Shigeara, K.; Oyama, N.; Anson, F.C.- Journal of American Chemical Society 103 (1981) 2552.

17. Muzzarelli, R.A.A.; Jeniaux, C.; Gooday, G.W.(ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press. New York, 1986. Página 389.

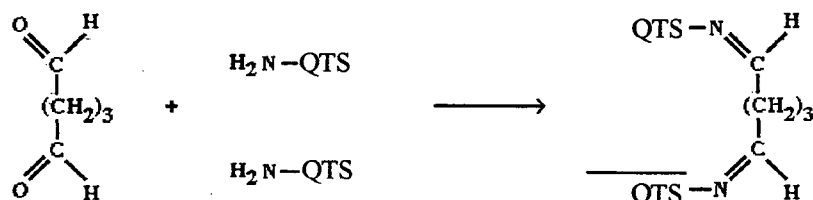
19. Heller, A.- Acc. Chem. Res. 23 (1990) 128.

20. Oyama, N. and Anson, F.- Journal of the American Chemical Society 101:13 (1979) 3450.

21. Pearson, R. G.- Journal of the American Chemical Society 85:22 (1963) 3533.

22. Kurauchi, Y.; Tsurumori, E.; Ohga, K.- Bulletin of Chemical Society of Japan. 62 (1989) 1341.

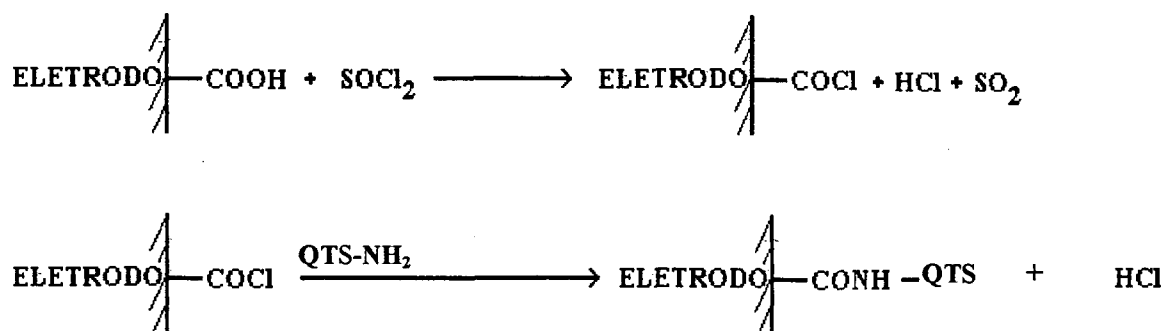
c) Imobilização por reticulação. Esta estratégia consiste em aumentar a massa molar média pelo intercruzamento de cadeias poliméricas vizinhas através de um reativo bifuncional atuante sobre os grupos amino, sendo glutaraldeído o mais empregado para este fim. O esquema reacional é



QTS representa a matriz de quitosana

Este sistema foi empregado para imobilizar quitosana na superfície de um eletrodo de carbono vítreo e, sobre o gel assim produzido, ancorou-se então lactato oxidase. Desta maneira, um biossensor para lactato foi produzido²³. Todavia, como a aderência sobre o eletrodo base não é boa, o gel polimérico contendo a enzima pode soltar-se como um todo.

d) Imobilização covalente de camada monomolecular. Um ancoramento bastante efetivo de quitosana sobre superfícies eletródicas de carbono, pode ser conseguido por ligação covalente com o eletrodo. Há duas variantes citadas na literatura, ambas partindo da oxidação da superfície do carbono vítreo, tornando-a rica em carboxilas. Jinrui e Bin²⁴ trataram o eletrodo com cloreto de tionila em meio anidro, e, em seguida, reagiram os grupos cloreto de acila gerados na superfície, com solução de quitosana em ácido fórmico. O esquema reacional deste processo é

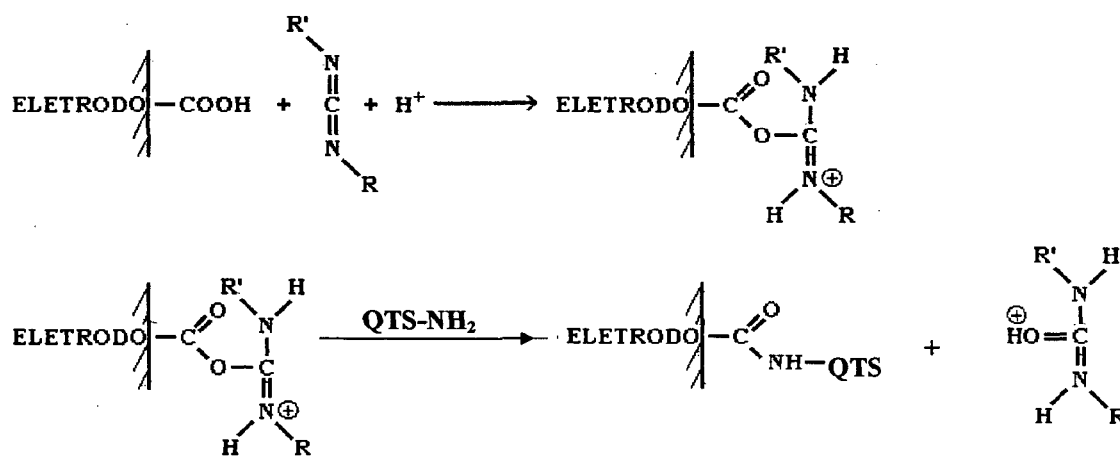


QTS representa a matriz de quitosana

23. Hikima, S.; Kakizaki, T.; Taga, M.; Hasebe, K. - Fresenius Journal of Analytical Chemistry 345 (1993) 607.

24. Jinrui, X.; Bin, L. - Analyst 119 (1994) 1599.

A segunda possibilidade consiste em aplicar um filme de quitosana sobre o eletrodo oxidado e secá-lo. Segue-se a reação com dicitohexilcarbodiimida, DCC, em meio de dimetil formamida²². O esquema reacional é



QTS representa a matriz de quitosana

e) Imobilização por mistura em matriz hidrofóbica. Um eletrodo de pasta de grafite modificado por quitosana através de uma imobilização bastante simples foi conseguido por Rodrigues e colaboradores²⁵. Misturou-se o polímero em pó com óleo mineral e grafite, seguindo-se a aplicação desta pasta na cavidade de um eletrodo. Este eletrodo foi usado para pré-concentrar *in situ* ânions em solução aquosa. Uma vez acumulados eletrostaticamente na matriz policatiônica, estes ânions foram detectados voltametricamente.

f) Imobilização por pérolas ou cápsulas. As pérolas de quitosana são pequenas esferas maciças que podem ser empacotadas em uma coluna. Com auxílio de glutaraldeído pode-se ligar uma enzima à superfície exterior das pérolas, construindo-se assim um reator enzimático empacotado para determinações em fluxo²⁶. Já as cápsulas são ocas e, confinando a enzima no

22. Kurauchi, Y.; Tsumomori, E.; Ohga, K.- Bulletin of Chemical Society of Japan. 62 (1989) 1341.

25. Rodrigues, C. A.; Fávere, V. T.; Stadler, E.; Laranjeira, M.C.M.- Journal of Brazilian Chemical Society 4:1 (1993) 14.

26. Hikima, S.; Kakizaki, T.; Hasebe, K.- Analytical Sciences 8 (1992) 165.

seu interior, permitem a penetração do substrato e eliminação do produto, possibilitando a reutilização da enzima^{27,28}.

g) Imobilização por acetilação. Para certas aplicações, é possível imobilizar quitosana por simples acetilação. A quitina assim produzida pela reação com anidrido acético, imobiliza-se, pela formação de um gel insolúvel em água. Neste caso, há um apreciável comprometimento dos grupos NH_2 ¹².

Como a quitosana, em pH apropriado, é um polycation, seu acoplamento a outras estruturas de carga contrária pode gerar aplicações muito interessantes. Já foi citado a pré-concentração de ânions por quitosana imobilizada em eletrodo. Um outro caso, importante do ponto de vista da estabilidade, é quando o acoplamento se dá com macroestruturas.

a) Acoplamento a colóides. No tratamento de água bruta, é muito freqüente a etapa de *coagulação* das micelas de argila, portadoras de carga negativa, pelo uso de hidróxido de alumínio e/ou polieletrólitos catiônicos²⁹ (Figura 18).

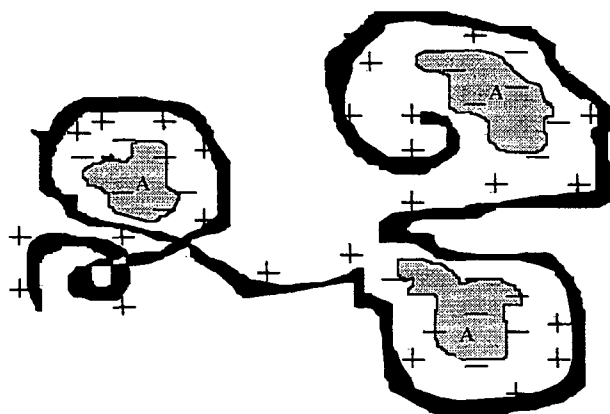


Figura 18. Coagulação de argila coloidal por polieletrólito catiônico. A figura em negro representa a cadeia do polieletrólito. As figuras designadas pela letra A representam as micelas de argila, dotadas de carga negativa.

12. Hirano, S.; Ohe, Y.; Ono, H.- Carbohydrate Research, 47 (1976) 315.

27. Miguez, M.J.B.- Sistema de Encapsulação de Urease com Quitosana-PVA: Reatividade e Aplicações. Tese de Doutorado., Depto. de Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1997.

28. Muzzarelli, R.A.A.; Jeniaux, C.; Gooday, G.W.(ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press. New York, 1986. Página 428.

29. Moore, J.W. and Moore, E.A. - Environmental Chemistry. Academic Press Inc. New York, 1976.

A quitosana usada para este fim representaria um avanço em direção ao equilíbrio auto-sustentável, pois, neste caso, a lama residual, proveniente dos tanques de decantação, não conteria elementos metálicos ou qualquer outra espécie química potencialmente nociva às espécies vivas. No caso dos efluentes das indústrias de arroz parbolizado, bastante grave em Santa Catarina pelo alto índice de DBO do efluente lançado nos rios, a quitosana saiu-se muito bem em testes realizados, floculando o material coloidal e gerando um resíduo, que, pelo teor de nutrientes e ausência de toxicidade, poderia ser empregado como ração animal.

b) Acoplamento a corantes. A indústria têxtil lança grandes quantidades de corantes nos rios e lagos, por conta do baixíssimo rendimento das operações de tingimento. Muitos destes corantes são aniônicos, de massa molar relativamente alta (por exemplo os sulfonados) e, portanto, passíveis de acoplamento efetivo com a quitina/quitosana em valores apropriados de pH. Tal tratamento, novamente, pode constituir-se em um importante caso de defesa do meio ambiente ou até mesmo de reutilização dos corantes, através da sua posterior dessorção. Nas interações com corantes, ou, possivelmente em outros casos, não são apenas as forças decorrentes de atrações eletrostáticas as únicas atuantes. Em valores altos de pH, as interações íon-íon deixam de ser importantes, sendo decisivas as ligações de hidrogênio, ou mesmo tipo van der Waals, estas últimas especialmente importantes para os corantes com moléculas de grandes dimensões³⁰.

c) Acoplamento à enzimas. Adam Heller refere-se ao efetivo acoplamento da estrutura polianiónica de glicose oxidase, a policátions com o fim de imobilizar a enzima em superfícies eletródicas^{13,19}. Em princípio, a quitina/quitosana, policatiônica e hidrofílica, que ainda coloca em jogo interações de hidrogênio, se prestaria muito bem a este fim. Processos deste gênero estão descritos nas revisões de Muzzarelli, aludindo ao acoplamento de quitosana com heparina, ácido alginico e dextran-sulfato de sódio³¹. Realmente, embora fora do domínio da eletroquímica, Muzzarelli descreve trabalhos de 16 autores que usaram a quitosana como suporte de imobilização, abarcando um total de 18 enzimas, incluindo a própria glicose oxidase³². A grande biocompatibilidade da quitina/quitosana, aliada a possibilidade de co-reticulação, via reativo bifuncional, imobilizando a enzima de modo bastante efetivo,

13. Heller, A.- The Journal of Physical Chemistry 96:9 (1992) 3579.

19. Heller, A.- Acc. Chem. Res. 23 (1990) 128.

30. Muzzarelli, R.A.A.- Chitin. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 109.

31. Muzzarelli, R.A.A.- Chitin. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 137.

32. Muzzarelli, R.A.A.; Jeniaux, C.; Goody, G.W.(ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press. New York, 1986. Página 407.

recomendam-na como um suporte enzimático muito promissor, ainda não suficientemente explorado.

d) Acoplamento à celulose. Também a celulose apresenta um efetivo acoplamento com quitina/quitosana, já havendo aplicações industriais, onde o polímero representa um importante aditivo para aumentar a resistência mecânica e elétrica do papel³³. Um estudo muito interessante foi feito por Domszy e Roberts e citado por Muzzarelli³⁴. Os autores oxidaram celulose, produzindo, assim, uma estrutura poliglicídica aniônica que foi acoplada fortemente à quitosana. Os efeitos de força iônica, conteúdo de carboxilas na celulose, e influência de grupos sulfônicos adicionados à celulose, foram estudados. Os resultados não estão em desacordo com os princípios aqui já expostos, mas chamam a atenção para o papel decisivo das interações não-eletrostáticas. Assim, o aumento da força iônica tende a diminuir as forças adsorptivas quitosana-celulose. O aumento de carboxilas na celulose conduz ao aumento da adsorção. Todavia, o aumento de grupos sulfônicos, surpreendentemente, conduz a diminuição da adsorção, o que não pode ser explicado por efeitos eletrostáticos. Os autores admitem que a introdução de grupos sulfônicos comprometem a planaridade da estrutura da celulose e, desta maneira, diminuem o perfeito acoplamento entre as unidades planares da quitosana com as unidades planares da celulose, enfraquecendo as ligações de van der Waals entre os dois polímeros. Os autores não chamam a atenção para as ligações de hidrogênio, mas elas, certamente devem desempenhar seu papel, em se tratando dessas duas estruturas poliméricas. Medições quantitativas realizadas pelos autores, revelaram que apenas 1 em cada 800 grupos carregados da quitosana interagem eletrostaticamente com as carboxilas da celulose oxidada!

Extração de íons metálicos por quitina/quitosana

A estrutura monomérica da quitina/quitosana possui alguns sítios de caráter básico, passíveis de interação com íons metálicos: os nitrogênios amínicos e acetamídicos e os oxigênios das hidroxilas além dos demais oxigênios, todos dotados de orbitais saturados, passíveis do estabelecimento de ligações coordenadas com orbitais vazios dos íons metálicos. Em princípio, qualquer destes grupos pode atuar quando se pretende usar a quitina/quitosana

33. Muzzarelli, R.A.A.; Jeniaux,C.; Gooday,G.W.(ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press. New York, 1986. Página 336,

34 Muzzarelli, R.A.A.; Jeniaux,C.; Gooday,G.W.(ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press. New York, 1986. Página 331.

como complexante extrator de íons metálicos. Esta aplicação é muito importante: para remoção de metais nocivos no tratamento de efluentes industriais³⁵; em química analítica para pré-concentração de metais-traço em colunas empacotadas³⁶ ou, em farmacologia, como maneira de introduzir metais nos organismos de uma forma assimilável³⁷.

Os primeiros trabalhos datam dos anos 40 e, até 1965, referem-se a extração de Cu e urânio por quitina ou quitosana, sem qualquer sugestão acerca do mecanismo da interação metal-polímero³⁷. Em 1965, Tamura e Miyazaki realizaram um estudo de complexação de cobre, zinco, chumbo, cobalto, cádmio, níquel e manganês por mono-glicosamina (2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosídeo). Estes autores determinaram as constantes de estabilidade dos complexos, sendo a do Cu a mais alta de todas. As estequiometrias metal-ligante foram 1:1 ou 1:2. Adutos de ferro, cobalto e níquel foram evidenciados³⁷. Em 1968, Muzzarelli descreveu, pela primeira vez, a quitosana, como um “polímero natural quelante”³⁸. De 1968 a 1976 surgiram muitos trabalhos pertinentes ao assunto que, ainda hoje, suscita a atenção de muitos pesquisadores, principalmente japoneses. Resultados importantes obtidos neste período e que guardam pertinência com o presente trabalho, podem ser resumidos como se mostra abaixo.

a) Partindo-se de íons metálicos aquosos (cloretos ou nitratos) e de quitosana em suspensão aquosa, o processo de extração dos metais é relativamente rápido, alcançando estado estacionário em cerca de ½ hora (Figura 19), talvez não tão rápido quanto o requerido para uma boa sensibilidade nos métodos de pré-concentração em fluxo. Uma vez fixado no polímero, o metal não é eluído facilmente, o que pode ser vantajoso para algumas aplicações, mas não é interessante do ponto de vista cromatográfico, sobretudo nos sistemas em fluxo.

35 Muzzarelli, R.A.A.; Jeniaux, C.; Gooday, G.W. (ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press. New York, 1986. Página 321.

36 Fávere, V.T.- Adsorção de íons Cu II, Cd II, Ni II, Pb II, e Zn II pelo Biopolímero Quitina, Quitosana e pelas Quitosanas Modificadas. Tese de doutoramento. Depto. de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1994.

37. Muzzarelli, R.A.A.- Chitin. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 139.

38. Muzzarelli, R.A.A.- Chitin. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 140.

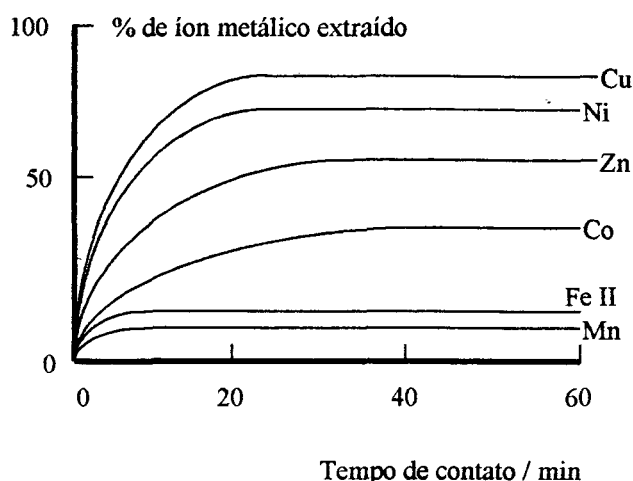


Figura 19. Taxas de extração de alguns íons metálicos sobre 200mg de quitosana, quando tomados separadamente em 100mL de solução $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl^{38} (adaptado).

b) As curvas da Figura 19 mudam na dependência de diversos fatores: granulometria do polímero (quanto menor o tamanho do grão, mais rápido e em maior extensão será o processo de extração); modo de agitação, sendo os melhores resultados encontrados para agitação ultrassônica com o polímero recém precipitado; temperatura (sem regra geral, sendo às vezes observado eficiência maior a 4°C do que a temperatura ambiente); carga do íon (Fe III é melhor extraído que Fe II); pH da solução (abaixo do pKa da quitosana, os prótons concorrem com os metais pelos grupos NH_2 , diminuindo a eficiência da extração) e presença de outros íons extraíveis (relações de concorrência, favorecendo o complexo mais estável. Por exemplo, níquel ou cobre inibem, ou mesmo suprimem a extração de ferro).

c) Metais alcalinos e alcalino-terrosos, além de amônio e tálio, não são extraídos em extensão apreciável.

d) Além de cátions aquosos, oxoânions como vanadato, molibdato, permanganato e cromato, podem também ser extraídos com eficiência.

e) Novamente, aqui os sais de amônio desempenham um papel especial. Especificamente, a presença do sal ou o condicionamento prévio do polímero em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ conduz a um padrão de extração de íons metálicos completamente diferente. Normalmente, há um aumento apreciável na eficiência de extração quando há o sal ou se faz condicionamento do polímero em sulfato de amônio e pH acima de 3. Por exemplo, em igualdades de condições, o ferro III é 72% extraído sem condicionamento prévio, e, 94% extraído em presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

f) A quitosana destaca-se de outros 25 materiais como polímero para extração de mercúrio, conforme dados da literatura³⁹. Observe-se neste caso, que concentrações mais altas do metal acarretam diminuição da eficiência extratora. Outra observação muito interessante é que a quitosana acompanha o padrão de extração verificado para o poli (p-aminoestireno), um polímero ligante certamente mais mole que a quitosana, por conta dos anéis aromáticos, portanto, em princípio, mais afim com um ácido mole como o Hg^{2+} .

g) Estudo com excesso de metal. O grau de extensão da extração de íons metálicos, obtido pela agitação de 1 g de quitosana em 50 a 100 ml de solução, contendo 20 mmol dos metais, sob a forma de cloretos ou nitratos, durante 24h, baseando-se no trabalho de Masri, Reuter e Friedman (1974), citado por Muzzarelli⁴⁰, pode ser descrito como se mostra abaixo.

Sendo a massa molar da unidade monomérica da quitosana 100% desacetilada, 161 g mol^{-1} , 1g conterà 6,25mmol de unidades monoméricas. Portanto, a condição escolhida pelos autores corresponde a um excesso de 3,2 vezes de metal sobre o ligante. Assim, o grau de extensão do processo só pode ser avaliado pelo grau de substituição alcançado na matriz polimérica. Separou-se, na tabela abaixo, os 14 cátions metálicos estudados pelos autores, em três grupos arbitrários: os fortemente extraídos pela quitosana, que alcançaram graus de substituição (indicados sob os símbolos) variando entre 72 a 100%; os medianamente extraídos, com graus de substituição variando entre 40 e 59% e os fracamente extraídos, com graus de substituição iguais ou inferiores a 23%.

39. Muzzarelli, R.A.A.- Chitin. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 147.

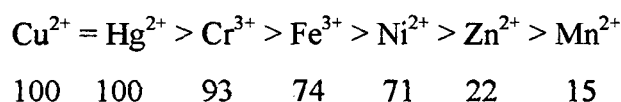
40. Muzzarelli, R.A.A.- Chitin. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 149.

| | | |
|---|--|--|
| $\text{Pd}^{2+}; \text{Au}^{3+}; \text{Hg}^{2+}; \text{Pt}^{4+}; \text{Pb}^{2+};$ | $\text{Zn}^{2+}; \text{Ag}^{+}; \text{Ni}^{2+}; \text{Cu}^{2+}; \text{Cd}^{2+}; \text{Co}^{2+};$ | $\text{Mn}^{2+}; \text{Fe}^{2+}; \text{Cr}^{3+}$ |
| 100 93 90 72 64 | 59 52 50 50 44 40 | 23 19 7 |
| fortes | médios | fracos |

Considerando-se isto, pode-se estabelecer a generalização de que os mais fortemente ligados são metais densos, ocupando os grupos da direita do bloco d, o segundo ou terceiro período da tabela periódica e, de acordo com a classificação de Pearson²¹, justamente os ácidos mais **moles!**.

h) Estudo com excesso do polímero. Muzzarelli e Rochetti (1974)⁴¹ agitaram 200mg de quitosana em 50ml de solução 0,5mmol L⁻¹ do íon metálico, em pH 3 durante 12h, sem qualquer condicionamento prévio do polímero. Os resultados podem ser descritos como abaixo.

Tendo a unidade monomérica da quitosana 161mg mmol⁻¹, 200mg correspondem a 1,25mmol de unidades monoméricas. O volume usado da solução do metal corresponde a 0,025mmol do metal, caracterizando um excesso de 50 vezes do polímero sobre o metal. Desta maneira, os valores expressos na série abaixo correspondem à relação percentual entre as concentrações extraída e inicial do metal.



A mudança realmente significativa em relação ao caso com excesso de metal é que o zinco passa a ser um dos menos extraídos e o cromo um dos extraídos em maior extensão. Em tais condições, o grau de substituição na matriz polimérica é de, no máximo, 2%.

A análise desses resultados torna pertinentes algumas considerações. Em primeiro lugar, é preciso considerar que a quitina é um coletor de íons metálicos bem menos eficiente que a quitosana, deixando evidente que a substituição do grupo acetamido pelo amino é

21. Pearson, R. G. - Journal of the American Chemical Society 85:22 (1963) 3533.

41. Muzzarelli, R.A.A. - Chitin. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 145.

decisiva para aumentar a eficiência extratora. Em segundo lugar, é preciso considerar que, além dos grupos que podem atuar como bases de Lewis, há outras possibilidades de interações atrativas na matriz polimérica. Tal como ilustra a Figura 20, podemos considerar, além da complexação, as interações íon-dipolo e interações de ponte de hidrogênio entre a água da esfera de coordenação do íon aquoso e oxigênios do polímero.

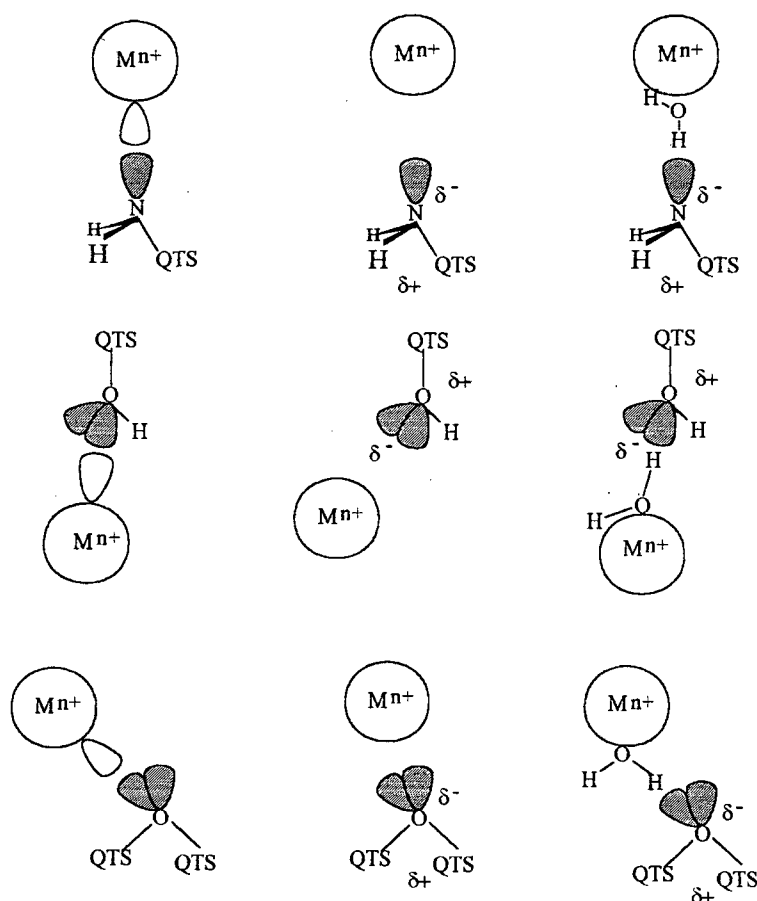
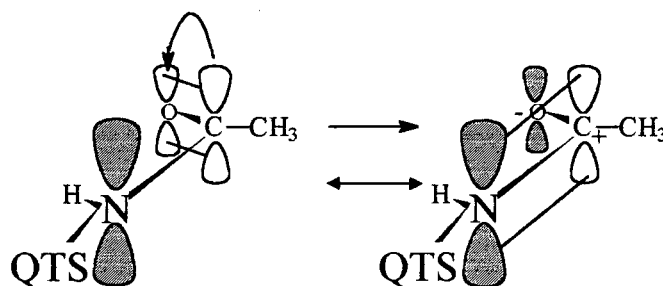


Figura 20. Diferentes possibilidades interativas entre um íon metálico e a quitosana. Cada linha representa um grupo ativo do polímero e cada coluna um tipo de interação: coordenação, interação de van der Waals e ligação de hidrogênio. (QTS representa, simbolicamente, o restante da matriz polimérica. M = íon metálico de carga n^+)

Em qualquer destes casos a reatividade atribuída ao grupo acetamido é inferior à do grupo amina. Uma explicação para isto pode ser dada considerando que a basicidade do nitrogênio é atenuada no acetamido porque o efeito eletronegativo do oxigênio da carbonila acarreta dispersão da carga sobre o nitrogênio



QTS = Restante da estrutura da quitosana

De fato, é sabido que a basicidade das amidas é menor que a das aminas, como fica bem evidente nos dados abaixo, pertinentes às constantes de protonação para dimetilamina e N-metil acetamida⁴².

| | |
|------------------|-------------------|
| dimetilamina | $\log K_b = 10,8$ |
| N-metilacetamida | $\log K_b = 0,4$ |

Por outro lado, a presença da carbonila, em princípio bastante polar, tenderia a favorecer as interações atrativas de van der Waals. Todavia, esse grupo também favorece a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares, o que tende a comprometer sua disponibilidade do ponto de vista da interação metal-polímero.

42. Smith and Martell- Critical Stability Constants. Vol. 2 e 3. Plenum Press, New York, 1975.

Há ainda um quarto tipo de ligação que pôde atuar na extração de oxoânions: interações íon-íon entre o nitrogênio protonado do polímero e oxoânions^{25,41} (Figura 21).

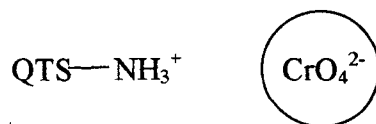


Figura 21. Quitosana protonada como extrator de Cr VI

(QTS = Restante da estrutura da quitosana).

A respeito da observada eficiência de extração para os diversos metais, podem-se fazer as seguintes conjecturas. A tendência geral não se afasta muito do padrão para ligantes duros, expresso pela série de Irving-Williams (aumento da estabilidade com aumento do parâmetro eletrostático: carga²/raio do íon). Todos os grupos ligantes em quitina/quitosana são tipicamente duros, de modo que as tendências observadas não chegam a constituir caso muito atípico. Mas, as exceções são realmente intrigantes quando consideramos que metais, tipicamente moles, como mercúrio II e paládio II²¹, são fortemente extraídos. Pode-se sugerir que os três citados tipos de interação, possíveis para um cátion não conduzam a um mesmo padrão de estabilidade. Assim, as forças de van der Waals são favorecidas para íons volumosos (via de regra, moles) complicando consideravelmente as previsões pretendidas para tais sistemas. Mesmo considerando unicamente o ponto de vista da coordenação metal-polímero, Shriver, Atkins e Langford⁴³ indicam que a estabilidade de um complexo depende, além dos efeitos cinéticos (inércia x labilidade e eletrofilia do íon metálico), do efeito quelato, efeitos estéricos e efeitos de dureza. Atribuir a cada um destes efeitos a sua medida exata para assim interpretar as estabilidades efetivamente observadas, realmente não pode ser tarefa fácil. Apesar disto, o efeito quelato talvez possa oferecer uma explicação para a acentuada diferença observada para Cr³⁺ com excesso de polímero e com excesso de metal. Em havendo disponibilidade de grupos ligantes na matriz polimérica, esse íon tenderia à formação de

21. Pearson, R. G.- Journal of the American Chemical Society 85:22 (1963) 3533.

25. Rodrigues, C. A.; Fávère, V. T.; Stadler, E.; Laranjeira, M.C.M.- Journal of Brazilian Chemical Society 4:1 (1993) 14.

41. Muzzarelli, R.A.A.- Chitin. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 145.

43. Shriver, D.F.; Atkins, P.W.; Langford, C.H.- Inorganic Chemistry. Oxford University Press. Oxford, 1992.

quelatos estáveis, explicando, assim, a elevada extração, na condição de polímero em excesso. Até este ponto, haveria concordância com a regra de Pearson, que prevê elevada estabilidade para uma interação duro-duro. Como no estudo com excesso de metal torna-se inibida a formação de quelatos metal-polímero, não se conseguiria um complexo estável e, como decorrência, a extração seria baixa. Este mesmo argumento poderia ser aplicado ao cobre e mercúrio, cujas extrações também melhoram com excesso de polímero. Já o zinco, em termos relativos, cai em rendimento extrativo quando há excesso de polímero, parecendo indicar que não há mudança na constante de estabilidade do complexo metal-polímero sob as duas condições e, então, o aumento da eficiência extrativa na condição “excesso de metal” seria, meramente, uma expressão do princípio de Le Chatelier.

A respeito da influência do sulfato de amônio pode-se, também, sugerir a intervenção do efeito quelato. A atração eletrostática da dupla carga negativa dos íons sulfato, exercida sobre dois sítios de grupos aminos protonados, produziria uma mudança conformacional no polímero no sentido de aproximar os dois sítios básicos suficientemente para que um íon metálico pudesse a eles ligar-se, tal como ilustra, de modo simbólico, a Figura 22.

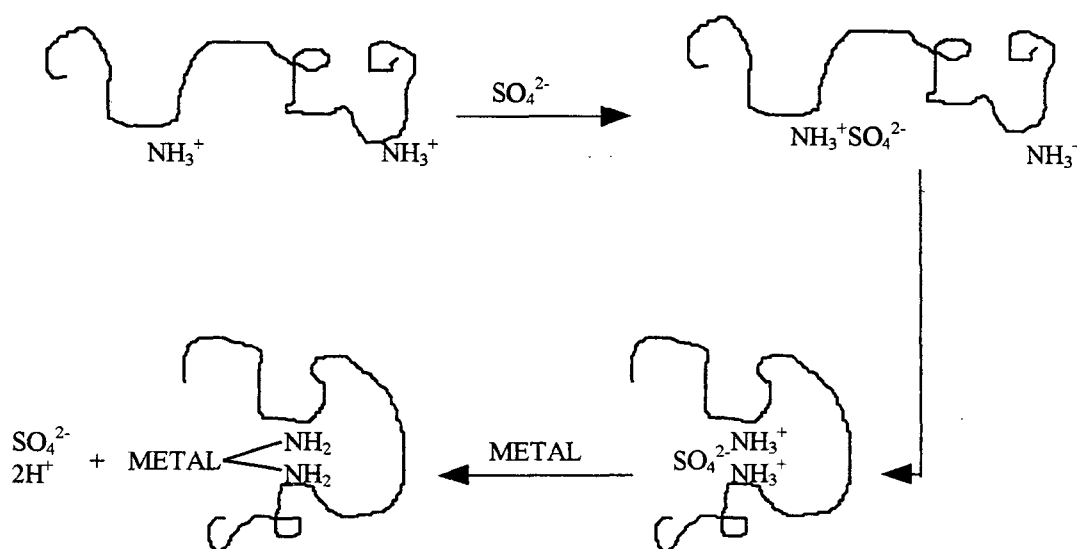
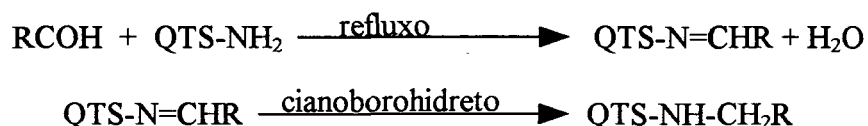


Figura 22. Representação simbólica do efeito do íon sulfato como indutor de quelatos através de modificações conformacionais na matriz de quitosana.

Derivados da quitosana como extratores de metal.

Com o intuito de melhorar a capacidade quelante da quitosana, alguns pesquisadores introduziram modificações estruturais na cadeia do polímero, quase sempre através das reações de base de Schiff, dos grupamentos amino da quitosana com uma carbonila aldeídica, normalmente seguida de uma redução à custa de cianoborohidreto de sódio:



Desta maneira, têm sido introduzidos grupos carboxilatos, hidroxilas ou piridil, modificando as características quelantes do polímero. Em algumas modificações, verifica-se, em relação ao grupo amino do polímero, a obtenção de um favorável ângulo de mordida, pela introdução do novo grupo. Por exemplo, Kurauchi, Tsurumori e Ohga²² reagiram a quitosana com aldeído salicílico, obtendo, com 50% de substituição no polímero, grupos ligantes nos quais hidroxila e amino formam um anel de 5 membros, estericamente favorável, pois elimina as tensões de ligação nos complexos octaédricos. A tabela abaixo sumariza estas contribuições.

Tabela 1. Polímeros derivados da quitosana por reações de Schiff

| MODIFICADOR | OBJETIVO DO ESTUDO | REFERÊNCIA |
|--|---|------------|
| salicilaldeído | modificação de eletrodo de carbono vítreo para determinação voltamétrica de Cu e Pb | 22 |
| 9 diferentes ions carboxilatos α -carbonílicos | eliminação de ions metálicos de efluente de usina nuclear | 35 |
| 5-cetogliconato e deidroascorbato | idem | 35 |
| piridinocarboxialdeído | modificação de eletrodo de pasta de grafite para processos de eletrocatalise | 44 |
| 3,4-dihidroxibenzaldeído | estudo de isotermas de adsorção de ions metálicos sobre o polímero | 45 |

Além destes, Rodrigues, Fávère, Stadler e Laranjeira²⁵ produziram um polímero de

22. Kurauchi, Y.; Tsurumori, E.; Ohga, K. - Bulletin of Chemical Society of Japan. 62 (1989) 1341.

25. Rodrigues, C. A.; Fávère, V. T.; Stadler, E.; Laranjeira, M.C.M. - Journal of Brazilian Chemical Society 4:1 (1993) 14.

35 Muzzarelli, R.A.A.; Jeniaux, C.; Gooday, G.W. (ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press. New York, 1986. Página 321.

44. Rodrigues, C.A. - Preparações de Derivados do Biopolímero Quitosana e sua Utilização em Eletrodos Modificados. Tese de Doutorado. Depto de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.

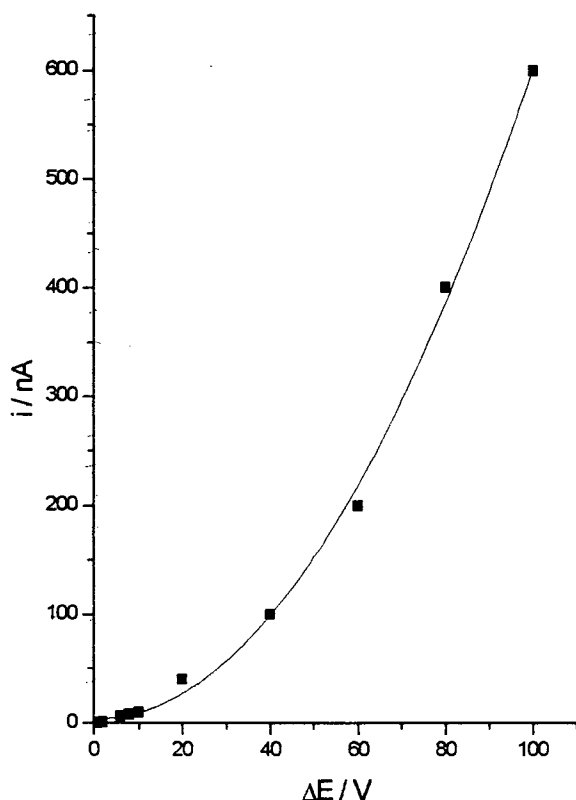
45. Klug, M.; Sanches, M.N.M.; Laranjeira, M.C.M.; Fávère, V.T.; Rodrigues, C.A. - Química Nova 21:4 (1998) 410.

quitosana enxertada com poliacrilonitrila e com este material modificaram um eletrodo de pasta de grafite que, valendo-se de interações eletrostáticas, foi usado para pré-concentrar ânions, obtendo bons resultados para permanganato e hexacianoferrato. Se poderia argüir que estas associações metal-polímero de natureza eletrostática, deveriam ser relativamente fracas. No entanto, trabalhando com membranas de quitosana, Muzzarelli, Isolati e Ferrero⁴⁶ retiveram 92% de cromato em pH 4,5. Ora, em tal pH ainda há muitos sítios protonados na matriz polimérica ($pK_a=6,3$) e, como o íon cromato é muito estável, é pouco provável que o amino da quitosana participasse da esfera de coordenação do Cr. Resta concluir que houve predomínio de interações eletrostáticas $NH_3^+ - CrO_4^{2-}$. O dado revelador da elevada estabilidade de tais interações, é que os autores relatam uma cor amarela associada ao polímero-metal e que o Cr VI tornara-se inerte à difenil carbazida!

Propriedades elétricas de quitina/quitosana.

De interesse absolutamente vital para trabalhos que pretendam dar à quitina/quitosana aplicações eletroanalíticas, é exatamente a sua capacidade de conduzir elétrons. A ausência de orbitais π deslocalizados, que caracterizam os polímeros condutores, já mostra que não se deve esperar boa condutividade em quitina/quitosana. Em 1974, Muzzarelli, Isolati e Ferrero, produziram membranas de quitosana e mediram sua permeabilidade a O_2 , N_2 , CO_2 e H_2O , resistência mecânica e elétrica, além da capacidade de extrair íons metálicos⁴⁶. No que diz respeito à resistência elétrica, os autores prepararam uma membrana de 25 μ m de espessura sobre um eletrodo de pasta de prata e, usando como contra eletrodo um outro eletrodo de pasta de prata, submeteram-na a diferenças de potencial variando entre 1 e 100 volt. Mediram a corrente produzida, obtendo uma reta num gráfico log-log de potencial em volt e corrente em ampères. Os autores concluem que tal comportamento é similar ao dos cristais orgânicos moleculares, e indicaria “corrente limitada por cargas espaciais”. Partindo destes dados, é possível traçar o gráfico abaixo, mostrando a variação da corrente com o potencial.

46. Muzarelli, R.A.A.; Isolati, A.; Ferrero, A.- Ion Exchange and Membranes 1 (1974) 193.



A curva da Figura 23 foi obtida usando-se os dados extraídos do artigo de Muzzarelli, Isolatti e Ferrero⁴⁶ para membrana de quitosana seca com espessura de 20 μ m. A regressão polinomial forneceu a equação abaixo, com corrente em nA e diferenças de potencial em V.

$$nA = 4,0 - 0,04V + 0,06V^2$$

$$(r = 0,9990)$$

A condutância é dV/dnA e a resistência, o inverso. Então segue-se,

$$R = \frac{1}{0,12V - 0,04} \quad G\Omega$$

Figura 23. Curva de corrente vs potencial para filme de quitosana seca.

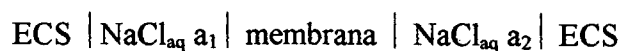
Pode-se perceber que a membrana de quitosana seca é muito resistiva. Por exemplo, a 1 V, a resistência da membrana seria de 12,5 gigaohms! Mesmo em diferenças de potencial tão altas quanto 100 V, o valor da resistência seria 83 megaohm. Realmente, é inegável que tais valores, em princípio, comprometem as aplicações de quitina e quitosana como polímero modificador de eletrodos.

Muzzarelli⁴⁷ cita um trabalho de 1958 no qual, De Chirico e Gallo, prepararam uma membrana de 20 μ m de espessura pela mistura, em solução de ácido fórmico, de 3quitosana/7polihexametileno adipamida. Após evaporação sobre uma superfície plana, restou a membrana que foi neutralizada com NaOH. Com esta membrana, que resultou fortemente

46. Muzzarelli, R.A.A.; Isolatti, A.; Ferrero, A.- Ion Exchange and Membranes I (1974) 193.

47. Muzzarelli, R.A.A.- Chitin. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 73.

hidrofóbica, realizaram medições de diferença de potencial em uma célula como ilustrada abaixo. Os símbolos a_1 e a_2 indicam atividades. ECS é o eletrodo de calomelano saturado.



Os resultados encontrados, quando plotados versus $\log a_1/a_2$ (sendo a_1 e a_2 as atividades) conduziram a uma reta que satisfaz a equação de *potencial de junção*. Usando na semi-célula da direita outros sais de sódio, como: tiocianato, cloreto, brometo, nitrato, iodeto, formiato, iodato e acetato, obtiveram outras retas de inclinações diferentes. Tais resultados, não muito claramente descritos na revisão de Muzzarelli, mostram que a membrana produzida não tem seletividade potenciométrica para possíveis aplicações analíticas. Trata-se, realmente, de uma junção e não de uma membrana no sentido potenciométrico do termo.

Em eletroquímica, processos redox muito lentos requerem considerável sobrepotencial para ocorrerem, quando se considera a transferência de elétrons diretamente para a superfície do eletrodo. Todavia, a intervenção de um mediador de transferência eletrônica pode acelerar o processo, que se realiza, então, no E^0 do mediador, diminuindo ou mesmo eliminando a sobretensão. Este processo, algumas vezes denominado de eletrocatalise, requer que o mediador seja um par redox rapidamente reversível, que interage eletricamente com o eletrodo e com a espécie a ser reduzida ou oxidada. O E^0 do mediador precisa situar-se entre o E^0 da espécie a ser reduzida ou oxidada e o valor de potencial, no qual o processo realizar-se-ia sem a sua intervenção. Existem mediadores livres na solução, ou imobilizados na superfície do eletrodo, estes últimos com a óbvia vantagem de atuarem em minúsculas quantidades e de não serem perdidos na solução. A elegante idéia de Heller^{13,19}, na mediação da oxidação enzimática de glicose, foi usar um polímero modificado por espécie contendo um par redox reversível. Este polímero mediador, não só fixou-se ao eletrodo por simples adsorção física, como também, serviu de suporte de imobilização para a glicose oxidase.

Antes de Heller, em 1979, Oyama e Anson²⁰ descreveram a produção de polímeros redox *in situ*, pela complexação de metais (Ru e Cu) por polivinilpiridina e poliacrilonitrila adsorvidos na superfície de grafite pirolítico. Dois anos após, Shiguehara, Oyama e Anson⁹

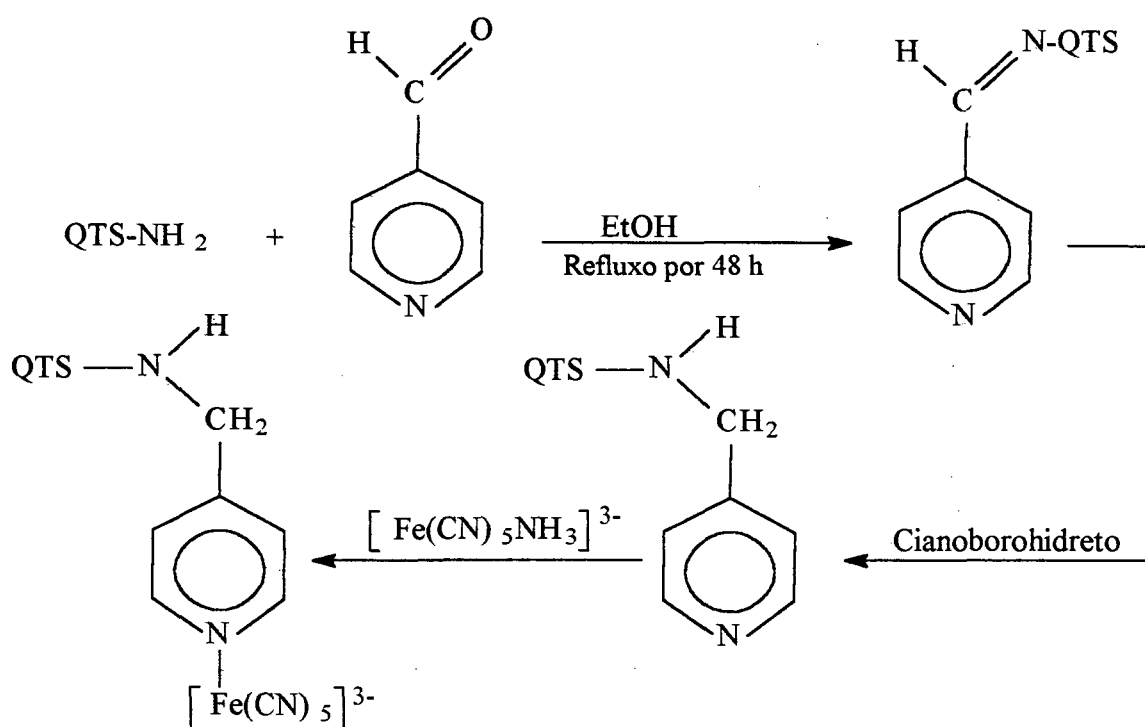
9. Shigeara, K.; Oyama, N.; Anson, F.C.- Journal of American Chemical Society 103 (1981) 2552.

13. Heller, A.- The Journal of Physical Chemistry 96:9 (1992) 3579.

19. Heller, A.- Acc. Chem. Res. 23 (1990) 128.

20. Oyama, N. and Anson, F.- Journal of the American Chemical Society 101:13 (1979) 3450.

produziram, pela reação de pentacianoferrato com poli (4-vinilpiridina), um metalo-polímero de boa resposta voltamétrica quando adsorvido na superfície de grafite pirolítico. Após estes trabalhos pioneiros, surgiram outros dos assim chamados *polímeros redox*, que voltarão a ser citados nesta monografia. O aproveitamento de quitosana, para a síntese de polímeros redox, surgiu com Stadler e Rodrigues em 1995, no departamento de química da UFSC⁴⁴. O grupo piridil foi introduzido na matriz, via reação de base de Schiff, seguida da redução por cianoborohidreto. Em seguida, pentacianoferrato foi ligado ao grupo piridil por coordenação, obtendo-se um novo polímero, que continha um par redox reversível, o pentacianoferrato II/III. O esquema reacional é



QTS = Matriz de quitosana.

Processo semelhante foi empregado pelos autores para um polímero redox com centro mediador de rutênio-EDTA. Tais polímeros, que apresentaram voltamogramas reversíveis ou quasi-reversíveis (Figura 24), mostraram-se capazes de promover algumas eletrocatalises. Desta maneira, a elevada barreira à transferência de carga, típica do polímero não modificado, estava, de certo modo, vencida, pela presença de um grupo redox na matriz polimérica.

44. Rodrigues, C.A.- Preparações de Derivados do Biopolímero Quitosana e sua Utilização em Eletrodos Modificados. Tese de Doutorado. Depto de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.

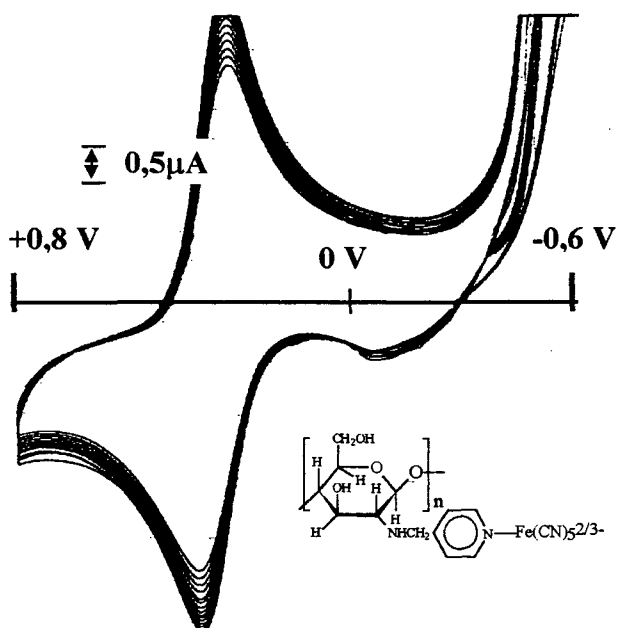


Figura 24 . O voltamograma ao lado foi obtido com o eletrodo de pasta de grafite modificado por polímero redox de quitosana^{py}[Fe(CN)₅]³⁻ *. O eletrólito de suporte foi KCl 0,1 molL⁻¹ em pH 3 e a velocidade de varredura, 100 mVs⁻¹. À medida que os ciclos se sucedem, o polímero se hidrata e incha, fazendo com que a migração dos contra-íons seja favorecida. Como consequência, a corrente cresce até alcançar valor máximo em cerca de 12 ciclos. O deslocamento de potenciais de pico, em alguns eletrodos assim preparados, chega a zero, valor teoricamente previsto para espécie eletroativa imobilizada na superfície do eletrodo.

*py = piridil

(Potenciais vs. Ag/AgCl sat.)

Os processos de electrocatálise promovidos por polímeros redox são especialmente importantes quando se trata de imobilizar o sistema a ser catalisado na superfície do eletrodo. Neste caso, a matriz polimérica, que imobiliza o mediador, também serve de suporte para o sistema a ser electrocatalisado, a exemplo do que fez Heller com a glicose oxidase. Se o sistema a ser catalisado estiver livre em solução, pode-se usar mediação mais simples, sem necessidade de intervenção dos materiais poliméricos. Um exemplo desta configuração, é encontrado no trabalho de Bertotti e Pletcher⁵ que promoveram a redução de bromato electrocatalisada por espécies de molibdênio imobilizadas sobre microeletrodo de mercúrio. Um outro exemplo de mediador imobilizado na superfície electródica, sem a intervenção de materiais poliméricos, pode ser encontrado no trabalho de Joseph, Gomathi e Rhao⁴⁸. Estes autores produziram um eletrodo de grafite (impregnado por cera) modificado por hexacianoferrato de zinco, pela simples varredura de potencial em um meio contendo K₃Fe(CN)₆ e ZnCl₂. Os voltamogramas obtidos demonstram comportamento reversível, com E⁰ = 0,63 V, sem qualquer deslocamento entre os potenciais de pico.

5. Bertotti, M. e Pletcher, D.- Anais da Associação Brasileira de Química 46:3 (1997) 189.

48. Joseph, J.; Gomathi, H.; Rao, G.P.- Journal of Electroanalytical Chemistry 431 (1997) 231.

Caracterização de quitina/quitosana

A caracterização físico-química de amostras purificadas do polímero se faz, principalmente através de: composição elementar em C, H e N; espectroscopia no infravermelho; massa molar média, e grau de desacetilação. Vejamos, de modo breve, como são feitas tais determinações.

Composição elementar em carbono, hidrogênio e nitrogênio. Dependendo da procedência, grau de acetilação e teor de umidade, a composição percentual de quitina/quitosana alcança os valores abaixo.

C - de 40 a 47%
N - de 6,3 a 8,7%
H - de 5,9 a 6,9%

Adotando o critério de solubilidade em ácido acético para diferenciar quitina de quitosana, verificou-se que, no âmbito da composição elementar, isto determinava o limite de 7% de nitrogênio. Assim, é quitina o polímero com conteúdo de nitrogênio inferior a 7% e quitosana se o conteúdo de nitrogênio for superior a este valor.

Em 1974, Lee (citado por Muzzarelli⁴⁹) preparou quitosana proveniente de diversas fontes naturais, e determinou seus conteúdos em C, H, N. Tais valores foram confrontados com aqueles obtidos teoricamente. Os valores teóricos correspondem a polímeros 100% acetilado, 100% desacetilado e a misturas destes dois materiais em diferentes composições, juntando às misturas, diferentes quantidades de água. Foram assim obtidos diferentes valores para a composição em C, H, N. Por exemplo, em uma amostra foi obtido: C - 41,5%; H - 6,5% e N - 7,51%. A concordância com valores teóricos só foi obtida quando se considerou uma mistura de: 58,5% de poli-N-acetilglicosamina; 35,7% de poliglicosamina e 5,8% de água, para a qual se obtém: C - 43,7%; H - 6,8% e N - 7,15%. Assim, os valores de partida

49. Muzzarelli, R.A.A. - Chitin. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 89.

foram os correspondentes aos polímeros 100% acetilado e 100% desacetilado, fornecidos abaixo

| material | C | H | N | massa molar da unidade monomérica (gmol^{-1}) |
|--------------------------|-------|------|------|---|
| poli-N-acetilglicosamina | 47,3% | 6,4% | 6,9% | 203 |
| poliglicosamina | 44,7% | 6,8% | 8,7% | 161 |

As diferentes contribuições de unidades monoméricas acetiladas ou não, podem ser inferidas pela determinação do grau de desacetilação, que será descrita adiante.

É importante lembrar que sempre aparece água nas amostras de quitina/quitosana, sendo comum os valores entre 5 e 10%, na dependência da origem do material e do método de secagem. Além disto, polímeros naturais podem apresentar variações em sua composição glicídica. Por exemplo, a cutícula do inseto *Palamneus Swammerdami* tem como produto de hidrólise, galactose e não glicose⁴⁹, com suas diretas conseqüências na composição elementar.

49. Muzzarelli, R.A.A.- Chitin. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 89.

Espectroscopia no infravermelho. Os espectros apresentam-se como mostra a Figura 25 onde se pode também perceber os grupos associados a cada banda característica. Os filmes para a espectroscopia no infravermelho podem ser preparados a partir de soluções de quitosana em ácido acético, pelo seu gotejamento em uma pequena placa de um material vítreo de baixa absorção nesta região do espectro. Após evaporação do excesso de solução ácida, o filme produzido é alcalinizado por vapor de NH_3 ou solução aquosa de NaOH e, lavado com água. Após a secagem, de preferência sob vácuo, realiza-se a varredura espectral, descontando-se a absorção da placa de suporte.

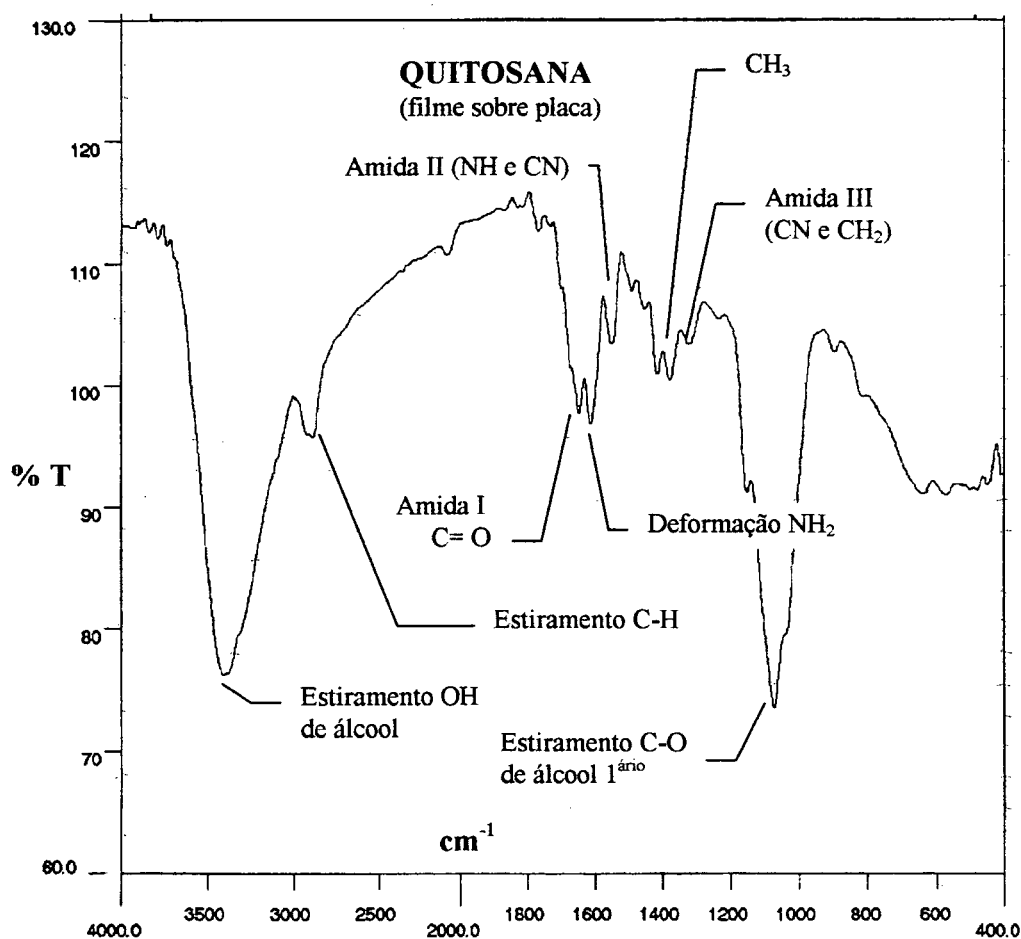


Figura 25. Espectro na região do infravermelho para quitosana^{36, 49-52}

36. Fávere, V.T.- Adsorção de íons Cu II, Cd II, Ni II, Pb II, e Zn II pelo Biopolímero Quitina, Quitosana e pelas Quitosanas Modificadas. Tese de doutoramento. Depto. de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1994.

49. Muzzarelli, R.A.A.- Chitin. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 89.

50. Muzzarelli, R.A.A.- Chitin. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 89.

51. Silverstein, R.M.; Bassler, G.C.; Morrill, T.C.- Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 3ª edição. Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1979.

52. Muzzarelli, R.A.A.; Jeniaux, C.; Gooday, G.W. (ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press. New York, 1986. Página 300.

Massa molar média. Este importante parâmetro pode ser avaliado por medidas de viscosidade⁵³ ou através de cromatografia de permeação em gel (com detecção por índice de refração ou espalhamento de luz) ou ainda por instrumentos baseados no espalhamento de luz.

Fundamentalmente, os métodos baseados em medidas de viscosidade estão ancorados na lei de Mark-Howink:

$$[\eta] = KM^a$$

onde:

[η] é a viscosidade intrínseca de um polímero linear
 “M” é a massa molar média do polímero
 “K” e “a” são constantes características do sistema polímero-solvente

Sterzer, Sanchez e Rha (citados por Muzzarelli⁵⁴), através de uma abordagem teórica, situam o valor da constante “a” entre os limites abaixo.

| | |
|--|--------------|
| | <u>a</u> |
| polímero em conformação <i>globular</i> ----- | < 0,5 |
| polímero em conformação <i>espiral randômica</i> ----- | de 0,5 a 0,8 |
| polímero em conformação <i>expandida</i> ----- | >0,8 |

Considerando que a quitosana pode assumir qualquer das conformações acima, verifica-se, portanto, a grande dificuldade do estabelecimento de uma relação entre viscosidade e massa molar média para as soluções de quitosana. Realmente os resultados encontrados na literatura para as constantes acima (sugerindo a influência de efeitos não conformacionais, como densidade de carga no polímero, grau de desacetilação etc.) são contraditórios a ponto de por em cheque a própria validade da aplicação da lei viscométrica⁵⁴.

A determinação de massa molar média por cromatografia líquida de permeação em gel está baseada nas diferentes velocidades de migração de moléculas de volume hidrodinâmico diferente, ao interagirem distribuídas entre um solvente móvel e uma fase estacionária constituída de material de porosidade controlada. As cadeias de maior massa molar interagem menos com a porosidade da fase estacionária, eluindo mais rápido. As de menor massa molar,

53. Billmeyer, F.W.- Textbook of Polymer Science. 3rd edition. Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons. New York, 1984.

54 Muzzarelli, R.A.A.; Jeniaux,C.; Gooday,G.W.(ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press. New York, 1986. Página 338.

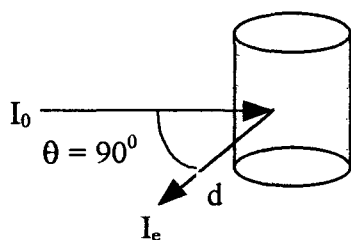
inversamente, eluem mais lentamente. O volume hidrodinâmico por sua vez, é $M[\eta]$. A viscosidade intrínseca aqui aludida é da solução sob eluição e a massa molar média, aquela da espécie que sai do sistema cromatográfico no momento em que o pico é traçado no cromatograma. Mostrou-se possível, por medições de viscosidade, e valendo-se de padrões de massa molar média conhecida, construir uma curva analítica que relaciona linearmente o volume hidrodinâmico com o volume de eluição.

Domard e Rinaudo¹⁸ realizaram um estudo sobre cromatografia de permeação em gel para diversos polímeros catiônicos, incluindo a quitosana. A coluna foi uma sílica modificada por grupos de amônio quaternários, portanto em si, uma estrutura catiônica que evita efeitos de adsorção. A repulsão eletrostática entre os polímeros e a fase estacionária, foi anulada (controlando a força iônica do eluente) para que, exclusivamente, se estabelecessem as interações estéricas típicas de permeação em gel. Para a quitosana, de modo bastante crítico, o eluente ideal foi solução aquosa de acetato de amônio $5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. Em tais condições, os autores obtiveram boa linearidade para a quitosana, inclusive com outros polímeros, classicamente usados como padrões de massa molar, caindo sobre a mesma curva. Isto indica que, usando esta coluna de sílica gel catiônica, é possível avaliar a massa molar média de amostras de quitosana. Todavia, os autores usaram apenas quitosana 100% desacetilada, restando a dúvida sobre os efeitos que exerceriam sobre as curvas analíticas, quitosanas parcialmente acetiladas.

Os equipamentos que medem massa molar média valendo-se do **espalhamento de luz**, criaram a atraente possibilidade de fazê-lo de modo absoluto. Para tanto é necessário a medida direta de uma série de parâmetros óticos e levar-se em conta as concentrações em peso de soluções do polímero. Este método está descrito na literatura⁵⁵ e baseia-se na intensidade da radiação espalhada por uma solução do polímero.

18. Domard, A.; Rinaudo, M.- Polymer Communications, 25 (1984) 55.

55. Richards, E.G.- An Introduction to the Physical Properties of Large Molecules in Solution. Cambridge University Press. Cambridge, London, 1980.



Considere-se que uma radiação não polarizada e monocromática de comprimento de onda λ e intensidade I_0 esteja incidindo sobre uma solução de polímero com concentração em massa ρ , cujo solvente tem índice de refração n_0 . Haverá um espalhamento de luz provocado pelo soluto, cuja intensidade I_e pode ser medida convenientemente no ângulo $\theta = 90^\circ$, uma vez percorrida a distância d . É possível demonstrar⁵⁵ que

$$\frac{I_e}{I_0} = \frac{2\pi^2 n_0^2 (dn/d\rho)^2 \rho}{\lambda^4 N (1/M + 2B\rho) d^2}$$

Onde: $dn/d\rho$ é o incremento no índice de refração acarretado pelo aumento da concentração do soluto;

N é a constante de Avogadro;

B é o segundo coeficiente virial;

M é a massa molar média do polímero.

O processo através do qual a massa molar média pode ser obtida é o seguinte. Chama-se de K o termo que engloba todas as constantes

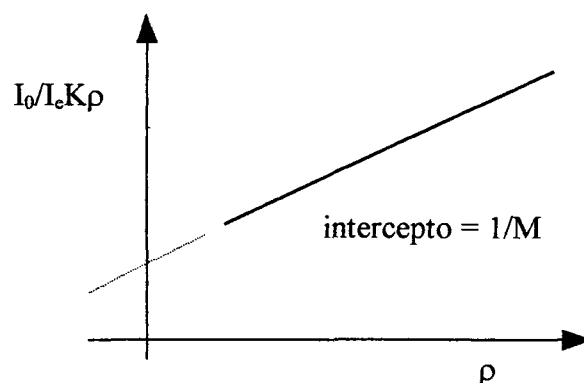
$$K = \frac{2\pi^2 n_0^2 (dn/d\rho)^2}{\lambda^4 N d^2}$$

Determina-se o valor de K , partindo-se dos valores do índice de refração do solvente, da distância “ d ”, do comprimento de onda da radiação (λ) e do valor do incremento no índice de refração ($dn/d\rho$), determinado com várias soluções do polímero. Rescrevendo a equação inicial, vem

$$\frac{I_e}{I_0} = \frac{K\rho}{1/M + 2B\rho} \quad \text{ou} \quad \frac{I_0 K\rho}{I_e} = 1/N + 2B\rho$$

55. Richards, E.G.- An Introduction to the Physical Properties of Large Molecules in Solution. Cambridge University Press. Cambridge, London, 1980.

Finalmente, medem-se as frações radiação incidente/radiação espalhada para soluções de diversas concentrações do polímero e coloca-se em gráfico $I_0/I_e K\rho$ vs ρ , obtendo-se o valor de $1/M$ através do coeficiente linear da curva obtida.



Este método requer que o tamanho das moléculas do polímero seja maior que o comprimento de onda da radiação. Além disto, a expressão teórica citada é válida para um volume unitário da solução do polímero. Na prática, usa-se um volume preciso qualquer e divide-se a fração I_0/I_e por este valor. Um cuidado muito importante a ser tomado é assegurar ausência de partículas em suspensão, como seria o caso de poeira.

A vantagem deste método sobre a cromatografia de permeação em gel é de dispensar padrões de massa molar. Um tratamento mais complexo⁵⁶ permite obter, mais que a massa molar média, a distribuição das massas molares, tal como a cromatografia.

Grau de acetilação de quitina/quitosana. Se dissolvermos quitosana em solução aquosa de ácido forte, haverá no meio duas espécies ácidas: os grupos amino protonados da matriz polimérica (NH_3^+) e os hidroxônios (H_3O^+). Assim, se titularmos o sistema com uma solução de NaOH, perceberemos duas inflexões na curva pH vs volume de titulante, a primeira associada à neutralização dos hidroxônios e a segunda, aos grupos NH_3^+ . A diferença dos volumes de titulante entre as inflexões é proporcional à quantidade de matéria de grupos NH_2 presentes, e, portanto, ao grau de desacetilação do polímero. O grau de acetilação varia

56. Metille, M.J.; Hester, R.D. - Water Solubles Polymers. cap. 18. Editado por Shalaby, W.; Shalaby, C.; Mc Cormick, L.; Butler, G.B. ACS Symposium Series 467, 1991.

de 0 a 1, sendo usual sua apresentação multiplicado por 100, na linguagem percentual. A curva de titulação abaixo, e sua primeira derivada demonstram as idéias aqui apresentadas.

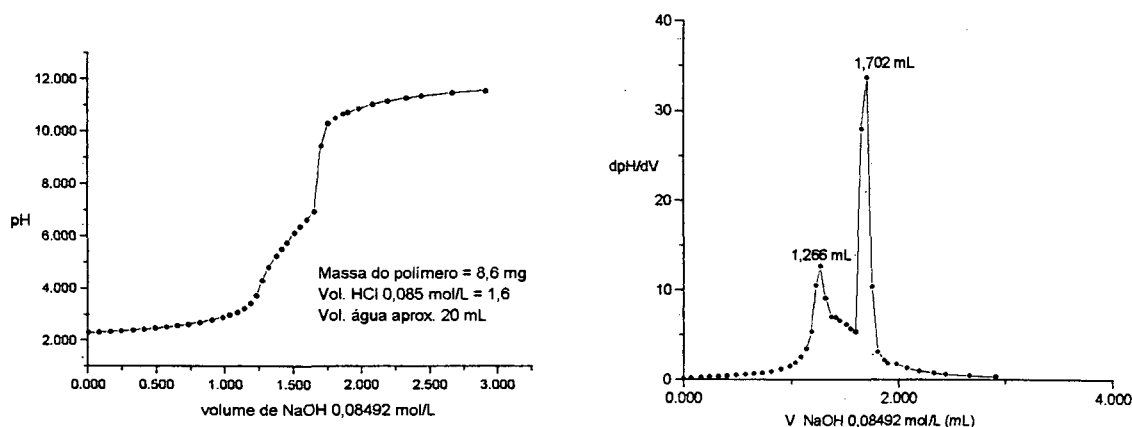


Figura 26. Curvas de Titulação para solução aquosa de quitosana protonada por HCl.

A expressão para o cálculo pode ser obtida pelo seguinte desenvolvimento. Vamos considerar que m miligramas de polímero tenham sido dissolvidos em excesso de ácido forte e titulados por NaOH $C \text{ mol L}^{-1}$, de forma tal que os máximos da curva derivada tenham sido obtidos a volumes, em mL, V_1 e V_2 , respectivamente associados às saídas dos dois prótons. Como a estequiometria molar $\text{NH}_3^+ : \text{HO}^-$ é 1 : 1, a quantidade de matéria de grupos amino protonados é

$$a = (V_2 - V_1)C \text{ mmol}$$

Consideremos que a quitosana 100% desacetilada tem 161 mg.mmol^{-1} . Então, a massa, em mg, de monômeros desacetilados será $161a$.

O grau de desacetilação estabelecido em % m/m, será obtido pela expressão

$$\% \text{ de desacetilação} = \frac{161 a}{m} \times 100$$

Este método, desenvolvido por Broussignac, em 1970⁵⁷, foi criticado por fornecer resultados ligeiramente mais baixos que o real, possivelmente porque seja difícil a retirada dos últimos prótons da matriz polimérica, ao longo do tempo em que se faz uma titulação. Outros métodos aparecem na literatura, baseados em: a) espectroscopia no infravermelho, explorando a banda correspondente à C=O amídica⁵⁸ reação com excesso de salicilaldeído, seguida da determinação espectroscópica deste excesso de aldeído⁵⁹ e espectroscopia no ultravioleta, usando a primeira derivada do espectro com calibração via N-acetilglicosamina⁶⁰.

Por serem ferramentas de acesso mais restrito que as citadas acima, a ressonância magnética nuclear e a análise termogravimétrica são pouco usadas e não estão aqui discutidas, mas, dependendo da finalidade do estudo, elas desempenham papel decisivo. Por exemplo, os estudos sobre possíveis ligações de hidrogênio na matriz polimérica foram realizados por RMN de prótons¹⁴ e estudos de energia de hidratação ou estabilidade térmica do polímero e seus derivados, por calorimetria de varredura diferencial³⁶

14. Muzzarelli, R.A.A.; Jeniaux,C.; Gooday,G.W.(ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press. New York, 1986. Página 343.

36. Fávere, V.T.- Adsorção de ions Cu II, Cd II, Ni II, Pb II, e Zn II pelo Biopolímero Quitina, Quitosana e pelas Quitosanas Modificadas. Tese de doutoramento. Depto. de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1994.

57. Broussignac, J.- *Chimie Industriel et Général* 99:9 (1970) 1241.

58. Domszy, J.G.; Roberts, A.F.- *Makromolekular Chemistry* 186 (1985) 1671.

59. Moore, G.K.; Roberts, G.A.F.- *International Journal of Biological Macromolecules* 2 (1980) 115.

60. Muzzarelli, R.A.A.; Jeniaux,C.; Gooday,G.W.(ed.) - Chitin in Nature and Technology. Plenum Press. New York, 1986. Página 385.

1.3- Biossensores

Biossensores são dispositivos destinados à detecção de espécies químicas e se caracterizam por um sensor ao qual se acopla uma camada de enzima ou outros componentes biológicos que contenham enzimas, antígenos ou anticorpos: tecidos, células, organelas etc⁶¹. Os biossensores, de acordo com o sensor empregado, podem ser eletroquímicos, óticos e gravimétricos, sendo os eletroquímicos (potenciométricos, condutimétricos ou, principalmente, amperométricos) os mais produzidos. A Figura 27 resume estas idéias⁶¹.

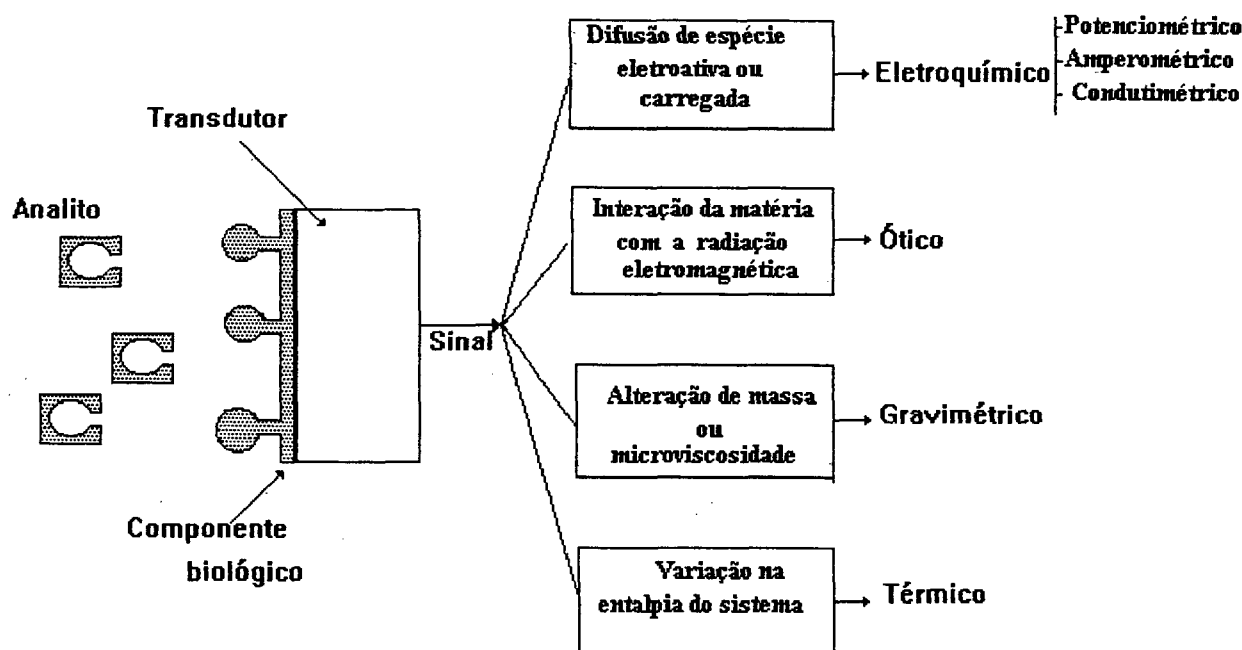


Figura 27. Biossensores: produção e transdução do sinal analítico.

O primeiro biossensor foi produzido por Clark em 1962, e utilizava um sensor amperométrico⁶¹. Um eletrodo de platina polarizado a 0,6V era assim preparado para a detecção de H_2O_2 proveniente da reação de oxidação de glicose, catalisada por glicose oxidase. Esta enzima estava imobilizada na ponta do sensor entre duas membranas poliméricas de permeabilidade seletiva: uma de policarbonato e outra de acetato de celulose. Além de

61. Biosensor, Fundamentals and Applications. Edited by Tumer, A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S. Oxford University Press, Oxford, 1987.

suporte de imobilização enzimática, as membranas serviam para limitar o acesso de interferentes ao eletrodo (Figura 28). A corrente gerada era limitada pelo gradiente de concentração de peróxido de hidrogênio, indiretamente ligado à concentração de glicose.

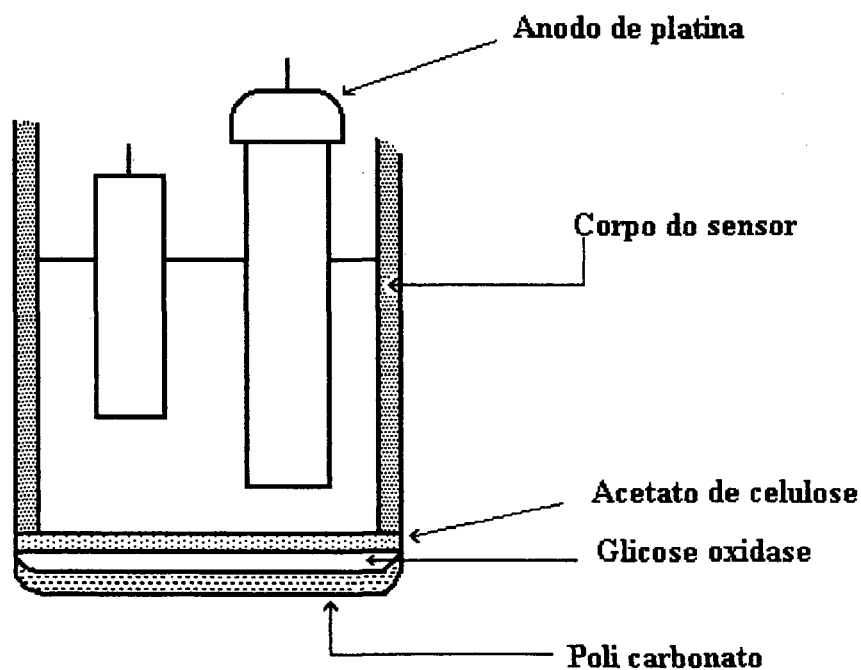
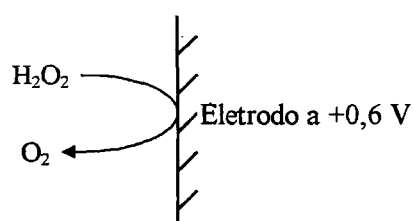
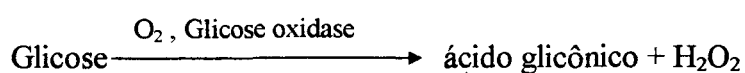


Figura 28. Biossensor de Clark (1962). A glicose permeava a membrana de policarbonato e era oxidada por oxigênio com mediação da enzima glicose oxidase, produzindo H₂O₂. O peróxido de hidrogênio atravessava a membrana de acetato de celulose, sendo oxidado no anodo a oxigênio.

O desempenho deste biossensor foi tal que originou o primeiro medidor amperométrico de glicose, comercializado pela firma americana Yellow Springs Instruments Company a partir de 1974. O processo eletroquímico é mostrado abaixo.



A estrutura básica deste biossensor enzimático é seguida por todos os outros. A tabela 2 ilustra alguns exemplos.

Tabela 2. Biossensores Eletroquímicos

| ANALITO | ENZIMA | MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA | ELETRODO BASE | MEDIAÇÃO | REFERÊNCIA |
|-------------------------------------|--|--|--|--|------------|
| l-glicose | glicose oxidase | co-reticulação a albumina de soro bovino com glutaraldeído | tungstênio/óxido de tungstênio (potenciométrico) | - | 63 |
| l-glicose | glicose oxidase | ancoramento eletrostático e covalente a polímero redox | ouro com polímero redox adsorvido (amperométrico) | Os(bpy) ₂ na matriz polimérica | 64 |
| l-glicose | glicose oxidase | co-reticulação a polímero redox com glutaraldeído | carbono vítreo com polímero redox adsorvido (amperométrico) | ferroceno na matriz polimérica | 65 |
| l-glicose | glicose oxidase | confinamento físico em polímero condutor (polipirrol) | platina (amperométrico) | não há (contato direto via polipirrol) | 66 |
| l-glicose | glicose oxidase | ancoramento covalente direto ao eletrodo modificado por boronato | carbono vítreo ao qual se imobilizou boronato (amperométrico) | boronato | 67 |
| l-glicose | glicose oxidase | confinamento via processo sol-gel | fio de Pt recoberto por biocerâmica de pentóxido de vanádio-enzima (amperométrico) | não há (contato direto via matriz de pentóxido de vanádio) | 68 |
| uréia, acetil colina e penicilina G | urease, acetil colinestearase e penicilinase | confinamento em gel reticulado por glioxal | eletrodo de vidro para pH (potenciométrico) | - | 69 |
| Nitrato | nitrato redutase | confinamento físico em um filme de polipirrol substituído por viologênio | carbono vítreo (amperométrico) | viologênio | 70 |
| l-lactato | lactato oxidase | ancoramento covalente sobre matriz de quitosana via glutaraldeído. | filme de mercúrio sobre carbono vítreo (amperométrico) | O ₂ | 23 |

23. Hikima, S.; Kakizaki, T.; Taga, M.; Hasebe, K.- *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 345 (1993) 607.
 63. Magna, A.; Capelato, M.D.; Fatibello-Filho, O.- *Journal of Brazilian Chemical Society* 4:2 (1993) 72.
 64. Degani, Y.; Heller, A.- *Journal of American Chemical Society* 111 (1989) 2357.
 65. Calvo, E.J.; Danilowicz, C.; Diaz, L.- *Journal of Chemical Society Faraday Transation* 89:2 (1993) 377.
 66. Koopal, C.G.J.; Nolte, R.J.M.- *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 33 (1994) 45.
 67. Narasimhan, K.; Wingard, L.B.- *Analytical Chemistry* 58:14 (1986) 2984.
 68. Glezer, V.; Lev, O.- *Journal of American Chemical Society* 115 (1993) 2533.
 69. Tor, R.; Freeman, A.- *Analytical Chemistry* 58:6 (1986) 1042.
 70. Cosnier, S.; Innocent, C.; Jouanneau, Y.- *Analytical Chemistry* 66:19 (1994).

Além destes, Guilbault⁷¹ cita uma série de outras substâncias já determinadas através de biossensores enzimáticos: ácido acético, ácido fórmico, adenosina, AMP, ATP, alcóois, aldeídos, aminas, d e l aminoácidos, amidalina, ácido ascórbico, colesterol, maltose, mercúrio (via inibição de urease), NAD, NADH, nitrito, ácido oxálico, peróxido, fenol, tiosulfato e ácido úrico. Isto até os anos 80. Hoje o número de analitos detectáveis por biossensores é ainda maior.

O número de publicações que descrevem biossensores teve um grande crescimento nos anos 70 e 80, experimentando um certo declínio nos anos 90, embora seja ainda hoje grande a atenção que pesquisadores de todo o mundo dedicam a este campo¹¹⁶⁻¹¹⁹.

Os biossensores e os dosadores de medicamento auto-regulados¹³.

O grande e promissor campo de aplicações dos biossensores é realmente a área médica. Bioanalitos de primeira importância como glicose, lactato, uréia, ácido úrico, colesterol além de macromoléculas como antígenos e as próprias enzimas podem ser detectados por biossensores eletroquímicos. O mais elevado de todos os objetivos seria, sem dúvida, o desenvolvimento dos *dosadores de medicamento auto regulados* (feedback loop). Estes dispositivos, seriam transportados pelo usuário, por exemplo um diabético, e compostos de: um biossensor de glicose; um reservatório de insulina; uma bomba dosadora e um microcomputador (Figura 29).

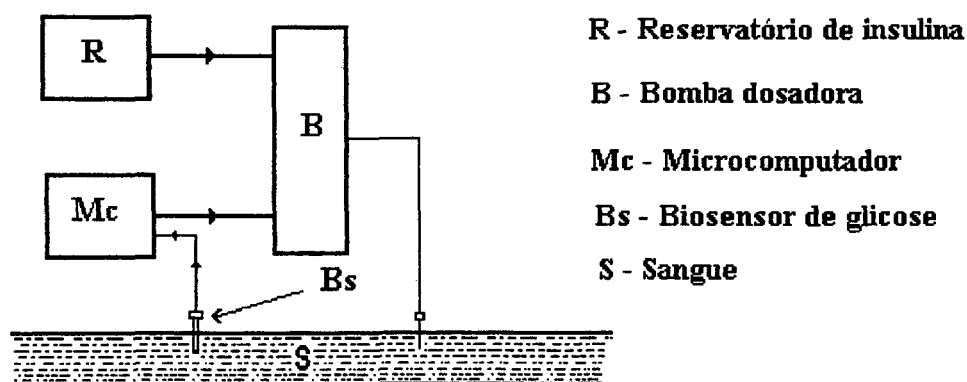


Figura 29. Dosador de medicamento auto-regulado. O diabético poderia ter uma vida normal, graças ao monitoramento contínuo de glicose.

13. Heller, A. - The Journal of Physical Chemistry 96:9 (1992) 3579.

71. Guilbault, G.G. - Analytical Uses of Immobilized Enzymes. Marcel Dekker, Inc. New York, 1984.

116. Janata, J.; Bezegh, A. - Chemical Sensors. Analytical Chemistry 60:12 (1988) 38.

117. Janata, J. - Chemical Sensors. Analytical Chemistry 62:12 (1990) 33R.

118. Janata, J. - Chemical Sensors. Analytical Chemistry 64:12 (1992) 196R.

119. Janata, J.; Josowicz, M.; Devaney, R.S. - Chemical Sensors. Analytical Chemistry 66:12 (1994) 207R.

O biossensor enviaria um sinal para o computador, assim que houvesse a menor indicação de acúmulo de glicose no sangue. O computador imediatamente aciona a bomba que, no momento certo e em quantidade apropriada, envia ao sangue a insulina do reservatório, muito antes que surjam sintomas graves.

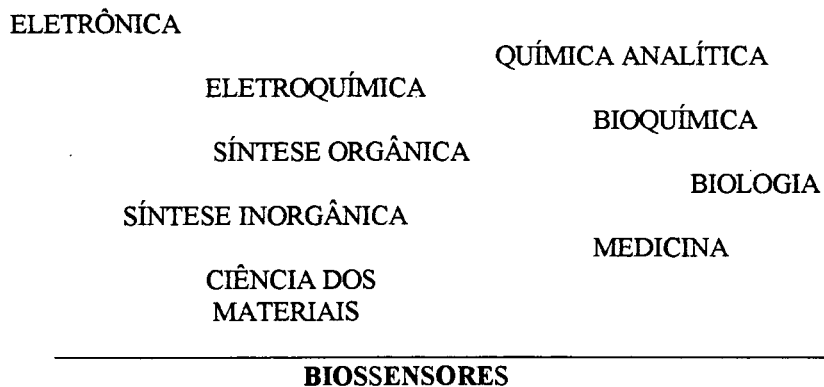
Este pâncreas artificial requer um microcontrolador, uma bomba e um biossensor. O micro computador e a bomba já existem com desempenho satisfatório. Do biossensor seria necessário

- a) Alta seletividade para glicose (livre de qualquer interferente encontrado no sangue).
- b) Biocompatibilidade (nenhum componente lixiviável para o sangue, materiais não tóxicos e facilmente esterilizáveis e, o mais difícil: um mínimo de rejeição pelo organismo).
- c) Durabilidade (evitando trocas freqüentes).
- d) Linearidade de resposta à glicose na faixa de 1 a 15mmol L⁻¹.
- e) Tempo de resposta inferior a 10 minutos.
- f) Resposta independente de fluxo sanguíneo, variações de O₂ no sangue, movimentos do usuário.
- g) Estabilidade do filme enzimático ao pH e temperatura fisiológicos (37°C).
- h) Dimensões reduzidas, atenuando ao máximo o desconforto do usuário.

Atualmente parece não haver, a despeito de centenas de trabalhos publicados, um biossensor que reúna todas estas características, sendo este um dos grandes desafios da eletroanalítica⁷². Em um artigo mais recente⁷³, o autor afirma que “os problemas analíticos estão resolvidos”. Restaria, então, equacionar, da melhor forma possível, o problema da rejeição, para que tivéssemos os dosadores de medicamento auto-regulados em escala comercial.

Multidisciplinaridade e tolerância

O campo dos biossensores, tal como muitos na ciência moderna, requer conjunção de diversos domínios do conhecimento humano, como ilustra, de modo esquemático, o quadro a seguir



Como é muito difícil um único pesquisador reunir a competência necessária em tantas áreas diferentes, fica claro a necessidade de esforço cooperativo de profissionais diferentes. Isto requer trabalho conjunto, só possível em ambiente de respeito e tolerância. Pesquisadores, ainda que individualmente competentes, que não puderem acionar as qualidades humanas exigidas pelo trabalho grupal, não poderão contribuir para a superação dos desafios no desenvolvimento de bons biossensores.

72. Reach, G.; Wilson, G.S.- Analytical Chemistry 64:6 (1992) 381A.
73. Henry, C.- Analytical Chemistry, News & Features 70 (1998) 594A

1.4- Imobilização de Enzimas

A partir do momento em que se tornou interessante o uso de enzimas purificadas para a realização de reações de alta seletividade, diante do custo elevado de tais reagentes, buscou-se uma condição de reutilização das enzimas (uma vez que são, como todo catalisador, regeneradas no processo) evitando que fossem lixiviadas para o meio reacional ou, mesmo que recuperadas, perdessem a atividade catalítica. Segundo Guilbault⁷¹, em 1916, Nelson e Griffin imobilizaram invertase por adsorção em carvão e verificaram que a enzima imobilizada mantinha a sua atividade biológica e podia ser reutilizada muitas vezes. Todavia, este assunto ficou em dormência até iniciar grande desenvolvimento a partir dos anos 50.

Imobilização - Vantagens

Além do argumento econômico, dramático para certas enzimas que imobilizadas podem ser reutilizadas até 10.000 vezes, há outros.

a) Aumento da estabilidade. A imobilização é uma das melhores maneiras de estabilizar enzimas⁶². Isto acontece pela restrição aos movimentos da cadeia proteica. Tais movimentos, se realizados livremente no seio da solução, só produzirão a exata conformação reativa da enzima com probabilidade muito pequena. Comprovadamente, enzimas imobilizadas são mais resistentes ao tempo, mudanças de pH e elevação de temperatura. Aliás, a conservação de enzimas purificadas no estado sólido e a baixas temperaturas também se explica à custa de restrição da liberdade conformacional.

b) Insensibilidade a interferentes: Já está estabelecido^{62,71} que enzimas imobilizadas estão menos sujeitas aos ativadores ou inibidores que afetam as enzimas em solução. Somente os inibidores muito fortes vão conseguir reduzir a atividade da enzima. Por outro lado, somente os ativadores muito fortes vão conseguir aumentar a atividade enzimática. Por este motivo, em matrizes complexas, como fluidos biológicos, as enzimas imobilizadas são superiores como reagentes analíticos.

62. Biosensor & Chemical Sensor- Optimizing Performance Through Polymeric Materials. Edited by Edelman, P.G.; Wang, J. ACS Symposium Series 487, 1991.

71. Guilbault, G.G.- Analytical Uses of Immobilized Enzymes. Marcel Dekker, Inc. New York, 1984.

Imobilização - Métodos

No eletrodo de Clark a enzima glicose oxidase estava aprisionada entre duas membranas. A porosidade das membranas era de tal ordem a impedir difusão de grandes moléculas, ficando a enzima fisicamente confinada.

Nos eletrodos de Heller, glicose oxidase (de superfície negativamente carregada) é acoplada a um polímero polieletrólito catiônico, este por sua vez adsorvido em eletrodo de ouro.

Janata prendeu finas fatias de tecido biológico (fígado e outros) sobre um eletrodo de pH usando uma rede de malhas finas de “nylon” (poliamida).

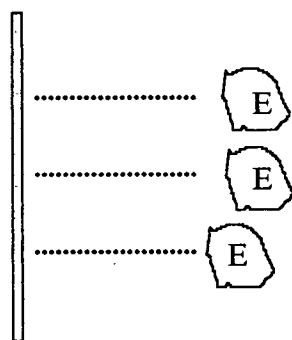
Wingard e colaboradores engaiolaram glicose oxidase, misturando-a com albumina de soro bovino, seguido de reticulação com glutaraldeído sobre eletrodo de platina.

Miyawaki e Wingard coimobilizaram FAD e glicose oxidase por adsorção sobre eletrodo de carbono vítreo de média porosidade.

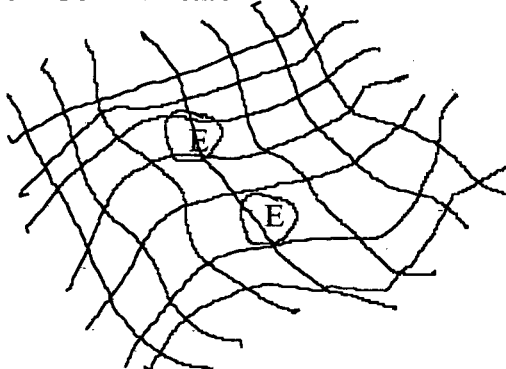
Sobre um eletrodo de platina, Verduyn e colaboradores fizeram coimobilização de álcool oxidase e catalase, usando glutaraldeído como agente reticulador. Rechnitz e Bradley fizeram o mesmo, usando apenas adenosina desaminase.

Além destes exemplos, há muitos outros úteis em situações diferentes daquelas dos sensores eletroquímicos: imobilização em vidro, em carvão ativado, em géis de acrilamida, alginato, colágeno etc. Os métodos são numerosos e escolhidos de acordo com os usos específicos que se vai fazer das enzimas, mas podem ser agrupados em 5 possibilidades:

a - Adsorção física sobre suporte sólido



Os suportes podem ser albumina, carvão, argila, celulose, kaolinita, colódio, sílica-gel, vidro, hidroxiapatita e colágeno. Vantagem: Ausência de reagentes e simplicidade. Desvantagem: Enzimas frouxamente imobilizadas, podendo ser lixiviadas e desnaturadas.

b - Confinamento^{66,68,70}

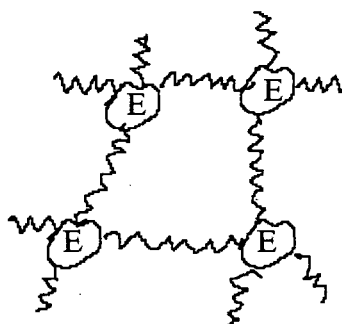
Em gel: acrilamida, alginato, sílica

Em sanduíche de membranas de permeabilidade seletiva: policarbonato, acetato de celulose, quitosana.

Em microcápsula.

Este método tem como inconvenientes o escape da enzima pelas "malhas" maiores e adição de uma barreira de difusão ao analito.

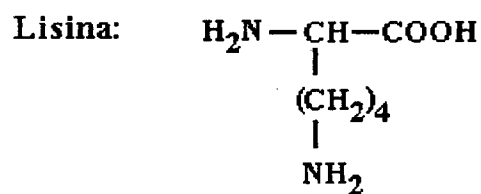
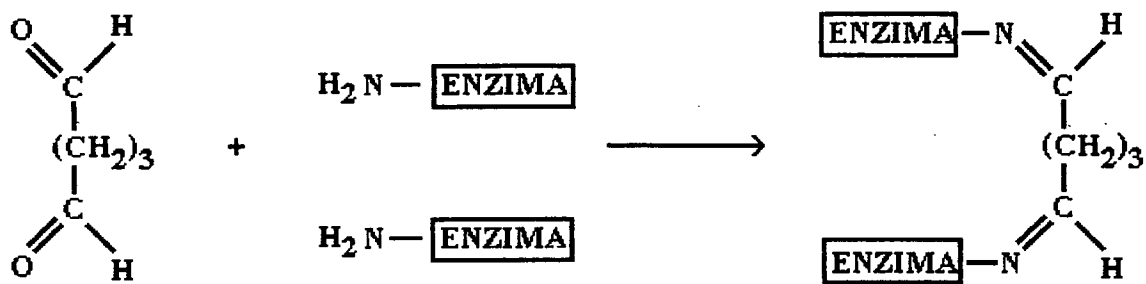
c - Reticulação da própria enzima



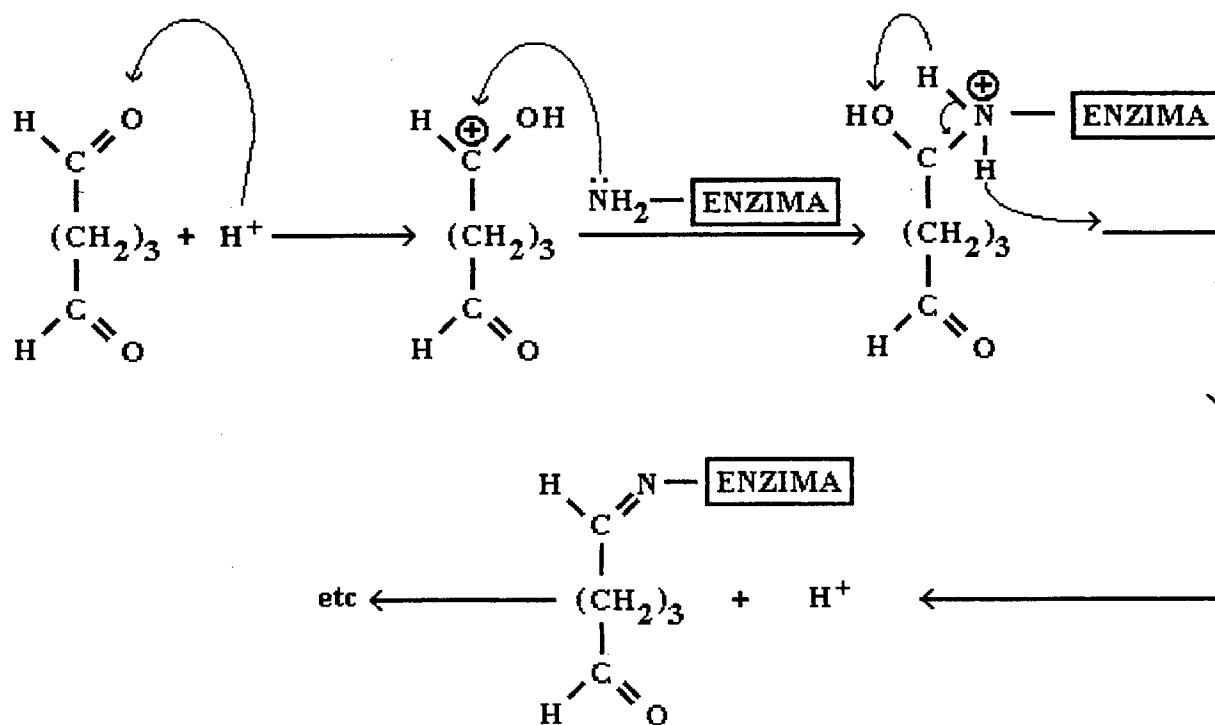
Reagentes bifuncionais provocam uma polimerização da enzima fixando-a sobre uma matriz sólida. É pouco usado desta maneira, pois enzimas são caras e boa parte delas terão função de agir meramente como suporte. Além disto há, também aqui, uma nova barreira difusional. Todavia, quando combinado a outros métodos de ancoramento (covalente e adsortivo) é uma boa alternativa para imobilizar um pouco mais a enzima.

O reagente bifuncional mais empregado é o glutaraldeído, que reage com os grupamentos aminos dos resíduos de lisina da estrutura da enzima. O esquema reacional é

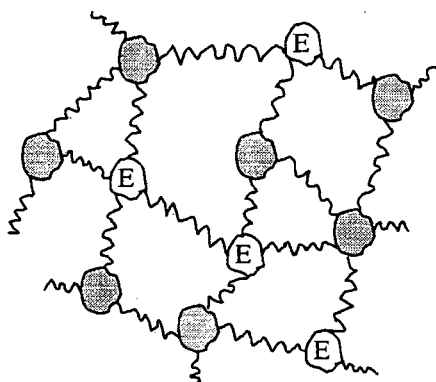
66. Koopal, C.G.J.; Nolte, R.J.M.- *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 33 (1994) 45.
 68. Glezer, V.; Lev, O.- *Journal of American Chemical Society* 115 (1993) 2533.
 69. Tor, R.; Freeman, A.- *Analytical Chemistry* 58:6 (1986) 1042.
 70. Cosnier, S.; Innocent, C.; Jouanneau, Y.- *Analytical Chemistry* 66:19 (1994).



Ou mais claramente⁷⁴

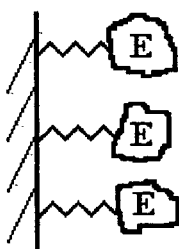


d- Co-reticulação a uma outra matriz polimérica^{23,63-65}



Este é o método mais empregado. No caso mais freqüente, a enzima é co-reticulada a albumina de soro bovino através de glutaraldeído. Outras matrizes poliméricas possíveis são a quitosana e polímeros redox. No caso de imobilização de enzimas sobre eletrodos sólidos, este método nem sempre é satisfatório pois a rede de ligações covalentes pode soltar-se por inteira da superfície do eletrodo base.

e - Ancoramento covalente⁶⁷



Este é considerado o método mais eficiente porque a enzima, fica realmente protegida contra lixiviação, tem maior estabilidade e a imobilização é relativamente insensível a mudanças de pH, força iônica, solvente ou temperaturas. Naturalmente, o ancoramento precisa ser feito na cadeia lateral, ou seja, naqueles grupamentos que não comprometam o sítio ativo da enzima. Normalmente, aproveita-se grupamentos nucleofílicos para o acoplamento: amino, fenol (tirosina), carboxila, tiol (cisteína).

Eletrodos de grafite permitem acoplamento covalente direto à sua superfície, manobra que é muito elegante: oxida-se a superfície do eletrodo de forma a produzir grupamentos COOH. A partir daí, pode-se seguir dois caminhos: usando carbodiimida ou através do cloreto de tionila, tal como já foi mostrado para a imobilização de quitosana.

23. Hikima, S.; Kakizaki, T.; Taga, M.; Hasebe, K.- *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 345 (1993) 607.

63. Magna, A.; Capelato, M.D.; Fatibello-Filho, O.- *Journal of Brazillian Chemical Society* 4:2 (1993) 72.

64. Degani, Y.; Heller, A.- *Journal of American Chemical Society* 111 (1989) 2357.

65. Calvo, E.J.; Danilowicz, C.; Diaz, L.- *Journal of Chemical Society Faraday Transation* 89:2 (1993) 377.

67. Narasimhan, K.; Wingard, L. B.- *Analytical Chemistry* 58:14 (1986) 2984

Estabilidade das enzimas imobilizadas ao longo do tempo

Ao lado da alta seletividade associada às reações enzimáticas, caminha a irrefutável limitação quanto à sua estabilidade. Todos os biossensores apresentam uma resposta ao analito que cai gradualmente ao longo dos dias. Perdas pequenas (em torno de 10%) com o passar de dias ou meses são muito raras, havendo necessidade de reposição freqüente da membrana enzimática. Fica bastante claro que, além da imobilização, outras estratégias precisam ser utilizadas a fim de produzir biossensores com membranas mais duráveis do que as hoje disponíveis. Atualmente, o esforço neste sentido tem avançado com as seguintes estratégias.

- a) Modificação na cadeia de aminoácidos via engenharia genética⁶².
- b) Modificação na cadeia lateral via reação química (enxerto de polissacarídeos ou polímeros sintéticos, alquilação, acetilação, etc.)⁶².
- c) Exploração de múltiplas maneiras de imobilização⁶².
- d) Utilização de tecidos e extratos brutos. Esta estratégia, simples e eficiente, apoia-se no argumento de que, próximas de sua condição natural, as enzimas tem maior estabilidade^{114,115}.

Este é um campo especialmente importante no desenvolvimento de biossensores realmente úteis e, certamente, grandes avanços ainda estão por vir nos próximos anos.

Para a construção de biossensores eletroquímicos é necessário que, uma vez imobilizadas na superfície dos eletrodos, as enzimas sejam eletricamente conectadas à superfície eletródica. É disto que trata a sessão seguinte.

62. Biosensor & Chemical Sensor- Optimizing Performance Through Polymeric Materials. Edited by Edelman, P.G.; Wang, J. ACS Symposium Series 487, 1991.

114. Vieira, I.C.; Fatibello-Filho, O.; Angnes, L.- Analytica Chimica Acta 19930 (1999) 1.

115. Signori, C.A.; Fatibello-Filho, O.- Química Nova 17:1 (1994) 38.

1.5- Conexão Elétrica de Centros Redox de Enzimas com Eletrodos

Interação direta com eletrodos: a princípio deve-se considerar a determinação eletroquímica de um oxidante ou redutor, através da transferência direta de elétrons do analito para o eletrodo ou do eletrodo para o analito. Isto existe, por exemplo, na titulação amperométrica de cloro residual⁷⁵ (Figura 30).

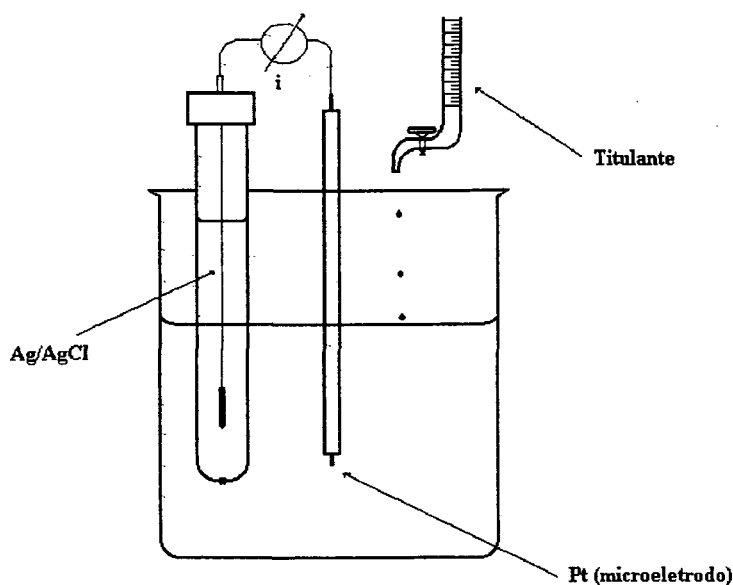


Figura 30. Titulação amperométrica de cloro residual em águas.

Processo eletroquímico: a corrente difusional é devida à redução de cloro no eletrodo polarizado no potencial do eletrodo de prata-cloreto de prata. O tiosulfato adicionado vai consumindo o cloro, fazendo cair a corrente limite até um valor nulo ou muito baixo no ponto final da titulação.

Há muitos outros casos^{76,77} como a determinação de baixos níveis de íons metálicos (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}) em solução, usando o eletrodo de mercúrio gotejante (polarografia) com ou sem pré-concentração (voltametria de redissolução). Certos ânions também podem ser determinados no eletrodo gotejante: BrO_3^- , IO_3^- , NO_2^- etc. Microeletrodos de ouro, platina ou carbono podem ser modificados com grupos quelantes para pré concentrar cátions, determinados em seguida, por amperometria^{22,24}. Estes mesmos eletrodos, com

22. Kurauchi, Y.; Tsurumori, E.; Ohga, K.- Bulletin of Chemical Society of Japan. 62 (1989) 1341.

24. Jinrui, X.; Bin, L.- Analyst 119 (1994) 1599.

75. APHA, AWWA E WPCF- Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. Edited by Greenberg, A.E.; Trussel, R.R.; Clesceri, L.S. 16th ed., 1985.

76. Sawyer, D.T.; Haneman, W.R.; Beebe, J. - Chemistry Experiments for Instrumental Methods. John Wiley & Sons. New York, 1984.

77. Bond, A.M.- Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry. Marcel Dekker. New York, 1980.

modificações convenientes, podem pré-concentrar ânions. Algumas moléculas orgânicas^{76,77} podem produzir ondas catódicas ou anódicas sobre eletrodos de Hg, Au, Pt, C.

Interação Mediada Enzimaticamente

Há muitas moléculas que não se modificam à velocidades apreciáveis pela interação direta com os eletrodos, seja porque requerem altas energias de ativação (obstáculo cinético), exigindo elevados sobrepotenciais, seja porque os potenciais requeridos são inacessíveis nas condições usuais (obstáculo termodinâmico). A oxidação de glicose é um exemplo. Diretamente sobre o anodo a reação não se dá a velocidades apreciáveis. Uma possível solução é usar bromato como mediador, de acordo com o esquema da Figura 31.

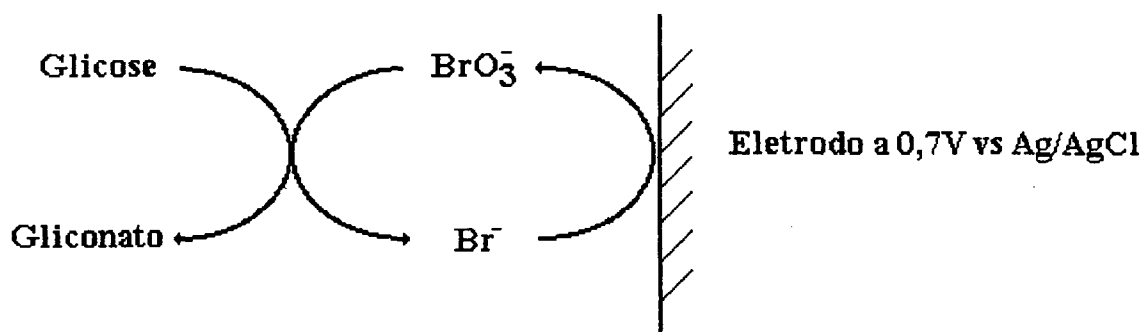


Figura 31. Bromato como mediador na oxidação eletrolítica da glicose.

O problema do esquema acima é que o íon bromato é um energético oxidante. Isto faz com que o potencial do eletrodo, necessário para converter brometo em bromato seja relativamente alto, comprometendo a seletividade, pois outros redutores presentes poderiam também interagir com o eletrodo.

Uma interessante resposta para este problema foi dada pelo uso de enzimas, as oxireduases, que além de reconhecer seus substratos com alta seletividade aumentam muitas vezes a velocidade do processo redox. O esquema eletroquímico para a glicose torna-se, então, o da Figura 32.

76. Sawyer, D.T.; Hanemann, W.R.; Beebe, J. - Chemistry Experiments for Instrumental Methods. John Wiley & Sons. New York, 1984.
77. Bond, A.M. - Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry. Marcel Dekker. New York, 1980.

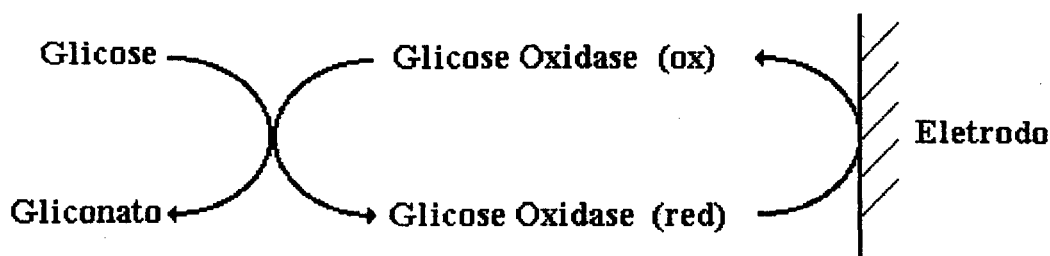


Figura 32. Oxidação eletrolítica da glicose com mediação enzimática.

O esquema da Figura 32 embora possível, dá origem a correntes muito pequenas, da ordem de picoampère, nem sempre mensurável nos aparelhos comuns. Isto acontece exatamente como parte do mecanismo de reconhecimento altamente específico da enzima pelo seu substrato. A cadeia proteica da enzima protege o seu centro redox para que somente o substrato ou poucas outras estruturas sejam capazes de oxidá-lo ou reduzi-lo. Esta blindagem introduz distâncias grandes entre o centro redox da enzima e o eletrodo (da ordem de 86 ângstrom para a glicose oxidase)⁷⁸, limitando as correntes a valores muito baixos (mas ainda mensuráveis pelos melhores aparelhos). Todo esforço na construção de biossensores amperométricos, gira em torno do objetivo de aumentar as correntes geradas pela transição redox do sítio ativo da enzima, de forma tal que a taxa de transferência de elétrons seja superior à frequência de transição do centro redox ("turnover" da enzima, cerca de 100 vezes/s para glicose oxidase)¹³. A solução foi apontada pela observação dos mecanismos da natureza que lança mão dos *mediadores difusionais*.

Os Mediadores Redox Difusionais

A molécula de oxigênio, pelo seu poder de penetrar na blindagem proteica, é o mediador natural da glicose oxidase, permitindo a regeneração do catalisador biológico tal como mostra o esquema ilustrado na Figura 33.

13. Heller, A.- The Journal of Physical Chemistry 96:9 (1992) 3579.

78. Nakamura, S.; Hayashi, S.; Koga, K.- Biochimica et Biophysica Acta 445 (1976) 294.

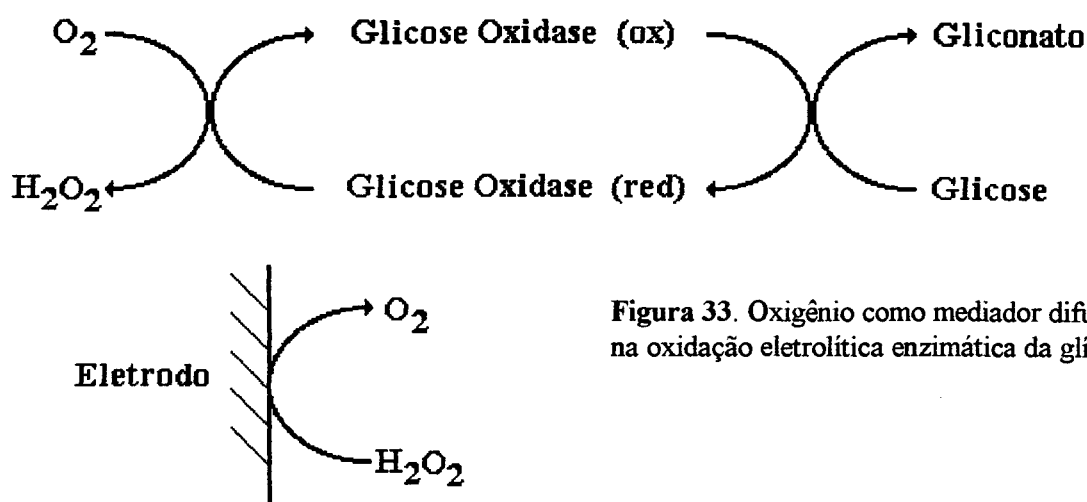


Figura 33. Oxigênio como mediador difusional na oxidação eletrolítica enzimática da glicose.

O sistema expresso na Figura 33 é usado no já citado eletrodo de Clark para glicose⁶¹ e em muitos outros produzidos ainda hoje. Além do O_2 , mediadores artificiais foram introduzidos: ferroceno/ferricínio e derivados, quinonas/hidroquinonas, ferrocianeto/ferricianeto e outros complexos, sistema iodo/iodeto^{61,71}. Espécies semelhantes ao azul de metileno também são utilizadas: Azul de Meldola; Azul do Nílo; N-metil-fenazin-5-ínio; Azul de o-Toluidina etc.

Mediadores Redox não Difusionais

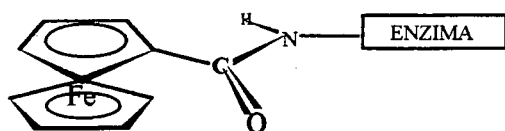
Embora os mediadores difusionais tenham alcançado o objetivo de aumentar as correntes obtidas pela intervenção enzimática nos sistemas redox, eles apresentam limitações tais, que novas alternativas surgiram nos últimos anos. São os *mediadores não difusionais*, desenvolvidos para evitar que o mediador redox se perdesse na solução. A primeira alternativa, sugerida por Degani e Heller⁶⁴, consistiu na ligação covalente de grupos contendo ferroceno na cadeia lateral da enzima. Tais ramificações, se possuísem o tamanho apropriado, funcionavam como braços flexíveis, deslocando o mediador até o centro redox da enzima (reduzindo o

61. Biosensor, Fundamentals and Applications. Edited by Turner, A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S. Oxford University Press, Oxford, 1987.

64. Degani, Y.; Heller, A. - Journal of American Chemical Society 111 (1989) 2357.

71. Guilbault, G.G. - Analytical Uses of Immobilized Enzymes. Marcel Dekker, Inc. New York, 1984.

ferricínio) e daí para a superfície do eletrodo, onde deixavam seus elétrons e repetiam o ciclo. Este esquema está ilustrado na Figura 34.



Enzima modificada de Degani & Heller (1989).

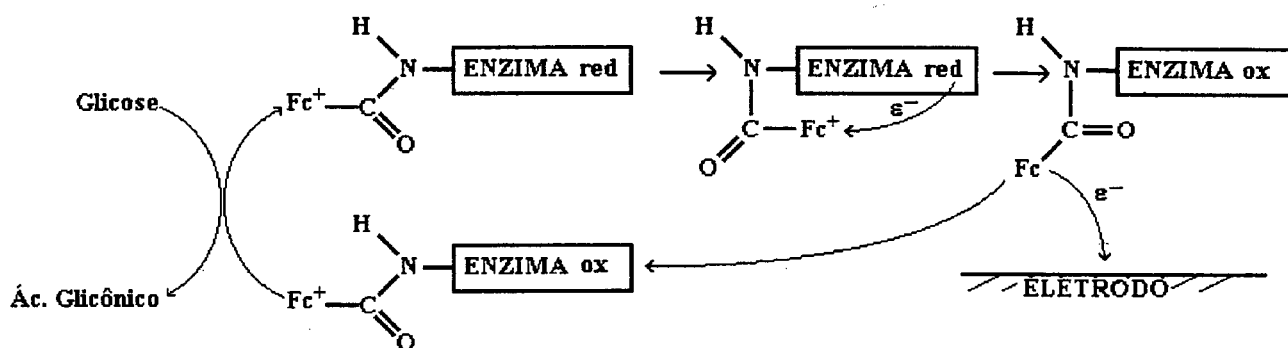
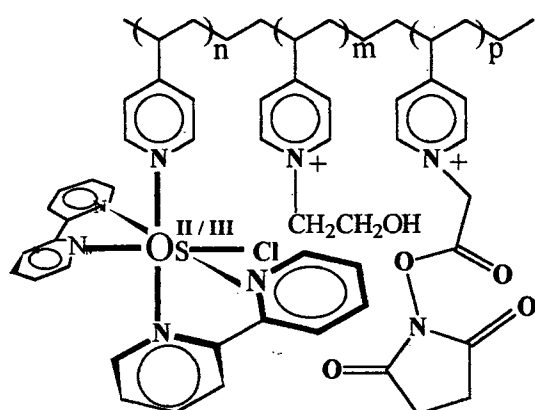


Figura 34. Ferroceno como mediador não difusional da glicose oxidase.

Fc = ferroceno

Fc⁺ = ferricínio

Embora este sistema funcione bem, as ligações na cadeia lateral da enzima podem diminuir a atividade enzimática, o que é indesejável. Surgiram então os polímeros redox^{9,65,79}, macromoléculas que têm em sua estrutura um complexo que funciona como mediador redox. Eles são ligados ao eletrodo por adsorção, covalência ou misturados na pasta de grafite e complexam as enzimas ou são ligadas a elas por reticulação com reativo bifuncional (glutaraldeído, carbodiimida, epoxi etc.)^{13,65,80} (Figura 35).

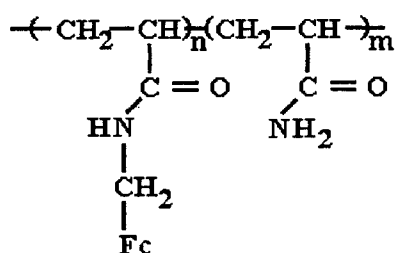


$$n = 1$$

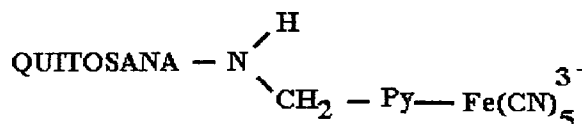
Gregg & Heller (1990)

$$m = 2,9$$

$$p = 1,5$$



Calvo, Danilowicz e Diaz (1993)



Rodrigues e colaboradores (1995)

Figura 35. Polímeros redox.

Fc = ferroceno

Py = piridil

9. Shigeara, K.; Oyama, N.; Anson, F.C.- Journal of American Chemical Society 103 (1981) 2552.

13. Heller, A.- The Journal of Physical Chemistry 96:9 (1992) 3579.

65. Calvo, E.J.; Danilowicz, C.; Diaz, L.- Journal of Chemical Society Faraday Transation 89:2 (1993) 377.

79. Rodrigues, C. A.- Exame de Qualificação ao Doutorado. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1995.

80. Lumley-Woodyear, T.; Rocca, P.; Lindsay, J.; Dror, Y.; Freeman, A.; Heller, A.- Analytical Chemistry 67:8 (1995) 1332.

Materiais poliméricos já desempenhavam papel importante no projeto dos biossensores, como suporte de imobilização enzimática e na construção de membranas de permeabilidade seletiva. Com os polímeros redox, esta importância amplia-se, tornando-se chave na obtenção de biossensores de alto desempenho. Além disto, embora haja alternativas mais simples, os polímeros redox geram possibilidade de imobilização de complexos na superfície eletródica, e, assim modificados, os eletrodos podem promover eletrocatalises, mesmo quando o sistema eletroquímico não envolve enzimas.

Em todos os biossensores que utilizam os polímeros redox deve-se considerar a possibilidade de haver, também, uma certa parte da corrente por conta da mediação via oxigênio, a menos que este seja eliminado previamente. Assim, a eficiência de um polímero redox para atuar em processos redox enzimáticos, deve ser avaliada comparando-se a corrente gerada a um certo potencial, com e sem oxigênio.

Finalizando estas considerações sobre mediadores de processos enzimáticos, é bastante interessante novamente aludir a um mediador polimérico não difusional, e que não requer intervenção de complexos. O biossensor assim construído aparece na tabela 2, referência 66. Ali, o contato do centro redox da glicose oxidase com a superfície eletródica é conseguido através das excelentes propriedades condutoras do polipirrol, gerado *in situ*. Este mesmo polímero constitui a matriz de imobilização enzimática.

1.6- Biossensores e sistemas FIA

Acompanhando a tendência da química analítica moderna, os métodos eletroanalíticos procuraram também se adequar aos sistemas de fluxo contínuo. Furbee e colaboradores⁹⁵ descrevem um sistema deste tipo, utilizando biossensor para glicose, baseado em microeletrodo de fibra de carbono. Eles obtiveram picos de corrente da ordem de 14nA para glicose na concentração de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, com um excelente diagrama para 4 injeções consecutivas. A vazão do carregador foi de 1 mL min^{-1} em tampão fosfato (pH 7,0) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O volume injetado das soluções analíticas foi de $200 \mu\text{L}$.

Em um estudo que resultou numa expressão matemática, descrevendo a resposta transiente para um eletrodo enzimático amperométrico limitado por difusão, Olsson e colaboradores⁸¹ obtiveram bons resultados operando a 300 amostras/h, com desvio padrão de 0,5%, chegando ao limite de $10^{-5} \text{ mol de glicose L}^{-1}$ com volume de $1,5 \mu\text{L}$ de amostra.

Dispensando os biossensores, outra maneira de operar com métodos enzimáticos em fluxo, é utilizar os reatores que contêm as enzimas imobilizadas. Como exemplo desta versão, há o trabalho de Jurkiewicz, Alegret e Fàbregas⁸² que fizeram um estudo comparativo dos reatores de leito empacotado e tubulares na determinação de uréia e creatinina. O sistema operou em fluxo, com detecção potenciométrica e era gerenciado por um microcomputador.

Gorton e colaboradores (1991) revisaram 319 artigos⁸³ descrevendo o uso de enzimas em sistemas FIA, comparando o desempenho dos biossensores com os reatores enzimáticos.

As análises por injeção em fluxo contínuo (FIA) foram introduzidas em 1975 por Ruzicka e Hansen e experimentaram grande desenvolvimento no Brasil a partir do ano seguinte, por pesquisadores do CENA/USP.

Em um artigo de revisão⁸⁴ publicado em 1989 na Química Nova, Reis, Giné e Kronka reapresentaram as bases deste sistema. Toda análise química instrumental envolve as 5 etapas descritas na Figura 36.

81. Olsson, B.; Lunback, H.; Johansson, G.; Scheller, F.; Nentwig, J.- *Analytical Chemistry* 58:6 (1986) 1046.

82. Jurkiewicz, M.; Alegret, S.; Fàbregas, E.- *Analytica Chimica Acta* 370 (1998) 47.

83. Gorton, L.; Csoregi, E.; Dominguez, E.; Emméus, J.; Jonsson-Pettersson, G.; Marko-Varga, G.; Persson, B.- *Analytica Chimica Acta* 250 (1991) 203.

84. Reis, B.F.; Giné, M.F.; Kronka, E.A.M.- *Química Nova* 12:1 (1989) 82.

95. Furbee, W.J.; Kuwana, T.; Kelly, R.S. - *Analytical Chemistry* 66:9 (1994) 1575.

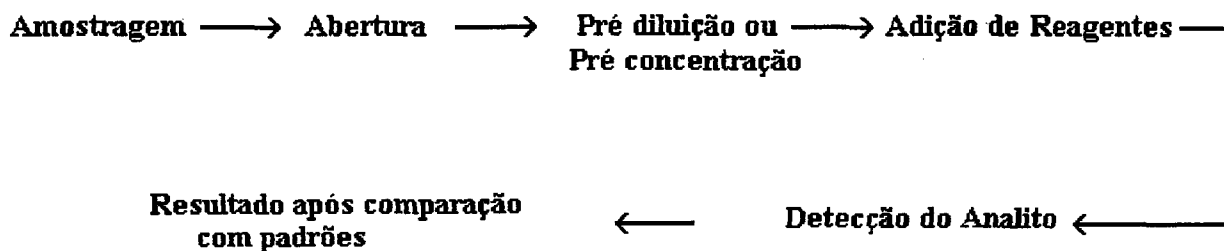


Figura 36. Etapas fundamentais da análise química instrumental.

No sistema convencional, usando vidraria analítica e com intervenção do operador em todas as etapas, verifica-se que a produtividade e rigor dos resultados alcança limites intransponíveis pela habilidade do operador e qualidade instrumental. Acompanhando a tendência à automação de todos os setores da vida produtiva, típica deste final de século, através da FIA, foi possível alcançar produtividade alcançando centenas de amostras/h, com elevado grau de precisão. A idéia é realizar as etapas acima em linha, sem intervenção do operador entre elas, através do fluxo contínuo de líquidos por tubos de pequeno diâmetro, tal como descreve esquematicamente a Figura 37.

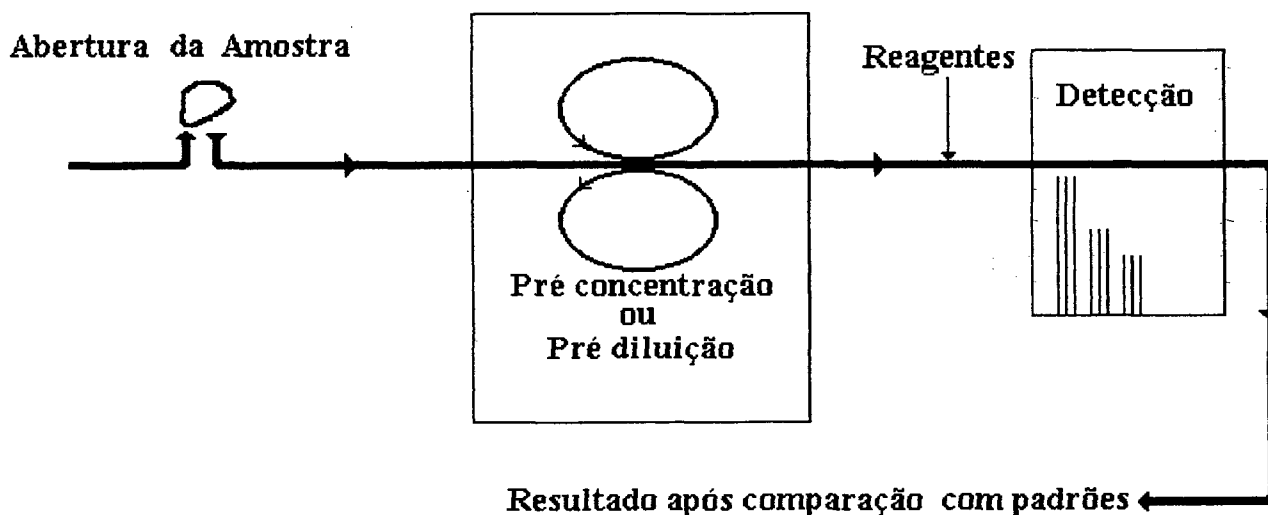


Figura 37. Etapas fundamentais das determinações em fluxo contínuo.

Assim, é possível realizar automaticamente todas as etapas: Uma solução é bombeada sobre a amostra, dissolvendo parte dela e passando para a etapa de diluição ou pré concentração, se necessário. Reagentes são adicionados, caminha-se um percurso mínimo necessário para que apenas parte da reação se complete e vai-se ao detector que gera um sinal tipo pico em registrador x-tempo. A calibração pode ser feita com amostras certificadas.

Enganoso seria supor que os sistemas em fluxo não prestam outro serviço além das espantosas freqüências de amostragem. Há outras vantagens, realmente atraentes do ponto de vista da análise química, mesmo nas situações em que o número de amostras a serem resolvidas não seja elevado.

- a) Alta precisão: com instrumental relativamente simples, consegue-se grande reprodutibilidade, traduzida em desvios padrão inferiores a 1%.
- b) Como o contato com o exterior é mínimo, as possibilidades de contaminação são tremendamente restritas. Isto é primordial para determinações a nível de traços.
- c) Como a reprodutibilidade é elevada, não há necessidade de aguardar a aquisição de estado estacionário, uma vez que amostras e soluções analíticas serão lidos em igualdade de condições. Isto é utilíssimo em reações de cinética desfavorável.

d) Simplificação instrumental: A determinação potenciométrica de cloretos, por exemplo, requer um eletrodo de referência de dupla junção quando se trabalha no sistema estático. Isto porque, de forma aleatória, haveria contaminação pelo cloreto que escoar através da junção dos eletrodos de referência usuais: prata-cloreto de prata e calomelano. Todavia, operando em fluxo não há necessidade de eletrodo de dupla junção, novamente devido a alta reprodutibilidade. O erro é menor, torna-se sistemático e é eliminado por padronização. De modo análogo são muito simplificadas as operações de destilação, pré-concentração em coluna, extração com solventes, "stripping" anódico etc⁸⁵.

e) Pequeno volume de amostra, pequeno gasto de reagentes, métodos ecologicamente corretos: no sistema de batelada (estático) o trabalho com volumes pequenos tende a gerar erros grandes (a menos que se use instrumental específico, de alto custo). Em FIA, a obtenção de volumes reprodutivos é simplesmente resolvida por diferentes comprimentos de tubos finos (alças de amostragem) ou tempos diferentes de abertura em válvulas solenóides. O efluente

85. Fang, Z.- Flow Injection Separation and Preconcentration. Published jointly by VCH Weinheim and VCH New York, 1993.

resultante das análises é pequeno, simplificando enormemente o tratamento daqueles nocivos ao meio ambiente.

f) Possibilidade de sistemas para monitoramento contínuo, *in vivo* ou *in situ*.

g) Facilidade de automação completa. Os modernos sistemas de automação microcomputadorizados requerem o gerenciamento de soluções em fluxo⁸⁶⁻⁸⁸.

h) Novas soluções para problemas analíticos: uma limitação inexorável da potenciometria é a resposta de 60mV/pX para íons monovalentes. A literatura recente⁸⁹ descreve um sistema com dois eletrodos indicadores, sem eletrodo de referência, montados um após outro na linha, obtendo-se sensibilidade dobrada. Isto só é possível em um sistema em fluxo! As interferências em métodos potenciométricos são muito menores quando realizados em fluxo^{87,90}, exatamente devido ao fato do sinal transiente estar afastado do sinal de equilíbrio.

i) Todas estas vantagens são alcançadas por um baixo custo. O equipamento é barato e muitos componentes podem ser construídos no próprio laboratório⁹¹.

Com estas vantagens é realmente pertinente perguntar porque os métodos em fluxo, contando com mais de 20 anos, ainda não alcançaram uma penetração proporcional a tantos méritos. Podem-se arrolar algumas razões.

a) carência de divulgação. Embora seja o Brasil um dos líderes mundiais em FIA, até hoje não há um livro didático em nossa língua, destinado a apresentar estas técnicas para os analistas brasileiros que operam nas indústrias ou pequenos laboratórios de prestação de serviços.

b) no geral, as montagens não são robustas e manejáveis por qualquer um. Quando acima foi dito que o equipamento é quase todo artesanal, entenda-se que uma certa habilidade, maior do que a maioria dos analistas possui, é requerida. Neste sentido, poderíamos dizer que as técnicas de FIA são mais intensivas em conhecimentos e habilidades do que as convencionais, exigindo, para a sua efetiva propagação, investimentos massivos em programas de treinamento.

c) indisponibilidade, a baixo custo, de equipamentos nacionais de boa qualidade. Bombas, injetores e válvulas produzidos em escala comercial no Brasil não são apropriados, quando um desempenho elevado é exigido. O equipamento importado não pode ser considerado barato.

86. Ganzarolli, E.M.; Lehmkuhl, A.; Queiroz, R. R.U.; Souza, I.G.- Química Nova 22:1 (1999) 53.

87. Marin, M.A.B.- Tese de doutorado. Depto. de Química, UFSC (1998).

88. Giacomozzi, C.; Neto, J.A.G.; Souza, I.G.; Queiroz, R.R.U.- Aceito para publicação no Journal of Automatic Chemistry.

89. Rizov, I.; Ilcheva, L.- Analytica Chimica Acta 311 (1995) 175.

90. Carvalho, R.M.- Dissertação de Mestrado. Depto. de Química. UFSC (1997).

91. Marin, M.A.B.; Ganzarolli, E.M.; Queiroz, R.R.U.; Souza, I.G.- Química Nova 21:6 (1998) 802.

d) conservadorismo escolar. No Brasil, FIA só é ensinada em larga escala nos cursos de pós graduação em química analítica, quando a maioria dos que vão atuar na indústria e laboratórios de prestação de serviços (técnicos de nível médio e graduados) já foram-se, levando em suas bagagens as técnicas de gerenciamento de líquidos que aprenderam com Mhor, Liebig e outros, pioneiros da química analítica.

O sistema em fluxo - Instrumentação

Basicamente, se podem esquematizar as montagens em fluxo de acordo com a Figura 38.

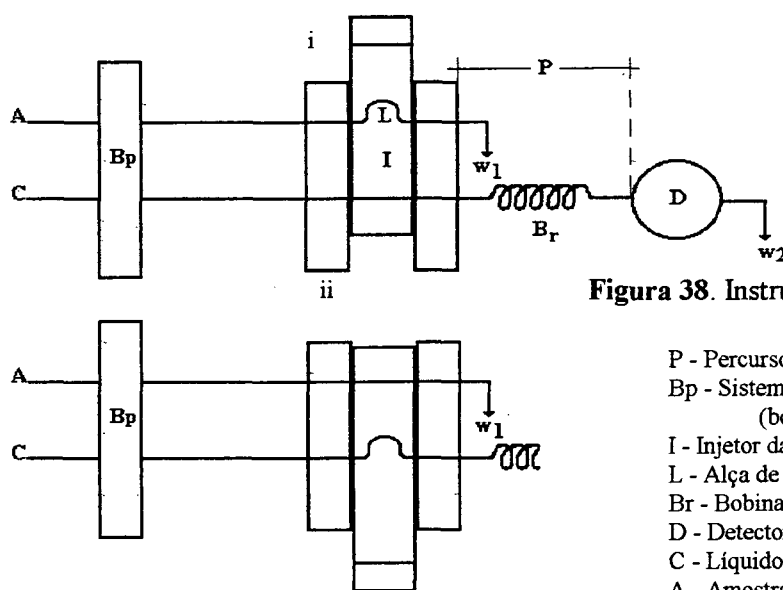


Figura 38. Instrumentação em FIA

- P - Percurso analítico
- Bp - Sistema de propulsão de fluidos (bomba peristáltica)
- I - Injetor da amostra
- L - Alça de amostragem
- Br - Bobina de reação
- D - Detector
- C - Líquido carregador
- A - Amostra
- W - Descarte
- i - Posição de amostragem
- ii - Posição de injeção da amostra

O sistema de propulsão de fluidos pode ser um gás inerte comprimido, uma bomba de seringa, uma bomba peristáltica ou mesmo a gravidade, sendo consagrada pelo uso a bomba peristáltica. O injetor da amostra também pode ter configurações diversas mas, quase sempre, consiste de três peças de acrílico, com uma delas (a central) deslocando-se em relação às outras duas, como mostra a Figura 38.

Observe-se que na posição “i” a amostra, impulsionada pela bomba, preenche a alça de amostragem. Ao ser comutado o injetor, indo para a posição “ii”, o fluido carregador, também impulsionado pela bomba, conduz a porção de amostra aprisionada na alça, para a bobina de reação. Como detector são usados os mesmos das análises em sistema convencional: espectrofotômetro de absorção molecular ou de absorção atômica; eletrodo seletivo, conjugado a milivoltímetro eletrônico; célula condutimétrica etc.

Para operar com biossensores, uma vez que já contêm todos os reagentes imobilizados, em princípio não é requerida a bobina de reação, pois as reações necessárias ocorrem na superfície do próprio detector (eletrodo de trabalho).

Configuração do Sistema em Fluxo

No que diz respeito ao modo pelo qual a amostra é introduzida no fluxo da solução carregadora, os sistemas de análise em fluxo podem ser arranjos nas versões: a) linha única; b) em confluência; c) com zonas coalescentes; d) com reamostragem; e) segmentado. A escolha envolve um compromisso entre: simplicidade do sistema, menor dispersão possível (picos mais agudos, maior sensibilidade), menor tempo de análise (maior frequência de amostragem, maior produtividade), economia de reagentes.

O sistema em linha única foi ilustrado na Figura 38. Percebe-se que, nesta versão, a amostra se mistura ao carregador (que contém o reagente) apenas por dispersão, o que tende a gerar alargamento de pico. Um sinal mais forte (pico de maior amplitude) pode ser gerado com aumento da alça de amostragem, chegando até 98% da leitura a volume infinito (carregador substituído pela amostra), quando a alça é cerca de 4 vezes o percurso analítico. Todavia, como a mistura é apenas por dispersão, a alça de amostragem não pode ser aumentada indefinidamente pois há o risco de sequer completar a reação, por escassez de reagente. Aumentar o percurso analítico então não resolve, pois haverá aumento de dispersão e queda na altura do pico, além de diminuição na frequência analítica.

O sistema em confluência pode ser usado quando não se consegue bons resultados com linha única (amostras diluídas, por exemplo). Neste, o reagente R continuamente é misturado ao fluxo de carregador através de um “Y”, chamado de confluência, que junta os dois fluxos.

Desta maneira, quando o injetor for comutado, amostra e reagente serão misturados de modo mais íntimo em relação ao caso anterior, o que tende a diminuir a dispersão. Agora, para amostras mais diluídas pode-se usar uma alça de amostragem maior, sem perigo de haver escassez de reagente. As vazões do reagente e carregador (determinadas pelos diâmetros dos tubos que conduzem estas soluções) deverão ser estudadas de modo a gerar o sinal de maior amplitude.

O sistema com zonas coalescentes visa a economizar o reagente pois no caso anterior, mesmo sem amostra, o reagente é circulado no percurso. Trata-se de introduzir o reagente simultaneamente com a amostra, através de uma segunda alça no injetor, a alça do reagente.

O sistema com reamostragem é ideal para amostras muito concentradas. Insere-se a amostra no carregador e envia-se a uma bobina para que haja dispersão. Agora faz-se nova comutação no injetor, amostrando-se a amostra já dispersa, enviando-a para o percurso analítico. O reagente entra por confluência.

O sistema segmentado, finalmente, visa a reduzir ao máximo a dispersão pela introdução de fluido imiscível, por exemplo, bolhas de ar. Graças a isto, a dispersão é limitada ao comprimento ocupado pelo “plug” da amostra e nesta condição é inserido o reagente e processada a reação. Imediatamente antes do detector é colocado um separador de fases para remover o fluido segmentador.

Outras configurações são indicadas para tratamentos prévios à amostra: abertura⁸⁸ extração com solventes⁹², pervaporação⁹³, pré-concentração em coluna etc.⁸⁵, e muitas outras ainda virão pois, ao que tudo indica, as análises em fluxo certamente integrarão os próximos passos da química analítica, pelo que significam na compatibilização dos detectores da era do computador com as operações prévias necessárias às determinações.

85. Fang, Z.- Flow Injection Separation and Preconcentration. Published jointly by VCH Weinheim and VCH New York, 1993.

88. Giacomozzi, C.; Neto, J.A.G.; Souza, I.G.; Queiroz, R.R.U.- Aceito para publicação no Journal of Automatic Chemistry.

92. Facchin, I.; Pasquini, C.- Química Nova 21:1 (1998) 60.

93. Mattos, I.L.; Queiroz, R.R.U.- Química Nova 21:2 (1998) 202.

1.7-Rutênio e os polímeros redox

Desde o trabalho pioneiro de Oyama e Anson²⁰ produzindo os metalo-polímeros ou polímeros redox, o sistema rutênio II/III destacou-se como centro metálico reversível, ligado por coordenação à matriz polimérica. Os polímeros redox, estritamente falando não são exatamente a mesma coisa que metalo-polímeros. Os primeiros são polímeros que podem atuar como mediadores nas transferências eletrônicas (haja ou não metais em sua estrutura) e os últimos, polímeros dotados de metal, podendo ou não, atuar em processos redox. Os metalo-polímeros possuem centros metálicos distribuídos em uma matriz polimérica. Na síntese dos metalo-polímeros uma das estratégias é reagir um complexo estável, dotado de pelo menos uma posição reativa, com os grupos ligantes da matriz polimérica^{9,94,96-100}. A outra estratégia consiste em reagir um complexo estável através de um grupo reativo marginal, sem interferir, portanto, na esfera de coordenação¹⁰¹⁻¹⁰⁴.

Nos centros metálicos, encontramos quase sempre na literatura os elementos do grupo VIII da tabela periódica: ferro^{9,65,79,101,102,103}, rutênio^{20,94,96,98} e ósmio^{97,99,100}, sendo a maioria expressiva dos trabalhos constituída de polímeros com rutênio. A razão para esta preferência deve residir sobre a labilidade relativa dos complexos destes metais. Na primeira série de transição, excetuando o Co III e o Cr III, todos os complexos são lábeis⁴³. A segunda e terceira série de transição contém, via de regra, complexos inertes. Acontece que os complexos de ósmio, sendo muito inertes, só reagem com os polímeros muito lentamente, dificultando a síntese do metalo-polímero. Parece que os complexos de rutênio guardam um ótimo compromisso entre a facilidade de síntese e estabilidade ao longo do tempo.

9. Shigeara, K.; Oyama, N.; Anson, F.C.- Journal of American Chemical Society 103 (1981) 2552.

20. Oyama, N. and Anson, F.- Journal of the American Chemical Society 101:13 (1979) 3450.

43. Shriver, D.F.; Atkins, P.W.; Langford, C.H.- Inorganic Chemistry. Oxford University Press. Oxford, 1992.

65. Calvo, E.J.; Danilowicz, C.; Diaz, L.- Journal of Chemical Society Faraday Transation 89:2 (1993) 377.

79. Rodrigues, C. A.- Exame de Qualificação ao Doutorado. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1995.

94. Clear, J.M.; Kelly, J.M.; O'Connell, C.M.; Vos, J.G.- Journal of Chemical Research S (1981) 260.

96. Calvert, J.M.; Meyer, T.J.- Inorganic Chemistry 21:11 (1982) 3978.

97. Forster, R.J.; Kelly, A.J.; Vos, J.G.; Lyons, M.E.G.- Journal of Electroanalytical Chemistry 270 (1989) 365.

98. Barisci, J.N.; Wallace, G.G.; Wilke, E.A.; Meaney, M.; Smyth, M.R.; Vos, J.G.- Electroanalysis 1 (1989) 245.

99. Gregg, B.A.; Heller, A.- Analytical Chemistry 62:3 (1990) 258.

100. Ohara, T.J.; Rajagopalan, R.; Heller, A.- Analytical Chemistry 66:15 (1994) 2451.

101. Liaudet, E.; Battaglini, F.; Calvo, E.J.- Journal of Electroanalytical Chemistry 293 (1990) 55.

102. Schuhmann, W.; Ohara, T.J.; Schmidt, H.L.; Heller, A.- Journal of American Chemical Society 113:4 (1991) 1394.

103. Calvo, E.J.; Danilowicz, C.; Diaz, L.- Journal of Electroanalytical Chemistry 369 (1994) 279.

104. Kuehn, C.G.; Taube, H.- Journal of American Chemical Society 98:3 (1976) 689.

Os centros metálicos dos polímeros mais encontrados na literatura estão listados abaixo.

| | | Referências |
|----|---|----------------------------|
| Fe | $[\text{Fe}(\text{CN})_5]^{2/3-}$ ferroceno/ferricínio | 9, 79 65, 101, 102, 103 |
| Ru | $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{2/3+}$ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^{+/2+}$ $[\text{Ru}(\text{EDTA})]^{-/2-}$ | 20 94, 96, 98 20, 79 |
| Os | $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^{+/2+}$ $[\text{Os}(4,4' - \text{dimetilbpy})_2\text{Cl}]^{+/2+}$ | 97, 99, 105 100 |

-
9. Shigeara, K.; Oyama, N.; Anson, F.C.- Journal of American Chemical Society 103 (1981) 2552.
 20. Oyama, N. and Anson, F.- Journal of the American Chemical Society 101:13 (1979) 3450.
 65. Calvo, E.J.; Danilowicz, C.; Diaz, L.- Journal of Chemical Society Faraday Transation 89:2 (1993) 377.
 79. Rodrigues, C. A.- Exame de Qualificação ao Doutorado. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1995.
 94. Clear, J.M.; Kelly, J.M.; G'Connel, C.M.; Vos, J.G.- Journal of Chemical Research S (1981) 260.
 96. Calvert, J.M.; Meyer, T.J.- Inorganic Chemistry 21:11 (1982) 3978.
 97. Forster, R.J.; Kelly, A.J.; Vos, J.G.; Lyons, M.E.G.- Journal of Electroanalytical Chemistry 270 (1989) 365.
 98. Barisci, J.N.; Wallace, G.G.; Wilke, E.A.; Meaney, M.; Smyth, M.R.; Vos, J.G.- Electroanalysis 1 (1989) 245.
 99. Gregg, B.A.; Heller, A.- Analytical Chemistry 62:3 (1990) 258.
 100. Ohara, T.J.; Rajagopalan, R.; Heller, A.- Analytical Chemistry 66:15 (1994) 2451.
 101. Liaudet, E.; Battaglini, F.; Calvo, E.J.- Journal of Electroanalytical Chemistry 293 (1990) 55.
 102. Schuhmann, W.; Ohara, T.J.; Schmidt, H.L.; Heller, A.- Journal of American Chemical Society 113:4 (1991) 1394.
 103. Calvo, E.J.; Danilowicz, C.; Diaz, L.- Journal of Electroanalytical Chemistry 369 (1994) 279.
 104. Kuehn, C.G.; Taube, H.- Journal of American Chemical Society 98:3 (1976) 689.

As matrizes poliméricas encontradas na literatura são listadas a seguir

| | Referências |
|--|------------------------|
| Polivinilpiridina (PVP) | 9, 20, 94, 96, 97, 98, |
| Poliacrilonitrila (PAN) | 20 |
| Copolímero PVP - polimetacrilato de metila | 94 |
| PVP modificado por grupos polares | 99 |
| Copolímero acrilamida- ácido acrílico | 65 |
| Poliálilamina | 103 |
| Poli(1-vinilimidazol) | 100 |
| Quitosana modificada por Piridil | 79 |

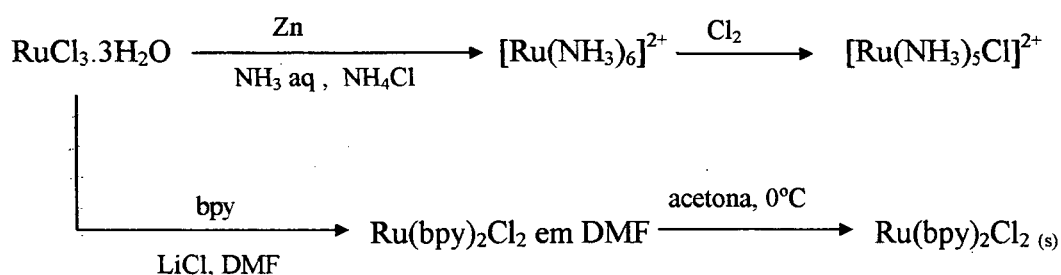
-
9. Shigeara, K.; Oyama, N.; Anson, F.C.- *Journal of American Chemical Society* 103 (1981) 2552.
 20. Oyama, N. and Anson, F.- *Journal of the American Chemical Society* 101:13 (1979) 3450.
 43. Shriver, D.F.; Atkins, P.W.; Langford, C.H.- *Inorganic Chemistry*. Oxford University Press. Oxford, 1992.
 65. Calvo, E.J.; Danilowicz, C.; Diaz, L.- *Journal of Chemical Society Faraday Transation* 89:2 (1993) 377.
 79. Rodrigues, C. A.- Exame de Qualificação ao Doutorado. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1995.
 94. Clear, J.M.; Kelly, J.M.; O'Connell, C.M.; Vos, J.G.- *Journal of Chemical Research* S (1981) 260.
 96. Calvert, J.M.; Meyer, T.J.- *Inorganic Chemistry* 21:11 (1982) 3978.
 97. Forster, R.J.; Kelly, A.J.; Vos, J.G.; Lyons, M.E.G.- *Journal of Electroanalytical Chemistry* 270 (1989) 365.
 98. Barisci, J.N.; Wallace, G.G.; Wilke, E.A.; Meaney, M.; Smyth, M.R.; Vos, J.G.- *Electroanalysis* 1 (1989) 245.
 99. Gregg, B.A.; Heller, A.- *Analytical Chemistry* 62:3 (1990) 258.
 100. Ohara, T.J.; Rajagopalan, R.; Heller, A.- *Analytical Chemistry* 66:15 (1994) 2451.
 103. Calvo, E.J.; Danilowicz, C.; Diaz, L.- *Journal of Electroanalytical Chemistry* 369 (1994) 279.

Algumas vezes, o metalo-polímero, uma vez imobilizado sobre uma superfície (normalmente um eletrodo de carbono), acoplado ou não a uma enzima, sofre um processo de reticulação com o propósito de evitar que haja alterações conformacionais indesejáveis. Para tanto, lança-se mão de reativos bifuncionais, listados a seguir

| | Referências |
|--|-------------|
| Glutaraldeído | 65 |
| Epicloridrina | 103 |
| Éter diglicídico do poli(etileno glicol) | 100, 105 |

Síntese dos metalo-polímeros de rutênio

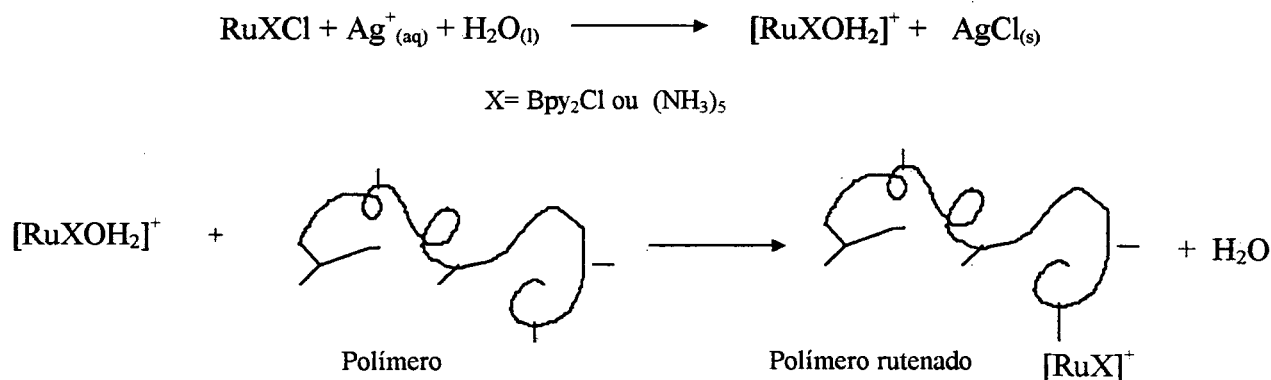
Dois complexos de rutênio são importantes como ponto de partida para a síntese dos polímeros redox: cloreto de cloropentaamimrutênio III e cis-bisbipybisclororutênioII. Estes dois complexos são preparados de acordo com os esquemas reacionais apresentados abaixo^{106,107}, partindo ambos de cloreto de rutênio III.



Basicamente, a estratégia de síntese dos polímeros redox é a mesma para os dois complexos, consistindo em substituir um cloro da esfera de coordenação do rutênio por água, através da intervenção de um sal de prata que elimina o cloro sob a forma de AgCl.

-
65. Calvo, E.J.; Danilowicz, C.; Diaz, L.- *Journal of Chemical Society Faraday Transation* 89:2 (1993) 377.
 100. Ohara, T.J.; Rajagopalan, R.; Heller, A.- *Analytical Chemistry* 66:15 (1994) 2451.
 103. Calvo, E.J.; Danilowicz, C.; Diaz, L.- *Journal of Electroanalytical Chemistry* 369 (1994) 279.
 105. Gregg, B.A.; Heller, A.- *The Journal of Physical Chemistry* 95:15 (1991) 5970.
 106. Taube, H. - *Inorganic Chemistry* 25 (1986) 3318.
 107. Sullivan; Salmon; Meyer- *Inorganic Chemistry* 17 (1978) 3334.

O complexo monoaquo, então, faz-se reagir com os grupos ligantes do polímero, normalmente durante tempo muito longo^{96,104}. O esquema reacional apresentado a seguir ilustra esta sequência.



Normalmente, no esquema apresentado acima, escolhe-se um sal de prata cujo ânion não venha a atuar como ligante. Perclorato, hexafluorofosfato ou trifluoracetato são adequados. Para retirar o oxigênio dissolvido, faz-se borbulhamento de argônio. O nitrogênio não pode ser usado pois é um ligante para pentaamimrutênio II. Uma vez que a prata em si pode ser coordenada pelos grupos ligantes da matriz polimérica, deve-se completar a primeira etapa acima, filtrando ou centrifugando o precipitado de cloreto de prata, para então iniciar a reação com o polímero. Outro cuidado importante diz respeito ao pH. Usualmente escolhe-se um pH próximo do pKa do ligante, a fim de inibir a competição dos prótons. Mas é preciso considerar que este pH pode ser nocivo, do ponto de vista do complexo. Assim, o pKa de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{OH}_2]^{3+}$ é 4,1¹⁰⁴. Se o polímero quelante possuir um pKa acima deste valor e o pH do meio reacional for ajustado para o pKa do polímero, boa parte do complexo conterà na sexta posição OH⁻ e não água, dificultando a reação com o polímero, pois o complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{OH}]^{2+}$ é várias ordens de grandeza mais estável que o monoaquo¹⁰⁴.

96. Calvert, J.M.; Meyer, T.J.- *Inorganic Chemistry* 21:11 (1982) 3978.

104. Kuehn, C.G.; Taube, H.- *Journal of American Chemical Society* 98:3 (1976) 689.

Embora os primeiros metalo-polímeros tenham sido sintetizados *in situ*, por simples contato do polímero adsorvido sobre eletrodos de grafite com soluções dos complexos, normalmente, para se alcançar um grau de substituição que produza um bom sinal eletroquímico (correntes intensas e estáveis), é necessário realizar a síntese *ex situ* com aquecimento, em ausência de luz, por um período de tempo que se conta em dias⁹⁶.

Após a reação, o polímero deve ser purificado e caracterizado. Para o propósito de purificação pode se lançar mão da cromatografia de exclusão⁶⁵ ou da diálise¹⁰³. A caracterização deve envolver: determinação quantitativa de rutênio por espectroscopia de massas ou absorção atômica; espectroscopia UV-Vis ou infravermelho, procurando detectar as bandas características dos análogos monoméricos; e a voltametria cíclica, observando também os monômeros correspondentes pois, segundo Calvert e Meyer não há diferença apreciável entre as propriedades óticas e eletroquímicas dos polímeros e seus monômeros análogos⁹⁶. Por exemplo, o $\lambda_{\text{máx}}$ para $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})\text{Cl}^+$ é 498 nm e o seu $E_{1/2} = 0,80\text{V}$, sendo para o análogo polimérico $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PVP})\text{Cl}^+$ o mesmo valor de $\lambda_{\text{máx}}$ e o $E_{1/2} = 0,76\text{V}$, em igualdade de condições. Finalmente, deve-se verificar se o polímero sintetizado é capaz de promover eletrocatalises¹⁰⁵.

Os dois complexos citados acima apresentam interessantes diferenças que os qualificam como ferramentas para propósitos diferenciados. $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5$ representa um par metal-ligante duro-duro, enquanto que $\text{Ru}(\text{bpy})_2$ representa um par mole-mole. Por conta disto deve-se, em princípio, esperar que o primeiro ligue-se mais facilmente a polímeros dotados de ligantes duros e o último, ao contrário, deve ligar-se mais facilmente a polímeros com ligantes moles. Além disto, o primeiro, por opor-se à redução de seu centro metálico (que produz um par mole-duro) tem um valor de E^0 relativamente baixo (na faixa de 0 a 100 mV), ao contrário do segundo, que requer elevada energia para oxidar-se (posto que isto significa produzir um par duro-mole) possuindo um E^0 relativamente alto (acima de 700 mV).

65. Calvo, E.J.; Danilowicz, C.; Diaz, L.- Journal of Chemical Society Faraday Transation 89:2 (1993) 377.

96. Calvert, J.M.; Meyer, T.J.- Inorganic Chemistry 21:11 (1982) 3978.

103. Calvo, E.J.; Danilowicz, C.; Diaz, L.- Journal of Electroanalytical Chemistry 369 (1994) 279.

105. Gregg, B.A.; Heller, A.- The Journal of Physical Chemistry 95:15 (1991) 5970.

CAPÍTULO 2 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Este capítulo está dividido em 6 partes alusivas às diferentes etapas do trabalho:

- 2.1- Construção de eletrodos artesanais.
- 2.2- Estudos com o polímero redox $\text{QTS}^{\text{py}}[\text{Fe}(\text{CN})_5]^{3-}$ (sintetizado por Rodrigues e colaboradores⁷⁹).
- 2.3- Síntese de polímero redox por reação de QTS com $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$.
- 2.4- Síntese de polímero redox por reação de QTS com $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$.
- 2.5- Estudos visando à aplicação do polímero redox $\text{QTS}-[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{2+/3+}$ como sensor para oxigênio dissolvido.
- 2.6- Estudos visando à aplicação do polímero redox $\text{QTS}-[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{2+/3+}$ em biossensores de tecido imobilizado.

Cada uma destas partes constitui-se de uma descrição de materiais e métodos usados (“Experimental”), seguida de uma apresentação dos resultados e sua discussão crítica sendo fechada por uma conclusão.

2.1-Construção de eletrodos artesanais

Como uma etapa de preparação, necessária a prover recursos materiais imprescindíveis ao trabalho posterior, construiu-se alguns eletrodos de referência, de trabalho e auxiliar. Esta etapa originou uma nota técnica, publicada em Química Nova¹⁰⁸ reproduzida ao final desta monografia (anexo).

2.2- Estudos com o polímero redox $\text{QTS}^{\text{py}}[\text{Fe}(\text{CN})_5]^{3-}$ (sintetizado por Rodrigues e colaboradores⁷⁹)

A primeira intenção deste trabalho foi a de produzir um biossensor em que a enzima glicose oxidase estivesse ancorada à superfície eletrodica via polímero redox de quitosana. A mediação da transferência eletrônica, entre o centro redox enzimático e o eletrodo, seria promovida pelo complexo metálico do polímero redox. Partiu-se, então, de um polímero redox de quitosana recém produzido no departamento (ver página 42), apresentando-se como um sólido avermelhado, solúvel em ácido acético a 2% e contendo $1,08 \times 10^{-3}$ mol Fe/g de polímero. Com tal metalo-polímero foram estudadas: a influência do pH sobre o

79. Rodrigues, C. A.- Exame de Qualificação ao Doutorado. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1995.
108. Silva, R.C.; Souza, I.G.- Química Nova 21:4 (1998) 477.

comportamento voltamétrico; a estabilidade frente à luz; tempo e temperatura; a imobilização na superfície eletródica por formação de filme e o acoplamento à enzima glicose oxidase (comportamento voltamétrico como biossensor para glicose).

2.2.1-Experimental

Todos os reagentes citados a seguir foram de grau analítico e usados como recebidos. A água usada em todas as preparações foi desionizada em sistema Milli-Q, com condutividade de $0,1\mu\text{S cm}^{-1}$. As preparações envolvendo grafite foram criticamente dependentes da qualidade deste produto. Como se descreverá adiante, o grafite comercializado pela firma brasileira Synth não apresentou a qualidade voltamétrica obtida com o grafite Fluka (infelizmente não disponível na quantidade requerida).

Sistema eletroquímico

Os eletrodos não modificados necessários foram preparados como se descreve na nota técnica¹⁰⁸. As medidas voltamétricas foram feitas em potenciostato da firma Microquímica Ind. e Com. LTDA. O eletrólito de suporte foi solução de KCl na concentração de $0,1\text{mol L}^{-1}$ em água. Quando necessário, o pH do eletrólito era ajustado até 3 com HCl diluído. Todas as desaerações das soluções de eletrólito foram realizadas através de borbulhamento de nitrogênio por tempos entre 5 e 10 minutos.

Eletrodos modificados

a) **O eletrodo de pasta de carbono modificado** foi preparado preenchendo-se a cavidade do eletrodo base com uma mistura, bem homogênea, de 101mg de grafite Fluka, 50mg de óleo Nujol e 15mg do polímero redox.

b) **Os eletrodos de filme** foram preparados, mergulhando-se rapidamente eletrodos de platina ou epoxi grafitada em uma solução de 10mg do polímero + 400 μL de solução aquosa de ácido acético 5 % m/v deixando-se secar ao ar em seguida.

c) **Os eletrodos de filme grafitado** foram feitos mergulhando-se eletrodos de platina ou epoxi grafitada em uma mistura de 18 mg de grafite, 12 mg de polímero e 400 μL de solução aquosa de ácido acético 5 % m/v.

d) **Os eletrodos grafitados e reticulados** foram preparados gotejando, sobre o eletrodo preparado como indicam os itens “b” e “c”, solução aquosa de glutaraldeído a 10% m/v, deixando-se reticular durante uma noite, lavando-se com solução aquosa de glicina $0,1\text{mol L}^{-1}$ em seguida, para retirar os excessos de glutaraldeído. Procedimento alternativo para a reticulação consistiu em submeter o eletrodo aos vapores de uma solução aquosa de glutaraldeído 25 % m/v, durante uma noite, lavando-se em seguida para retirar os excessos de glutaraldeído.

e) **Eletrodos grafitados, reticulados e com adesivo de álcool polivinílico**, foram preparados mergulhando-se eletrodos de platina ou epoxi grafitada em uma mistura de: 18mg de grafite; 12mg de polímero dissolvidos em $400\mu\text{L}$ de solução aquosa de ácido acético a 5% e 10mg de álcool polivinílico. Reticulou-se em seguida e lavou-se com solução de glicina $0,1\text{mol L}^{-1}$, para retirar os excessos de glutaraldeído.

f) **O eletrodo com enzima** foi preparado como se descreve a seguir.

Solução de polímero redox: 3mg de quitosana não modificada;

5mg de polímero redox;

$100\mu\text{L}$ de KCl saturado;

$600\mu\text{L}$ de ácido acético 20 % m/v.

Agitou-se para completa dissolução.

Solução de adesivo: 20mg de álcool polivinílico;

$100\mu\text{L}$ de água.

Aqueceu-se a 70°C , até completa dissolução.

Solução grafitada: À solução do polímero redox adicionou-se $30\mu\text{L}$ de solução de adesivo e 80mg de grafite. Misturou-se bem.

Solução de enzima: Dissolveram-se 1,8mg de glicose oxidase (Sigma, de *Aspergillus Niger* EC 1.1.3.4) em 1mL de tampão fosfato pH 7 (corresponde a 200 unidades mL^{-1}).

Eletrodo com enzima. Aplicou-se sobre um eletrodo de disco de platina a solução grafitada e esperou-se evaporar o solvente. Sobre este filme aplicaram-se $10\mu\text{L}$ de solução de enzima. Esperou-se que evaporasse o solvente e deixou-se uma noite em contato com vapores de solução de glutaraldeído a 25% m/v em geladeira (4°C). Lavou-se com solução de glicina $0,1\text{mol L}^{-1}$.

Preparação de filme polimérico para espectroscopia no infravermelho

A fim de obter o espectro dos polímeros no infravermelho, preparou-se uma solução contendo 5mg do polímero em 600 μ L de solução aquosa de ácido acético 20% m/v. Trinta microlitros desta solução foram evaporados por uma noite, a temperatura ambiente, sobre uma pequena placa de vidro escuro com 10 x 7 x 1mm. A espectroscopia no infravermelho foi obtida contra uma placa idêntica, sem polímero.

Métodos usados

O estudo da influência do pH sobre o comportamento eletroquímico do polímero redox foi feito, preparando-se um eletrodo de pasta de grafite modificado pelo polímero redox, conforme descrito. Este eletrodo foi imerso no eletrólito de suporte ajustado a pH 2,7 por HCl . Usando eletrodo de Ag/AgCl saturado como referência e platina como eletrodo auxiliar, ciclou-se o potencial entre -600 mV e +900 mV a 100mV s⁻¹ até que se estabilizassem as correntes de pico (cerca de 15 min). Registrou-se então um voltamograma cíclico. Trocou-se o eletrólito de suporte por uma nova solução de KCl sem HCl , cujo pH foi de 6,9. Ciclou-se o potencial durante 50 minutos a fim de garantir o condicionamento do sistema eletroquímico ao novo valor de pH. Registrou-se então um novo voltamograma.

A influência de tempo, luz e temperatura sobre o polímero redox foi monitorada por espectroscopia no infravermelho. Após preparação de uma placa contendo este material, obteve-se o espectro de infravermelho. Deixou-se a placa exposta à luz do laboratório, durante uma semana, à temperatura ambiente, realizando-se varredura espectral no infravermelho a cada dia. Os espectros obtidos foram comparados.

Os eletrodos de filme foram avaliados em relação a dois aspectos: grau de efetivo ancoramento na superfície eletródica (por observação visual da superfície eletródica e estabilidade do sinal voltamétrico) e seu comportamento eletroquímico (por voltametria cíclica, buscando-se um máximo nas correntes faradaicas (mínima corrente de fundo) e um mínimo de deslocamento entre os valores de potencial de pico.

A resposta do eletrodo enzimático à glicose foi avaliada por voltametria cíclica em um eletrólito sem glicose e com glicose. Os dois voltamogramas foram registrados e comparados.

2.2.2-Resultados e discussões

Os estudos do trabalho original⁷⁹ sobre o polímero redox $\text{QTS}^{\text{py}}[\text{Fe}(\text{CN})_5]^{3-}$ foram realizados sempre em pH em torno de 3, no qual se verifica um comportamento eletroquímico próximo do previsto para par reversível pela equação de Randles-Sevcik (página 12), como pode ser avaliado pelo voltamograma da Figura 24 (página 43). Como a intenção era de que este polímero atuasse como mediador da glicose oxidase, ou de outra oxi-redutase, foi importante verificar se este desempenho ocorreria em valores de pH mais compatíveis com as enzimas, vale dizer, próximos de 7. Os voltamogramas obtidos em eletrólito a pH 2,7 e 6,9 apresentaram parâmetros listados na Tabela 3.

Observaram-se algumas diferenças no voltamograma a pH 2,7 em relação ao voltamograma da Figura 24. A principal destas diferenças é o deslocamento dos potenciais de pico que, na Figura 24, é cerca de 60mV e, na Tabela 3, é de 120mV. Esta diferença pode ser atribuída apenas à queda ôhmica associada ao grafite usado no eletrodo, sendo grafite de qualidade compatível com finalidade eletroquímica, no caso da Figura 24 (grafite Fluka de baixa resistência elétrica) e um grafite comum (da marca Synth), no caso do estudo com eletrólito em valores de pH diferentes.

79. Rodrigues, C. A.- Exame de Qualificação ao Doutorado. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1995.

Tabela 3. Comportamento eletroquímico do polímero redox QTS^{py}[Fe(CN)₅]³⁻ em eletrodo de pasta de grafite. Eletrólito de suporte é KCl 0,1 mol L⁻¹ em dois valores de pH. Velocidade de varredura 100 mVs⁻¹, desde -600 a + 900 mV. Potenciais vs. Ag/AgCl saturado.

| Parâmetros Voltamétricos | pH 2,7 | pH 6,9 |
|--|--------|--------|
| E _{pc} (mV) | 239 | 173 |
| E _{pa} (mV) | 360 | 321 |
| Deslocamento dos potenciais de pico (mV) | 120 | 147 |
| i _{pc} (μA) | 11 | 6,5 |
| i _{pa} (μA) | 10 | 4,8 |
| i _{pc} /i _{pa} | 1,1 | 1,4 |
| E _{1/2} (mV) | 300 | 247 |

O comportamento em um certo valor de pH é reproduzível, desde que se aguarde o tempo necessário ao condicionamento ao novo eletrólito de pH diferente.

O empobrecimento eletroquímico do polímero redox, traduzido na diminuição das correntes de pico, no aumento do deslocamento dos potenciais de pico e no afastamento da unidade na relação entre as correntes de pico catódica e anódica, não era interessante para as aplicações pretendidas. Observe-se que não se pode atribuir apenas à quedas ôhmicas as diferenças observadas, uma vez que o próprio valor de E_{1/2} sofre uma apreciável variação e não meramente o deslocamento dos potenciais de pico. Isto significa que o fator termodinâmico, vale dizer, o poder redox do complexo de ferro é alterado pelo aumento de pH. Pode-se tentar explicar estes efeitos pelas seguintes considerações.

Em primeiro lugar, é preciso recordar a elevada resistência à transferência de carga oferecida pela matriz de quitosana a potenciais elétricos relativamente baixos (ver página 40). Embora lidando com uma quitosana modificada, esta propriedade não se alterou tanto, a julgar pela medida da resistência elétrica realizada com ohmímetro em um filme muito fino

e seco do polímero redox em questão (preparado como se descreve nos eletrodos de filme) quando obteve-se o valor de aproximadamente 30 M Ω . Portanto, a condutividade do polímero em meio líquido só pode ser atribuída à transição FeII / FeIII do complexo mediador. Outro fato fundamental diz respeito à migração iônica, imprescindível ao mecanismo de transferência eletrônica via complexo mediador. Na forma reduzida, o complexo tem carga líquida 3-, acomodando três contra-íons (potássio, hidroxônio ou QTS^{py}H⁺) de carga positiva unitária. Ao ser oxidado o ferro III, a carga líquida muda, tornando-se 2-, requerendo, agora, apenas dois contra-íons de carga unitária. O terceiro contra-íon precisa migrar para outro sítio, surgindo assim uma situação na qual a velocidade do processo, mesmo tratando-se de espécie eletroativa imobilizada na superfície do eletrodo, depende de transferência de massa. Ao ser ciclado o potencial, estes contra-íons ficarão indo e vindo de acordo com as mudanças no estado de oxidação do metal central. Os obstáculos ao livre trânsito de contra-íons diminuem a velocidade de migração destas espécies e como consequência limitam as correntes associadas ao processo redox. Por este mesmo modelo, explica-se o fato do polímero redox considerado não ser bom condutor em fase sólida.

A migração de contra-íons depende, portanto, das mudanças morfológicas da matriz polimérica, que, como se apresentou na introdução (página 21), dependem de vários fatores: força iônica, pH, concentração do polímero e presença de espécies que inibam ligações de hidrogênio, como a uréia. No polímero de Rodrigues e colaboradores a quitosana está 80 % modificada por grupamentos piridil, o que só torna tais efeitos mais críticos, uma vez que a piridina é uma base mais fraca que amina. Assim, se metade dos sítios básicos da quitosana está desprotonada em pH 6,3, a fração de grupos QTS^{py} desprotonados neste pH é bem maior (a titulação do polímero QTS^{py} revelou que em pH 5,5 a maior parte dos grupos já havia perdido seus prótons).

Levando em conta tais princípios, podemos interpretar as diferenças observadas nos dois voltamogramas. Em pH 2,7, as correntes de pico são crescentes porque na interface do eletrodo de pasta de grafite, o polímero, inicialmente sólido, vai-se protonando (o que deve ser rápido) ganhando hidrofiliabilidade, alcançando uma estrutura mais expandida e deixando-se permear por contra-íons que vão e vem, à medida que cada ciclo se completa. Provavelmente este processo seja determinado pela migração de contra-íons que depende de

inchamento e mudanças conformacionais lentas. Naturalmente este processo tende a um limite, ditado pelo pH, força iônica (eletrólito de suporte e sua concentração), natureza dos contra-íons e outras características associadas ao eletrodo. Em pH baixo, um contra-íon muito rápido pode contribuir para correntes altas: o H^+ .

Em pH acima do pKa a situação muda apreciavelmente. Com a desprotonação dos grupos piridil não ocupados pelo complexo, cai a carga efetiva da matriz polimérica e com isto também caem a hidrofiliçidade e o afrouxamento estrutural. Como consequência, a dificuldade de permeação dos contra-íons cresce. Paralelamente, diminui drasticamente a concentração de contra-íons muito rápidos, também contribuindo na mesma direção. O aumento do deslocamento dos potenciais de pico e as menores correntes de pico podem ser associados a este modelo.

A relação entre as correntes de pico se afastou um pouco mais da unidade no pH 6,9. Isto, como pode ser observado na tabela 3, parece ser causado pela queda maior na corrente de pico anódica. Para explicar isto, seria necessário considerar um processo anódico relativamente mais lento que o catódico. Mais acentuada ainda é a mudança no valor de $E_{1/2}$ ocasionada por um deslocamento maior no pico catódico. Para explicar isto seria necessário mostrar uma situação tendente a estabilizar o estado Fe III em relação á forma reduzida. Portanto a migração de contra-íons, em si, não pode servir de modelo para o entendimento destes processos. Lidando com um sistema semelhante, Shigeara, Oyama e Anson⁹ usam um argumento que pode ser adaptado a esta situação. Trata-se, não da migração dos contra-íons mas do processo de emparelhamento dos contra-íons. O modelo sugere que na situação de pH 6,9, o enovelamento estrutural torna-se tal, que a migração de íons K^+ fica muito inibida. A migração de prótons livres, também, pois sua concentração caiu 10.000 vezes em relação ao pH 3. O processo de emparelhamento iônico via $QTS^{\wedge}pyH^+$ pode então ser importante, embora lento, pois envolve mudança conformacional do polímero. Consideremos, então, que o emparelhamento iônico, via $QTS^{\wedge}pyH^+$, envolva consideráveis dificuldades estéricas pois, mesmo na condição de matriz enovelada, exige acomodação, em torno do grupo $QTS^{\wedge}py[Fe(CN)_5]^{3-}$ (que contém FeII), 3 grupos $QTS^{\wedge}pyH^+$, espécie associada à própria matriz polimérica. Em contrapartida a espécie oxidada, tendo carga líquida 2-, requer apenas 2 grupos catiônicos, sendo, portanto, relativamente estável

9. Shigeara, K.; Oyama, N.; Anson, F.C.- Journal of American Chemical Society 103 (1981) 2552.

quando comparado com a forma reduzida. Desta maneira, em pH 6,9 aparece uma barreira termodinâmica que se opõe à redução. Esta barreira traduz-se voltametricamente em um potencial de meia-onda menor que o obtido em pH 2,7.

Com este modelo não foi possível explicar porque o processo de oxidação foi mais lento que o de redução em pH 6,9 ($i_{pc} > i_{pa}$), enquanto que em pH 2,7 eles foram praticamente iguais (i_{pc} quase igual a i_{pa}).

Se poderia argüir que a mudança de $E_{1/2}$ poderia estar associada à mudanças na esfera de coordenação do complexo mediador. Por exemplo, se o ferro, soltando um CN^- , aceitasse um ligante mais duro, como OH^- em pH 6,9, estaria justificado o deslocamento do $E_{1/2}$ para potenciais menores. Contra esta hipótese há dois fatos. Em primeiro lugar, dados da literatura⁹ revelam que $py[Fe(CN)_5]^{3-}$ não apresenta mudanças de potencial de meia-onda na faixa de pH entre 3 e 7. Além disto, recordemos que o comportamento do polímero redox é reprodutível. É pouco provável que as mudanças na esfera de coordenação sejam reversíveis, ou seja, se hidroxila houvesse substituído cianeto ao se elevar o pH, quando retornássemos ao pH mais baixo, provavelmente o hidróxido seria convertido em água e não em cianeto.

O estudo da influência de tempo, luz e temperatura foi decorrente da dificuldade encontrada em reproduzir o comportamento eletroquímico de diversos eletrodos, ao longo de dias de trabalho. A hipótese foi de que esta dificuldade estaria associada à mudanças estruturais no polímero redox, induzidas por tempo, luz e temperatura ambientes. Os espectros de infravermelho obtidos ao longo dos dias, contudo, foram iguais, falsificando a hipótese.

Os biossensores baseados em eletrodos de pasta de grafite demandam gasto excessivo de um reagente muito nobre- enzimas purificadas. Por este motivo, associado ao fato de que a quitosana *per se* ser um polímero filmogênico, realizou-se esforço no sentido da obtenção de um filme do polímero redox sob estudo, sobre a superfície de eletrodos sólidos. Esta estratégia contudo não revelou-se efetiva. Como foi discutido na introdução (página 24), embora com massa molar elevada, quitosana não se adsorve bem sobre eletrodos metálicos, de grafite, de carbono vítreo ou epóxi grafitada. Os eletrodos de filme preparados conforme se descreve acima não apresentaram qualquer sinal voltamétrico, pois

9. Shigeara, K.; Oyama, N.; Anson, F.C.- Journal of American Chemical Society 103 (1981) 2552.

o filme se dissolvia prontamente, mesmo em água. Além disto, a resistência elétrica do filme era muito elevada, o que levou a aditivar o filme com grafite. A condutividade melhorou mas a aderência do filme tornou-se ainda pior. Os eletrodos de filme grafitados e reticulados não se dissolveram: soltaram-se inteiros. O único filme com alguma estabilidade foi conseguido nos eletrodos grafitados, reticulados e com adesivo de álcool polivinílico. Mesmo assim, no espaço de tempo de 1 a 2 horas, imerso no eletrólito de suporte, o filme soltava-se da superfície do eletrodo. Neste eletrodo, o voltamograma obtido a pH 3 ou 7 é praticamente o mesmo mas, como se pode observar na Figura 39, as correntes de pico foram pouco destacadas em relação ao fundo (corrente de carregamento da dupla camada).

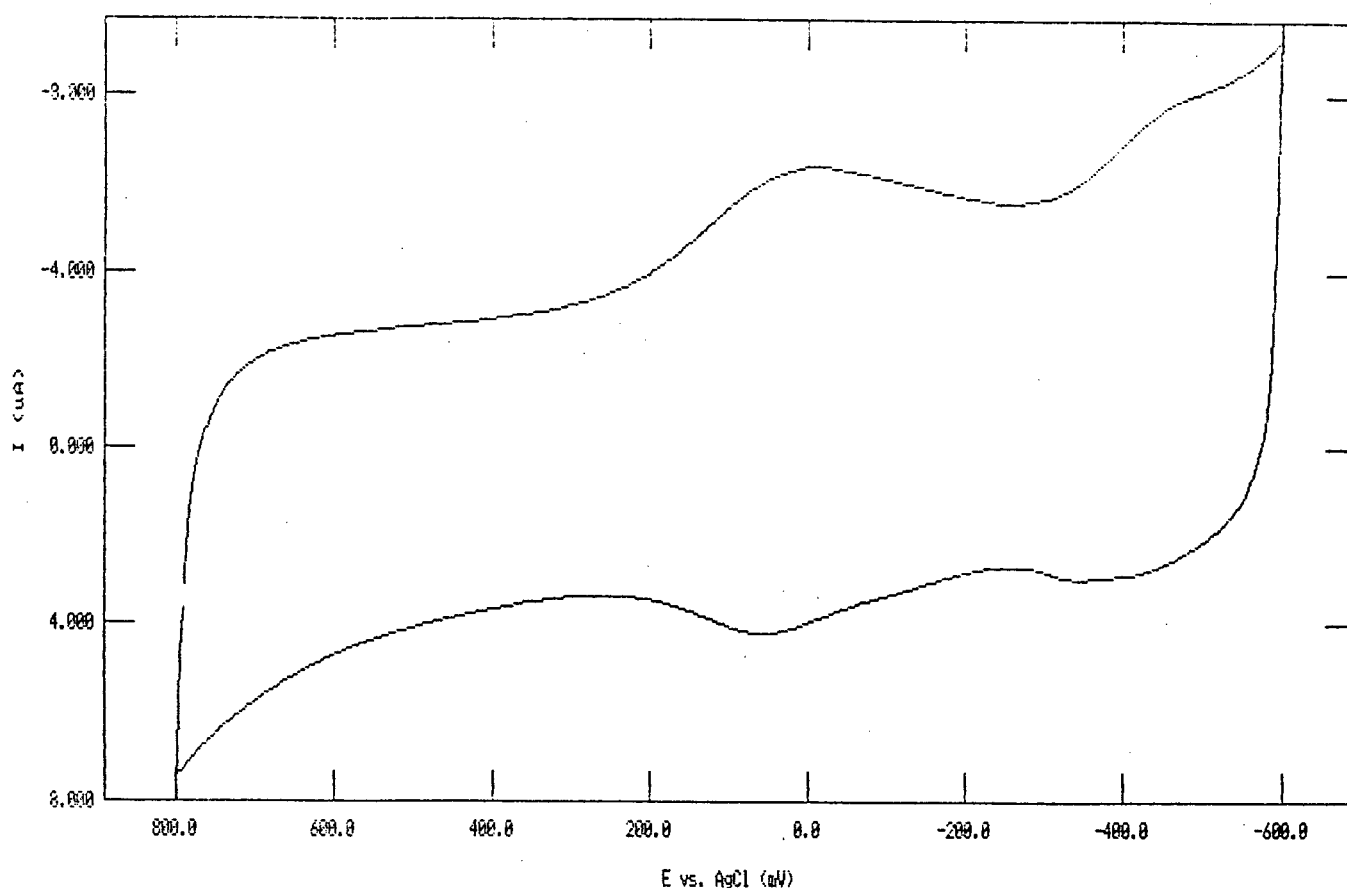


Figura 39. Voltamograma do polímero redox $\text{QTS}^{\wedge}\text{py}[\text{Fe}(\text{CN})_5]^{3-}$. Eletrodo de trabalho de platina com filme do polímero redox grafitado, reticulado e aditivado com adesivo. Eletrólito de suporte de $\text{NaCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e contra-eletrodo de platina. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Registrou-se o décimo ciclo.

Pode-se tentar uma explicação: a limitação à hidroflicidade introduzida pela reticulação leva a compactação estrutural da matriz que dificulta a migração de contra-íons^{9,109}. Realizou-se uma tentativa de atenuar este efeito adicionando KCl ao filme. Todavia, quando este eletrodo foi imerso no eletrólito, a tendência anterior se inverteu: as correntes de pico (embora bem destacadas em relação ao fundo) iam decrescendo, certamente pela difusão dos íons de KCl da superfície do eletrodo para o seio da solução.

O eletrodo enzimático preparado foi absolutamente indiferente à glicose. Uma das possíveis causas deste insucesso pode ser alcançada considerando a carga efetiva do polímero, através do seguinte cálculo.

O polímero redox tem $1,08 \times 10^{-3}$ mol de Fe g⁻¹ de polímero redox (determinado por absorção atômica). Este polímero foi preparado a partir de uma quitosana com grau de desacetilação de 80% e a substituição dos grupos amino por piridil (página 42) foi de 80%. Deste modo, se forem admitidas 100 unidades monoméricas no polímero redox pronto, haverá 64 (80% de 80) unidades monoméricas com grupos piridil (somando piridil livre e piridil ligado ao pentaciano ferrato), 16 unidades com grupos amino e 20 unidades acetiladas. Vamos designar cada uma destas espécies por letras, chamando

n – a quantidade de matéria de grupos com Fe por cada grama do polímero

m – a quantidade de matéria de grupos com piridil livre por cada grama do polímero

p – a quantidade de matéria de grupos com NH₂ livre por cada grama do polímero

q – a quantidade de matéria de grupos acetilados por cada grama do polímero

Considerando que

a unidade monomérica com Fe tem massa molar 437g mol⁻¹

a unidade monomérica com piridina tem massa molar 251g mol⁻¹

a unidade monomérica com NH₂ tem massa molar 161g mol⁻¹

a unidade monomérica desacetilada tem massa molar 203g mol⁻¹

podem-se escrever as seguintes igualdades

$$1g = 437n + 251m + 161p + 203q$$

$$\frac{n + m}{n + m + p + q} = 0,640$$

$$\frac{n + m + p}{q} = 4,00$$

Por estequiometria, vê-se que $n = 1,08 \times 10^{-3}$ mol. Então, aplica-se a regra de Leibnitz-Cramer, resolvendo o sistema de três equações e três incógnitas, quando obtém-se

$$m = 1,17 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

$$p = 5,63 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

$$q = 7,03 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

Então, para a relação $n / n + m + p + q$ obtém-se o valor de 0,307 que representa a fração molar dos grupos de pentacianoferrato. De modo análogo, a relação $m + p / n + m + p + q$ igual a 0,490 representa a fração molar dos grupos protonáveis (amino e piridina). A fração restante é dos grupos acetilados (não protonáveis) e tem o valor de 0,203.

Ou seja, para cada 10 unidades monoméricas, 3 contém o grupo pentaciano ferrato, 5 são grupos protonáveis e 2 são acetiladas (não protonáveis). Como cada protonável, uma vez protonado, contribui com carga 1+ e cada pentaciano com carga 3- , conclui-se que, mesmo totalmente protonado, o polímero não é um policação e sim um poliânion! Como a enzima é um poliânion, não pode haver acoplamento efetivo entre estas duas espécies.

2.2.3-Conclusões

Os resultados obtidos não recomendam o uso do polímero redox $\text{QTS}^{\text{py}}[\text{Fe}(\text{CN})_5]^{3-}$ para a construção de biossensores e, desta forma, determinaram o redirecionamento do trabalho no sentido de:

- a) obter um polímero redox de quitosana que fosse bastante hidrofílico e catiônico, mesmo em pH 7.
- b) ancorar de modo efetivo o polímero produzido sobre um eletrodo sólido.
- c) acoplar de modo efetivo a enzima glicose oxidase ao novo polímero redox.

O complexo disponibilizado foi o $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Com centro metálico de rutênio, este complexo evita os problemas decorrentes da labilidade dos complexos de ferro. Além disto, como a bipyridina é ligante destituído de carga, esta passa a ser decorrente do estado de oxidação do metal, sendo a transição $2+ / 3+$ a mais comum. Isto garante um polímero solúvel e catiônico independente do pH, possibilitando o acoplamento efetivo à enzimas aniônicas. Todavia, dois inconvenientes iniciais foram observados. O primeiro é que este complexo tem baixíssima solubilidade em água, solvente por excelência da quitosana. O segundo é o fato de que, no centro metálico deste complexo comparece o $\text{Ru}(\text{II})$ que é relativamente mole, em princípio pouco propício à ligação com a amina da quitosana, em que pese o fato, descrito na introdução (página 33), de metais moles também se ligarem de modo efetivo a este polímero.

2.3- Síntese de polímero redox por reação de QTS com $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$.

Diversas sínteses foram tentadas a fim de alcançar no polímero um grau de rutenação que levasse a um bom resultado eletroquímico. Em quase todas, a reação de quitosana com o complexo foi conduzida em meio homogêneo, com água como solvente, ficando a aquação do complexo por conta da prata, que retira o cloro da esfera de coordenação, (ver página 82). Em meio heterogêneo, uma tentativa foi realizada, com quitosana sólida, usando dimetilacetamida ou dimetilformamida como solvente para o complexo. Em dois estudos, em lugar do polímero livre em solução, tentou-se produzir o polímero redox *in situ*, partindo-se de um eletrodo de carbono vítreo modificado covalentemente por quitosana. Em três estudos, partindo-se do princípio de que, sendo mais duro, Ru III teria maior chance de ligar-se ao NH_2 do polímero, tentou-se produzir o polímero redox *in situ*, pondo-se em contato quitosana (depositada sobre eletrodo de ouro ou platina) com o complexo em água ou dimetilacetamida, ciclando-se o potencial em região necessária para promover a oxidação $\text{Ru II} \rightarrow \text{Ru III}$. O polímero redox preparado *ex situ* ancorou-se covalentemente sobre carbono vítreo, e estudou-se o comportamento voltamétrico do eletrodo assim modificado. Verificou-se o acoplamento entre um dos polímeros redox produzidos e a glicose oxidase, ambos em solução. Estudou-se a resposta à glicose de um protótipo de biossensor com filme de polímero redox-enzima.

2.3.1-Experimental

Todos os reagentes citados a seguir foram de grau analítico e usados como recebidos. Quando necessário, solventes foram secos deixando-se, por dias, em contato com peneira molecular de 4 ângstron. A água usada em todas as preparações, com condutividade de $0,1\mu\text{S cm}^{-1}$, foi desionizada em sistema Milli-Q. O complexo, gentilmente cedido por outro laboratório, foi obtido de acordo com procedimento da literatura¹⁰⁷ (ver página 82).

Sistema eletroquímico

Os eletrodos não modificados necessários foram preparados como se descreve na seção 2.2.1. As medidas voltamétricas foram feitas em potenciostato da firma Microquímica Ind. e Com. LTDA. O eletrólito de suporte foi solução de $\text{KCl } 0,1\text{mol L}^{-1}$ em água. Quando necessário, o pH do eletrólito era ajustado até 3 com HCl diluído. Todas as desaerações das

107. Sullivan Salmon Meyer- Inorganic Chemistry 17 (1978) 3334.

soluções de eletrólito foram realizadas através de borbulhamento de nitrogênio por tempos entre 5 e 10 minutos.

Eletrodos modificados.

O ancoramento covalente de quitosana ou do polímero redox pronto foi feito através de procedimentos da literatura^{22,24} (ver página 25). Inicialmente, um eletrodo de carbono vítreo foi polido, imerso em banho de ultrassom e seco ao ar. Uma mistura oxidante foi preparada com 0,45g de KMnO_4 + 0,03g de KNO_3 + 4mL de H_2SO_4 concentrado. Nesta solução verde foi imersa a superfície do eletrodo de carbono vítreo, e, sob temperatura ambiente, aguardou-se 30 minutos, após o que se considera que a superfície esteja rica em grupamentos carboxila. Lavou-se rapidamente com água e deixou-se em H_2O_2 a 3%*m/v* a fim de remover os resíduos de compostos de manganês. Daqui para diante, seguiu-se 2 caminhos: reação com cloreto de tionila, SOCl_2 , seguida do acoplamento à quitosana ou reação com dicitclohexilcarbodiimida, DCC, precedida da evaporação de solução de solução aquosa de quitosana sobre a superfície do eletrodo.

Reação com cloreto de tionila. O eletrodo oxidado foi seco em estufa a 120°C por duas horas, esfriado em dessecador sobre sílica gel e mergulhado em cloreto de tionila por 30 minutos à temperatura ambiente. O excesso de SOCl_2 foi removido por um jato de ácido fórmico concentrado (98 - 100 %*m/m*) e em seguida mergulhou-se a ponta do eletrodo em uma solução de quitosana em ácido fórmico (5mg do polímero em 50mL de ácido), mantendo-se a reação por 5 minutos à temperatura ambiente. Mergulhou-se a ponta do eletrodo em água a 70°C durante 30 minutos, a fim de remover todo o polímero não ligado covalentemente.

Reação com DCC. Sobre o eletrodo oxidado, foram aplicados 10 μL de uma solução de quitosana preparada pela dissolução de 6mg do polímero em 1mL da mistura de ácido acético a 2 %*m/v* com metanol (7 + 3 em volume). Após secagem ao ar por 5h, o eletrodo foi deixado por uma noite em estufa a 120°C e esfriado em dessecador sobre sílica gel. O acoplamento polímero-carboxila da superfície do eletrodo foi feito submergindo-se a ponta do eletrodo em uma solução de 2g de DCC em 20mL de DMF + acetonitrila (1+1 em volume), e deixando-se reagir por 5h à temperatura ambiente (em torno de 25°C). Lavou-se

22. Kurauchi, Y.; Tsurumori, E.; Ohga, K.- *Bulletin of Chemical Society of Japan.* 62 (1989) 1341.

24. Jinrui, X.; Bin, L.- *Analyst* 119 (1994) 1599.

o eletrodo com DMF, ácido acético a 2 %m/v e mergulhou-se a ponta do eletrodo em água a 70°C durante 30 minutos, a fim de remover todo o polímero não ligado covalentemente.

Teste Ag (para quitosana sobre carbono vítreo).

A fim de verificar se os procedimentos da literatura para imobilização de quitosana sobre a superfície de eletrodos de carbono vítreo haviam sido conduzidos de modo adequado, desenvolvemos um teste que consistia na imersão do eletrodo recém modificado em solução de íons prata $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ durante 5 minutos. O eletrodo era então lavado com 12 jatos de água de uma pissete e arranjado em uma célula eletroquímica de três eletrodos cujo eletrólito de suporte era KCl em pH 3, perfeitamente desaerado. O potencial era então ciclado a 50 mV s^{-1} entre $-0,6 \text{ V}$ e $+0,4 \text{ V}$, registrando-se o voltamograma correspondente ao 1º ciclo, associado à prata acumulada no polímero imobilizado.

Obtenção da quitosana.

A estrutura esquelética do animal marinho lula, denominada popularmente de pena de lula serviu de fonte de quitina com pureza superior à do camarão. As “penas” foram extraídas e secas ao ar durante vários dias. Com uma tesoura foram reduzidas a pequenos pedaços e colocadas em um frasco contendo um volume de solução aquosa de KOH 50% m/m correspondente a 5 vezes ao do material sólido. A suspensão foi perfeitamente desaerada por borbulhamento de nitrogênio e o frasco lacrado hermeticamente. Este conjunto foi aquecido em estufa a 70 °C por 55h, depois do que separou-se a parte líquida que foi desprezada. Lavou-se o precipitado por decantação até que o pH da água de lavagem tornou-se 7, quando a quitosana apresentou-se sob a forma de “olhos de peixe” (partículas sólidas com a superfície sob a forma de gel). Solubilizou-se o material em ácido acético a 2 % m/v e filtrou-se a solução em membrana filtrante de $0,4 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro. A fim de eliminar polímeros de massa molar baixa, produzidos durante o processo de hidrólise, a solução foi colocada em um saco de diálise e purificada por vários dias. Reprecipitou-se a quitosana pela adição de solução de KOH até pH 9 e separou-se o sólido por sifonagem e centrifugação. Secou-se a quitosana em frasco de polietileno a 70°C durante 60h e pulverizou-se em gral de porcelana. A caracterização se fez por

espectroscopia no infravermelho e UV-Vis. A determinação do grau de desacetilação por titulação potenciométrica conduziu ao valor de 89%.

Síntese dos polímeros redox *ex situ* em meio homogêneo (aquoso).

A reação, com quantidades equimolares de unidades monoméricas de quitosana e complexo, foi feita suspendendo-se 6,0mg do complexo (com 520mg mol^{-1}) em 4,5mL de água desaerada e aquecida a $70\text{-}80^\circ\text{C}$, em um tubo de centrifuga revestido de folha de alumínio a fim de inibir a entrada de luz. Adicionou-se, então, $90\mu\text{L}$ de solução de perclorato de prata (3mg de AgClO_4 em $100\mu\text{L}$ de água). Deixou-se reagir por 2h em ausência de luz, agitando-se vigorosamente em intervalos de 5 minutos, mantendo a temperatura de $70\text{-}80^\circ\text{C}$. Durante este tempo, o precipitado de $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ dissolve-se e a solução, inicialmente fracamente púrpura, torna-se gradualmente mais intensamente vermelha. O tempo de duas horas foi escolhido pelo monitoramento do sinal absorciométrico em 474nm. Concluída a aquação do complexo, aguardou-se o resfriamento do tubo e centrifugou-se a 300rpm por 5 minutos, abandonando-se o precipitado de AgCl . Deste modo, um dos cloros da esfera de coordenação foi substituído por H_2O .

Paralelamente à aquação, 1,4mg de quitosana foram misturados (em béquer de polietileno*) a 12 gotas de HClO_4 aquoso a 2% m/v e uma gota de metanol. A pasta resultante foi agitada vigorosamente com um bastão de polietileno, até que se tornasse perfeitamente homogênea. Adicionou-se, então, 4mL de água a 70°C e misturou-se bem. Este procedimento assegurava rápida dissolução do polímero. Desaerou-se esta solução.

As duas soluções, de complexo e polímero, foram misturadas (em um frasco de teflon* dotado de tampa hermética) e o pH cuidadosamente elevado até 6 por solução aquosa de KOH , usando-se o próprio eletrodo de vidro para homogeneisar. Parte do polímero tornou-se então, um precipitado muito fino, quase imperceptível visualmente. Após intensa desaeração, o frasco foi lacrado e a reação (ver página 83) conduzida a 70°C em ausência de luz, durante 12h. Após este tempo, observou-se o desaparecimento do precipitado e o pH tornou-se cerca de uma unidade menor. Visualmente não foi notada variação na cor.

*O motivo da utilização de polietileno ou teflon é evitar a adsorção de quitosana sobre o vidro, como se apresentou na página 24.

Purificação dos polímeros redox

Um saco de diálise com largura de 3cm e cortado com 10 a 12cm de comprimento foi colocado em água e aquecido à ebulição por 5 minutos. Lavou-se com 10 porções de água a temperatura ambiente e amarrou-se uma das pontas com linha de algodão nº 10. No interior do saco, colocou-se a mistura proveniente da reação e, com outro pedaço de linha, fechou-se firmemente a outra ponta do saco de diálise. Este saco foi colocado em 1L de água, de forma que, pela difusão das moléculas pequenas para o exterior, o polímero redox fosse purificado. Durante 3 dias a água foi trocada, de modo a assegurar máximo gradiente de concentração. Após este tempo, o sinal absorciométrico da solução externa tornou-se indistinguível do branco de água, indicando que não havia mais rutênio não ligado ao polímero, no interior do saco de diálise.

O processo de síntese e purificação descrito acima foi repetido diversas vezes mudando-se as variáveis de reação: tempo (5, 8, 12, 24, 72 e 93 horas) e temperatura (70, 90 e 100 °C), procurando-se obter o maior grau de rutenação.

Determinação do grau de rutenação dos polímeros redox

Um volume bem determinado da solução de polímero redox purificado foi transferido para um pequeno recipiente de polietileno previamente tarado em balança analítica. Este frasco foi deixado aberto em um dessecador de sílica gel, sob vácuo, durante uma noite e, após completa evaporação do solvente, pesado em seguida. Desta maneira, foi possível determinar a concentração (em g mL^{-1}) do polímero redox na solução resultante do processo de purificação.

Um volume bem determinado da solução de polímero redox purificado foi diluído convenientemente e enviado para determinação de rutênio por espectrometria de massas com fonte de plasma induzido (gentileza de outro laboratório). A combinação deste resultado com o aludido no parágrafo anterior, possibilitou calcular o grau de rutenação do polímero (em mols de Ru por grama de polímero redox, e posteriormente em mols de Ru por 100 mols de unidades monoméricas de polímero redox).

Síntese do polímero redox *ex situ* em meio heterogêneo.

Em um tubo de ensaio revestido de folha de alumínio e dotado de hermética tampa de teflon, foram misturados 1,1mL de dimetilacetamida (DMA) + 1,2mg de quitosana + 5mg do complexo $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$. O complexo mostrou-se facilmente solúvel neste meio; gerando uma solução de cor violeta. Todavia, o polímero não se dissolveu, experimentando apenas um ligeiro inchamento de seus grãos. A mistura foi desaerada e aquecida a 85 - 90°C durante quatro dias, ao longo dos quais foram observadas as alterações na cor nos grãos de quitosana, com auxílio de uma lupa binocular. Após este tempo, os grãos foram lavados em DMA e sua solubilidade em água e ácidos diluídos foi avaliada.

Síntese dos polímeros redox *in situ*.

Duas tentativas foram feitas partindo de eletrodos de carbono vítreo modificados covalentemente por quitosana via reação com DCC, descrita acima. Na primeira, em meio aquoso, a superfície do eletrodo foi imersa em solução do complexo $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ClOH}_2$, preparada como descrito para a síntese *ex situ*, durante 24 horas a 70°C. Na segunda, a superfície do eletrodo foi imersa em solução do complexo $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ dissolvido em DMA (4mg mL^{-1}) a 90 °C por 48h.

Três tentativas foram feitas ciclando o potencial. Na primeira, depositou-se sobre a superfície de um eletrodo de platina uma gota de solução de quitosana (preparada como descrito acima para a síntese *ex situ*), evaporando-se em seguida. Este eletrodo foi imerso em solução de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ClOH}_2]^+$ (preparada conforme se descreveu para a síntese *ex situ*), contendo o eletrólito de suporte KClO_4 $0,1\text{mol L}^{-1}$ aquoso, em pH 7. Em célula eletroquímica de três eletrodos, o potencial foi ciclado de 1.1 V a - 0,2 V numa velocidade de 20mVs^{-1} , aguardando-se 1000 segundos (em 1,1 V) antes da varredura. Na segunda, depositou-se sobre a superfície de um eletrodo de ouro uma gota de solução de quitosana (preparada como descrito acima para a síntese *ex situ*), misturada a uma gota de solução de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ClOH}_2]^+$ (preparada conforme se descreveu acima para a síntese *ex situ*). Após a evaporação do solvente, o eletrodo assim modificado compôs uma célula eletroquímica de três eletrodos, usando-se, como eletrólito de suporte, KCl aquoso $0,1\text{mol L}^{-1}$ (pH 7). O potencial foi ciclado (à temperatura ambiente) de -0,2V a +1V numa velocidade de varredura de 50mVs^{-1} . A terceira tentativa foi feita depositando-se sobre a superfície de um

eletrodo de platina uma gota de solução de quitosana (preparada como descrito acima para a síntese *ex situ*), evaporando-se em seguida. Este eletrodo foi imerso em solução de $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ em DMA (4mg mL^{-1}), contendo LiCl . Este sistema não aquoso foi encerrado em uma microcélula com junção de amianto. Esta microcélula foi imersa no eletrólito de suporte KClO_4 $0,1\text{mol L}^{-1}$ aquoso, compondo o eletrodo de trabalho. Ao lado deste foram arranjados os eletrodos auxiliar e de referência. O potencial foi ciclado de $1,1\text{V}$ a $-0,2\text{V}$ numa velocidade de 100mVs^{-1} . Ao início de cada ciclo, o potencial era mantido por 1000 segundos em $1,1\text{V}$ e após a varredura para $-0,2\text{V}$ e sua reversa, a $1,1\text{V}$, este processo era repetido. Mantiveram-se tais condições por 4 horas.

Ancoramento do polímero redox obtido *ex situ* na superfície de carbono vítreo.

Sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo modificado por quitosana (tal como se descreve acima) gotejou-se a solução proveniente da purificação do polímero redox obtido *ex situ* e evaporou-se completamente a água. A ponta deste eletrodo foi deixada durante uma noite em contato com os vapores de uma solução de glutaraldeído a $25\% \text{m/v}$ a fim de co-reticular a quitosana ancorada no eletrodo ao polímero redox. Após reticulação, retirou-se o filme fracamente aderido sobre a superfície e deixou-se por 12 horas em contato com solução de cloreto de amônio $0,05\text{mol L}^{-1}$. Usando esta solução como eletrólito de suporte, e em célula de três eletrodos, ciclou-se o potencial de $-0,2\text{V}$ até $0,8\text{V}$ numa velocidade de 50mV s^{-1} , registrando-se o voltamograma correspondente.

Protótipo de biossensor usando o polímero redox obtido *ex situ*.

A 1mL da solução de polímero redox proveniente da purificação foram adicionados 6mg da enzima glicose oxidase e a mistura gotejada e evaporada, a temperatura ambiente, por 4 vezes $5\mu\text{L}$ sobre a superfície de um eletrodo de ouro, acarretando 13 unidades de enzima. Em célula de três eletrodos, e usando KCl $0,1\text{mol L}^{-1}$ em pH 7 perfeitamente desaerado, como eletrólito de suporte, varreu-se o potencial de $-0,2\text{V}$ a $+1\text{V}$ usando a velocidade de 50mV s^{-1} . Registrou-se este voltamograma e, em seguida, adicionou-se alguns miligramas de glicose à célula (concentração resultante na ordem de 10^{-2}mol L^{-1}), e, após homogeneização, obteve-se novo voltamograma.

2.3.2-Resultados e discussões

O ancoramento de quitosana na superfície de eletrodos de carbono vítreo, segundo os procedimentos descritos na literatura, foi de controle muito difícil, precisando ser conduzido com bastante cuidado. Isto aconteceu porque, se houvesse uma quantidade excessiva de material imobilizado, como consequência da grande resistência à transferência de carga conferida pela matriz de quitosana, o eletrodo não apresentava um comportamento eletroquímico aproveitável. Desta maneira, foi interessante disponibilizar um modo de verificar se a quitosana foi imobilizada e se a resposta eletroquímica esperada seria de boa qualidade, o teste Ag, como descrito. A idéia inicial era de atestar a presença de polímero pelos picos de corrente associados à prata ali acumulada. Os resultados obtidos com este teste constituíram-se, inicialmente, em verdadeiro “quebra-cabeças”. O resultado típico é como se apresenta na Figura 40: pico anódico aguçado e na região catódica picos arredondados e/ou múltiplos. Mas em algumas ocasiões eram obtidos voltamogramas como o da Figura 41, de aspecto distinto, sem que fosse possível fazer qualquer associação entre o preparo do eletrodo, o eletrólito ou a velocidade de varredura e o voltamograma resultante do teste Ag.

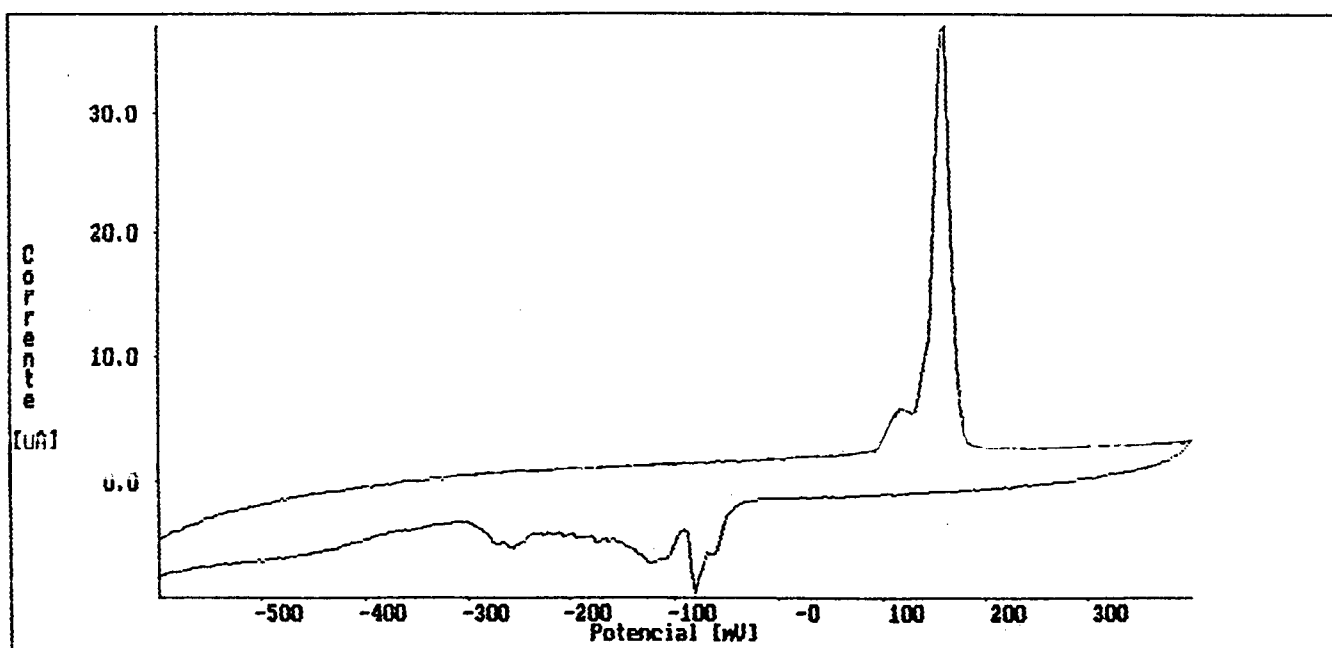


Figura 40. Sinal correspondente à prata acumulada na superfície do eletrodo modificado por quitosana. Eletrodo de trabalho de carbono vítreo em cuja superfície havia quitosana ancorada covalentemente, foi mergulhado em solução de Ag^+ e lavado, em seguida. Eletrólito de suporte de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3 e contra-eletrodo de platina. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Referência: ECS.

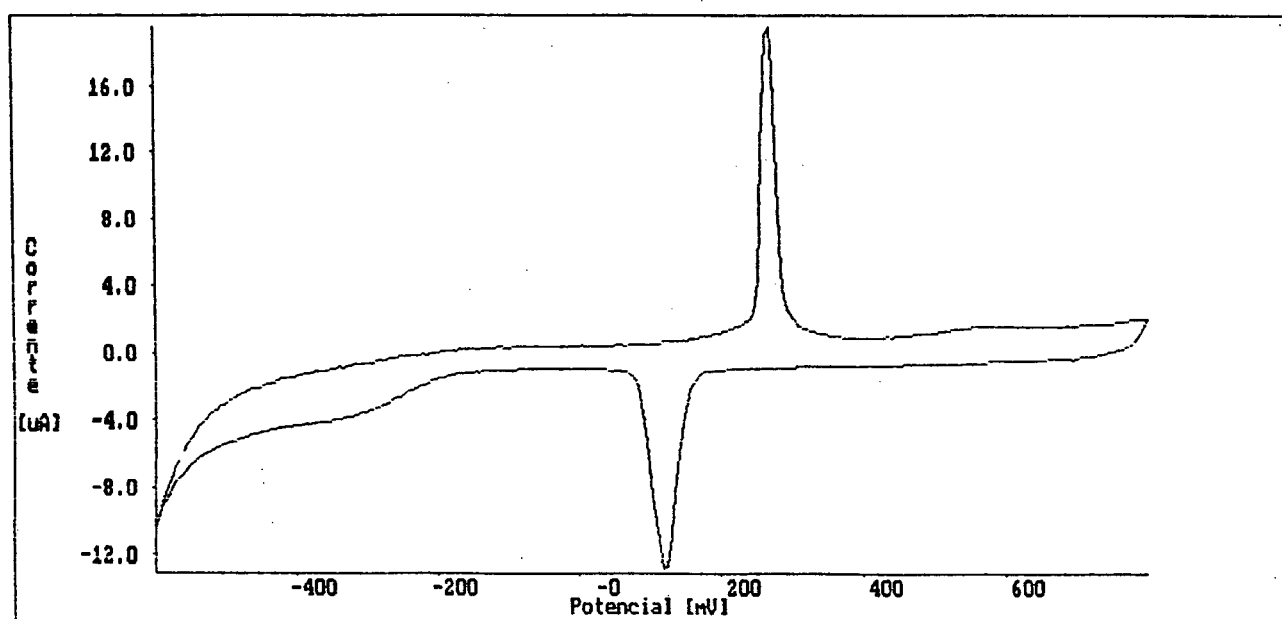


Figura 41. Sinal de prata com picos mais simétricos. Eletrodo de trabalho de carbono vítreo em cuja superfície havia quitosana ancorada covalentemente, foi mergulhado em solução de Ag^+ e lavado, em seguida. Eletrólito de suporte de Na_2SO_4 $0,1\text{mol L}^{-1}$ pH 2 e contra-eletrodo de platina. Velocidade de varredura de 100mV s^{-1} . Referência: ECS.

Na realidade, surpreendentemente, houve ocasião em que, trabalhando com condições ótimas no procedimento de imobilização, não se obteve qualquer resposta pelo teste Ag. Outro intrigante fato foi observado em ciclos sucessivos na voltametria do teste Ag. À medida que os ciclos se sucediam, os picos anódico e catódico iam diminuindo até

desaparecerem, na escala de corrente usada para o teste (50 μA). Neste ponto, a solução do eletrólito de suporte era substituída por uma nova e deixava-se o eletrodo neste meio durante 10-15 minutos, enquanto se processava a desaeração desta nova solução. Ao se retomar a voltametria, nas mesmas condições de antes, os picos reapareciam de modo nítido. Para entender melhor o que se passava na superfície do eletrodo modificado, partiu-se da advertência feita por Jinrui e Bin²⁴, no sentido de evitar excesso de quitosana na superfície do eletrodo, e após obtenção do voltamograma da Figura 40, realizou-se um interessante experimento. Deu-se um leve polimento na superfície do eletrodo usando alumina de 0,1 μm . A superfície do eletrodo foi posta em banho de ultrassom por 12 minutos e repetiu-se a voltametria, tal como antes, porém **sem** imersão em solução de prata. De modo aparentemente contraditório, houve aumento da corrente de pico anódico e melhora na condição de reversibilidade, evidenciada pela diminuição do deslocamento de potenciais de pico. Este processo foi repetido 4 vezes com as correntes sempre aumentando cerca de 10 μA em cada vez, até alcançar um máximo, quando se registrou o voltamograma da Figura 42, deixando evidente a importância do controle da espessura da camada de quitosana.

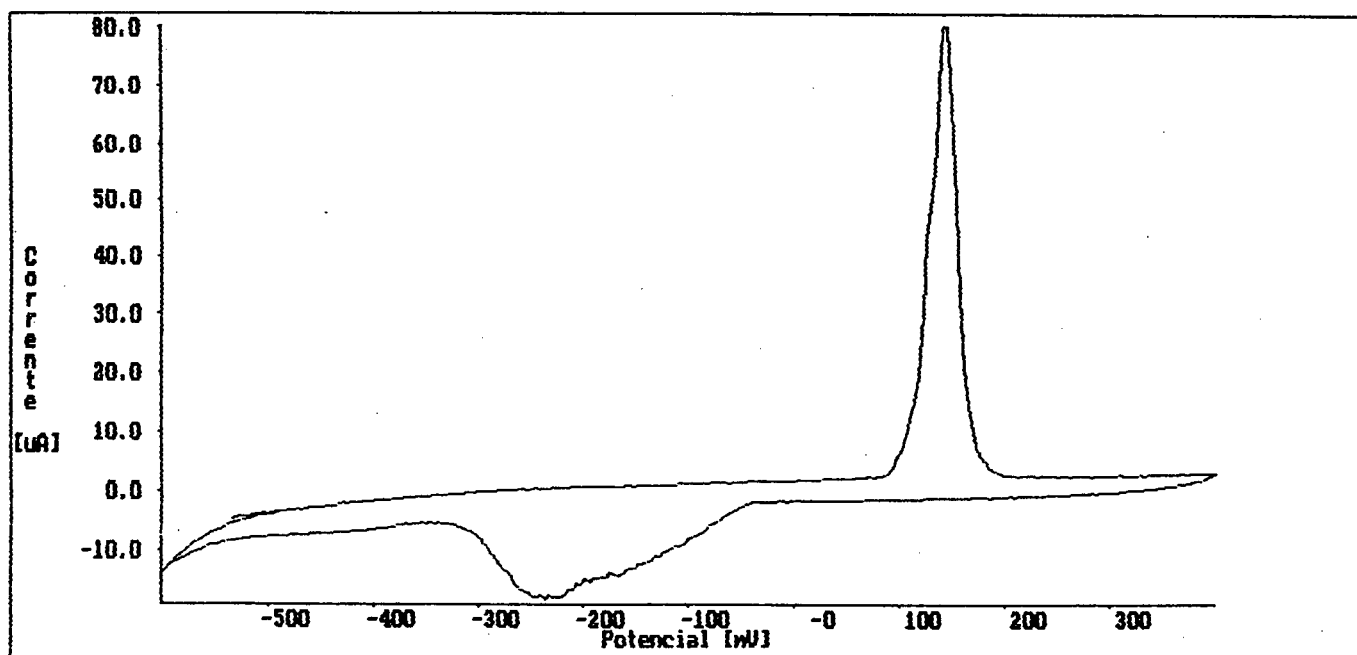


Figura 42. Sinal de prata após polimento da superfície. Parece contraditório, mas o sinal foi mais forte em relação ao obtido na figura 37. Condições iguais às descritas naquela figura.

Partindo deste resultado, tentou-se criar um modelo que explicasse todos os fenômenos observados. Admitiu-se que a superfície do eletrodo modificado apresentava-se com uma espessa camada de quitosana. Ao ser imerso na solução de íons prata, poucos destes íons estarão próximos da superfície do eletrodo, tal como mostra esquematicamente a Figura 43 A, tendendo a gerar picos discretos, na escala de tempo em que ocorre a varredura de potenciais. A alta resistência à transferência de carga da matriz de quitosana e o embaraçamento das cadeias poliméricas, restringindo sua liberdade conformacional, impediriam que os remotamente situados íons de prata viessem participar do processo eletródico. Se a superfície for esfregada por um abrasivo como a alumina, parte do material imobilizado solta-se, tornando a camada de material resistivo sobre o eletrodo menos espessa e mais condutiva. Os íons prata complexados em regiões remotas podem agora aproximar-se da superfície do eletrodo, devido à liberdade conformacional adquirida pelo polímero, aumentando as correntes de pico associadas à prata.

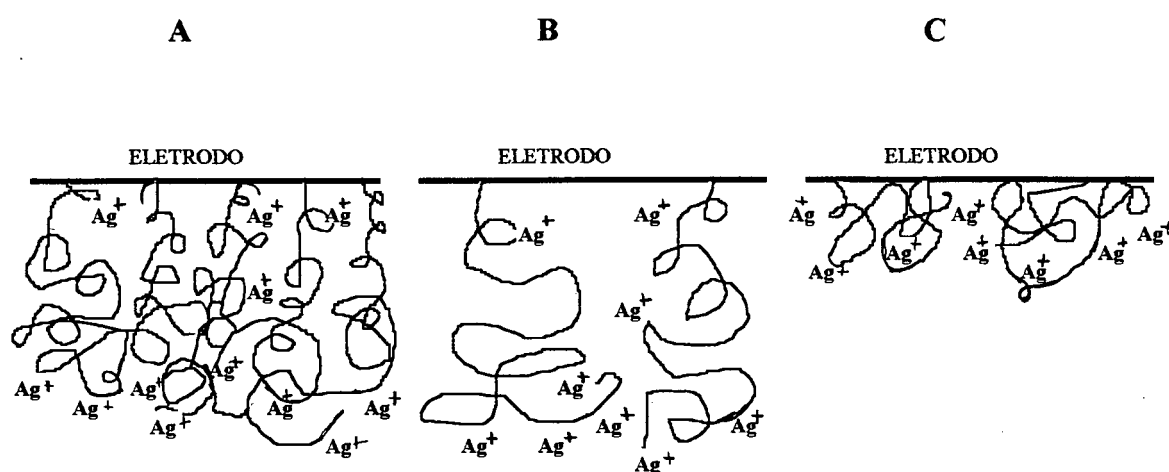


Figura 43. Modelo estrutural para a superfície do eletrodo de carbono vítreo modificado por quitosana e condicionado em solução de prata. A- Antes do polimento: estruturas rígidas acarretam pequena quantidade de prata na superfície eletródica. B- Após polimento: menor quantidade de material resistivo e liberdade conformacional. C- Após aplicação de potencial negativo: maior quantidade de íons prata torna-se eletroativa.

O processo catódico na camada espessa seria mais lento e originaria picos múltiplos, não só devido à formação acoplada de microcristais de prata, mas também porque, à medida que o eletrodo torna-se mais negativo, os íons de Ag^+ de regiões mais remotas seriam forçados a migrar para a superfície do eletrodo, reduzindo-se em momentos diferentes. Uma vez acumulados na superfície do eletrodo, os átomos de Ag^0 se oxidam rapidamente. Por este motivo, há o pico muito aguçado na região anódica e na catódica, não. Finalmente, os picos que desaparecem e depois retornam, podem ser explicados admitindo que, na escala de tempo em que se dá uma voltametria a 50mV s^{-1} , os íons prata, reduzidos na superfície do eletrodo, tendem a se difundir para a solução como Ag^0 , devido ao alto gradiente de concentração desta espécie e ao fato de que, como espécie neutra, não pode ser efetivamente acumulada pelo polímero quelante. Assim, com os ciclos sucessivos, os picos tenderiam a perder intensidade. Todavia, como a camada de polímero seria espessa, ainda haveria prata em regiões remotas e, pelo repouso, tendendo a eliminar o gradiente de concentração de Ag^+ na matriz polimérica, haveria migração destes íons para a superfície eletródica. Varrendo-se o potencial após repouso, os picos poderiam reaparecer. Verificou-se que tal fenômeno não ocorria quando o eletrodo sofria polimento para retirar o excesso de quitosana imobilizada antes de ser imerso em solução de prata.

Sínteses *ex situ*

As sínteses realizadas em meio homogêneo *ex situ* conduziram a um polímero redox, sob vários aspectos, interessante. O grau de hidroflicidade aumentou em relação à quitosana, pois ao longo da reação, normalmente conduzida em pH 6, verificou-se a dissolução da porção de quitosana que no, início, apresentava-se como um sólido fino. Além disto, mesmo em pH 7 o novo polímero era perfeitamente solúvel indicando que a incorporação de grupos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$ tornava o polímero catiônico independente do pH. O próprio espontâneo abaixamento do pH (de 1 a 2 unidades ao término da reação) revelava que os grupos amina protonados na matriz polimérica substituíam seus prótons pelo centro metálico do complexo. Como consequência disto, pareceu efetivo o acoplamento do polímero redox QTS- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$ à glicose oxidase, o que foi avaliado usando-se algumas gotas da solução proveniente da purificação por diálise. Sobre esta gotejou-se, lentamente, solução de glicose oxidase (aprox. 1mg/mL de tampão 7). Observou-se nitidamente que,

após algumas gotas, houve precipitação, indicando aquisição de ponto isoeletrico, só possível se as duas macromoléculas portassem cargas contrárias.

Infelizmente, o grau de rutenação alcançado no polímero QTS-[Ru(bpy)₂Cl]⁺ não foi elevado, ficando em torno de 2%, insuficientes para produzir um comportamento eletroquímico de boa qualidade. Como mostra o voltamograma da Figura 44, a queda ôhmica ocasionada pela matriz polimérica é alta, a julgar pelo deslocamento dos potenciais de pico (em todos os casos, pelo menos 100mV) e as correntes de pico, relativamente ao fundo, são baixas.

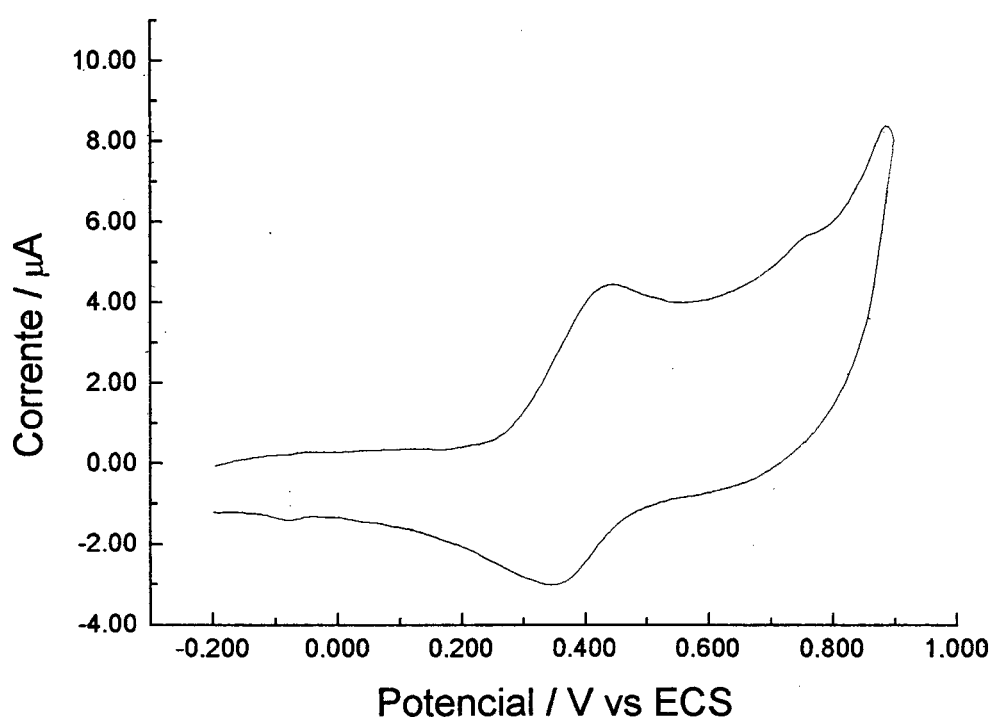


Figura 44. Voltamograma do polímero redox QTS-[Ru(bpy)₂Cl]⁺. Eletrodo de trabalho de ouro sobre o qual foi evaporada solução do polímero redox obtido através da síntese *ex situ* aquosa. Eletrólito de suporte de KCl 0,1 mol L⁻¹ em pH 7 e contra-eletrodo de platina. Velocidade de varredura de 50 mVs⁻¹. Registrado o primeiro ciclo.

Não foi possível aumentar o rendimento da reação. O aumento do tempo e/ou temperatura não conduziu a melhoras, devido à degradação do polímero. Esta afirmação está apoiada na observação de que, fora do saco de diálise, encontrou-se indícios (discutidos adiante) da presença de oligômeros de quitosana substituídos por rutênio. O excesso de complexo também não foi efetivo. Em todas as situações em que o complexo estava em

excesso em relação às unidades monoméricas de quitosana, surgia uma reação paralela, originando um composto verde. A julgar pelas indicações fornecidas pela literatura¹¹⁰, pode tratar-se de uma espécie binuclear de rutênio II e III. O Ru III seria gerado por traços de O₂ ou de Ag⁺ no meio reacional. Mesmo na mistura equimolar, as reações realizadas com tempo superiores a 24 horas, formaram um pouco da espécie verde. Realmente, não conduziu a um maior grau de rutenação qualquer outra condição que se afastasse da mistura equimolar, um tempo de 5 horas e a temperatura de 70°C.

A espectroscopia na região do UV-Vis (Figura 45) foi útil como acessório na avaliação do grau de rutenação e para evidenciar a degradação do polímero quando recorreu-se à condições mais energéticas de reação (tal como exposto acima).

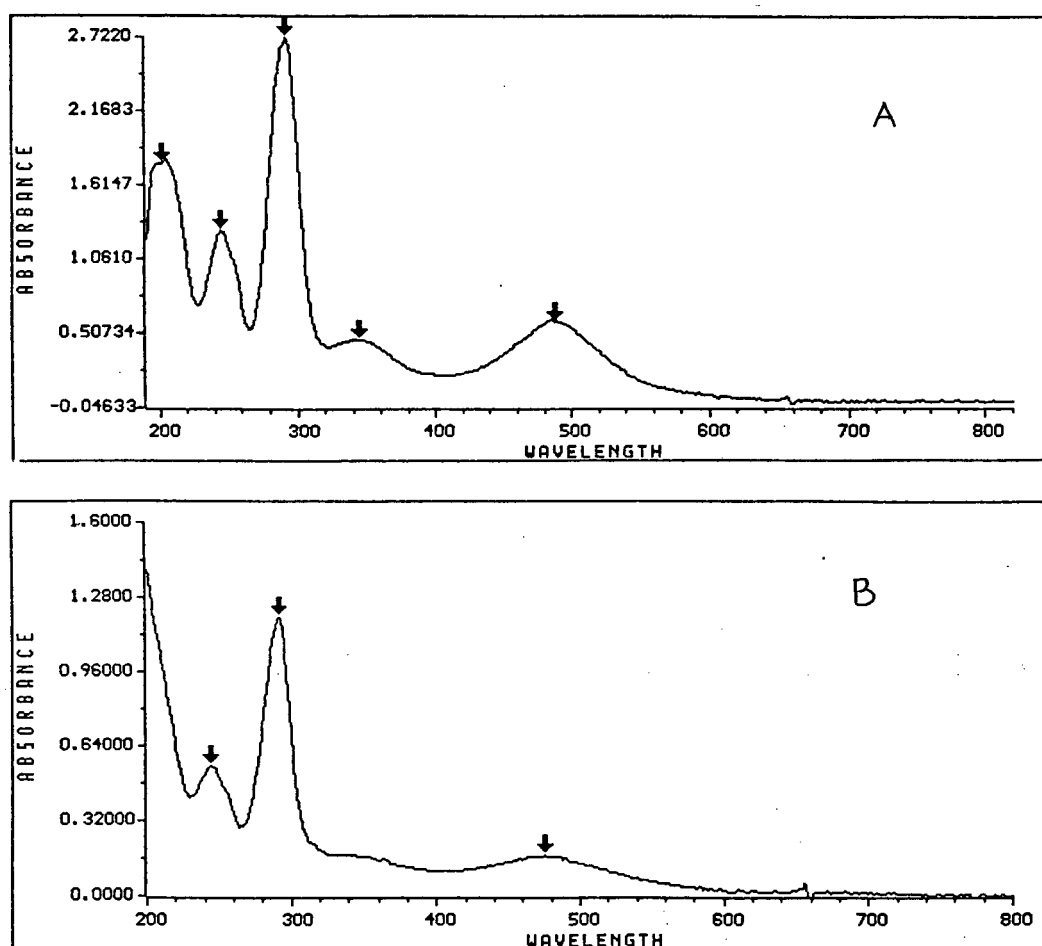


Figura 45. Espectros de absorção molecular em UV-Vis para as espécies pertinentes à síntese *ex situ* aquosa. A- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ClOH}_2]^+$ (reagente). B- $\text{QTS}-[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$ (produto). Absorvâncias medidas contra um branco de água.

Os espectros da Figura 45 mostram que, praticamente, não há diferença no $\lambda_{\text{máx}}$ das bandas de absorção no visível para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ClOH}_2]^+$ e $\text{QTS}-[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$, situando-se na faixa de 482 ± 6 nm, determinando para estas espécies a cor vermelha. A espécie verde apresenta banda no visível a um $\lambda_{\text{máx}}$ na faixa de 648 ± 6 nm. Quitosana não absorve no visível, apresentando uma banda forte no UV em torno de 190 nm (provavelmente associada a $-\text{OH}^{111}$). Algumas sínteses conduziram a uma solução marron, mas a separação cromatográfica circular em papel de filtro mostrou que se tratava de mistura das espécies vermelha e verde. Como o complexo não ligado permeia, facilmente, a membrana dialítica, a intensidade da banda a 482 ± 6 nm no dialisado, prestou-se para avaliar o grau de rutenação de uma forma relativa, porém rápida e a um custo bem menor que a espectrometria de massas. Assim foram comparadas as absorvâncias, obtidas em condições idênticas, dos polímeros redox purificados provenientes de reações realizadas a diferentes tempos e temperaturas. Foi este estudo que evidenciou absorvâncias **menores**, à medida ~~que~~ o tempo de reação ia além de 5h, indicando degradação do polímero formado e perda dos oligômeros através da membrana dialítica. Uma indicação extra da ocorrência deste processo foi fornecida pelo aparecimento da banda a 192nm (presente na quitosana e ausente no complexo) na solução **fora** do saco de diálise.

A fim de evitar a reação colateral que originava a espécie verde, e buscar um maior grau de rutenação, tentou-se a reação polímero + complexo em meio não-aquoso. Realmente, partindo de $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ dissolvido em dimetilacetamida, não se formou a espécie verde. Mas a quitosana não é solúvel neste meio, tendo sido a reação acompanhada pelo gradual coramento de vermelho dos grãos do polímero. Infelizmente os grãos de polímero rutenado produzidos não eram solúveis em água ou ácidos diluídos. Provavelmente, na matriz envelada a reação se processou entre uma grande quantidade efetiva de polímero e uma pequena quantidade efetiva de complexo. Neste caso, deve ter sido favorecida a substituição de 2 cloros do complexo, provocando a reticulação do polímero. Portanto, a estratégia de suspender quitosana em meio não-aquoso e reagí-la com um complexo dotado de duas posições reativas, revelou-se inadequada, se aquilo que se pretende é um polímero altamente hidrofílico.

111. Brode, W.R. - Chemical Spectroscopy. John Wiley & sons Inc. New York, 1943.

Sínteses *in situ*

A impossibilidade de imobilizar os polímeros de quitosana por adsorção na superfície dos eletrodos de grafite e carbono vítreo, determinou o ancoramento covalente como etapa obrigatória na obtenção destes eletrodos modificados. Isto foi tentado por duas vias: realizando a própria síntese na ponta do eletrodo, onde já se encontrava o polímero (*in situ*), ou ancorar o polímero redox pronto (valendo-se dos grupos NH_2 remanescentes na matriz polimérica). O primeiro estudo foi em meio aquoso, com quitosana previamente ancorada na superfície de carbono vítreo. O voltamograma resultante está apresentado na Figura 46.

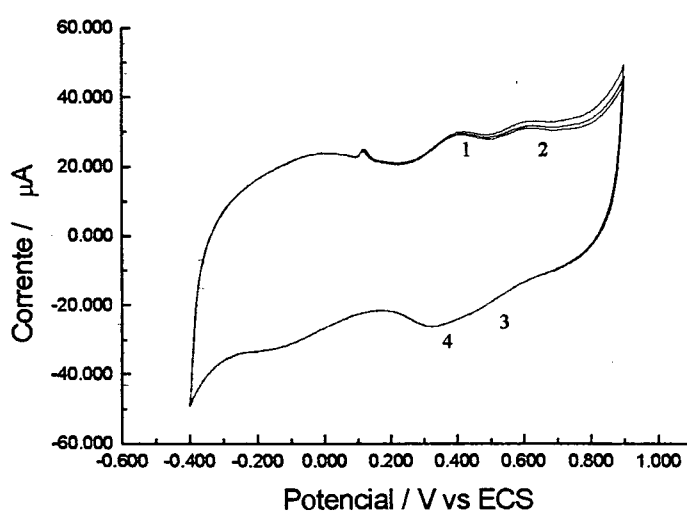


Figura 46. Voltamograma após síntese *in situ* em meio aquoso. Eletrodo de carbono vítreo contendo quitosana ancorada covalentemente foi reagido com $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ClOH}_2]^+$. Contra-eletrodo de platina e eletrólito de suporte de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7. Velocidade de varredura de 300 mVs^{-1} . Estão registrados os cinco primeiros ciclos.

No voltamograma da Figura 46 as ondas 1 e 4 parecem pertencer ao polímero redox e o fato de serem estáveis à medida que o potencial é ciclado, revela que houve efetivo ancoramento. As ondas 2 e 3, cujas correntes anódicas diminuem com os sucessivos ciclos, devem ser associadas ao complexo não ligado à matriz, que, aos poucos, se difunde para o meio da solução do eletrólito de suporte. Pode-se observar que, embora efetivamente ancorado, o polímero redox gerou correntes muito baixas em relação ao fundo. Diversas

tentativas foram realizadas para melhorar estes sinais por condições mais energéticas de reação, mas elas não conduziram a resultados melhores que o mostrado na Figura 46.

O segundo estudo foi realizado com $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ em DMA reagindo com a quitosana covalentemente ancorada sobre carbono vítreo. O voltamograma da Figura 47 foi obtido com este eletrodo.

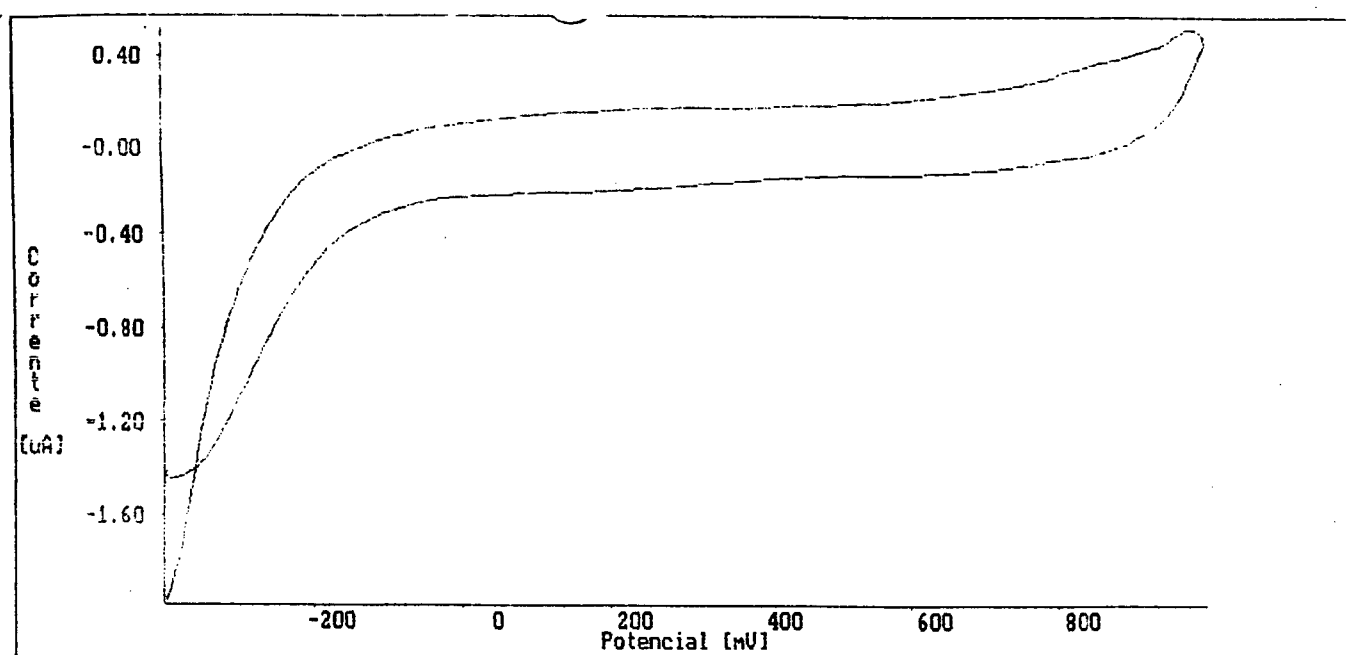


Figura 47. Voltamograma após síntese *in situ* em meio orgânico. Eletrodo de carbono vítreo contendo quitosana ancorada covalentemente foi reagido com $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ em DMA. Contra-eletrodo de platina e eletrólito de suporte de NH_4Cl $0,1\text{mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 10mVs^{-1} . Está registrado o primeiro ciclo. Referência: ECS.

O voltamograma da Figura 47 não apresenta correntes faradaicas que possam ser associadas ao rutênio. Uma possível explicação para o insucesso destas duas sínteses seria

atribuir as correntes baixas ou inexistentes a uma quantidade muito elevada de quitosana na superfície eletródica, que, como já foi exposto, acarreta alta resistividade.

O primeiro estudo de síntese *in situ* com ciclagem de potenciais, foi feito na microcélula contendo $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ClOH}_2^+$. Como o pH foi ajustado em 7, a quitosana aplicada por evaporação na superfície do eletrodo de platina não migrava com facilidade para a solução. O voltamograma da Figura 48 parece evidenciar reação acoplada e não mudou de aspecto no decorrer das duas horas em que se efetuou o experimento.

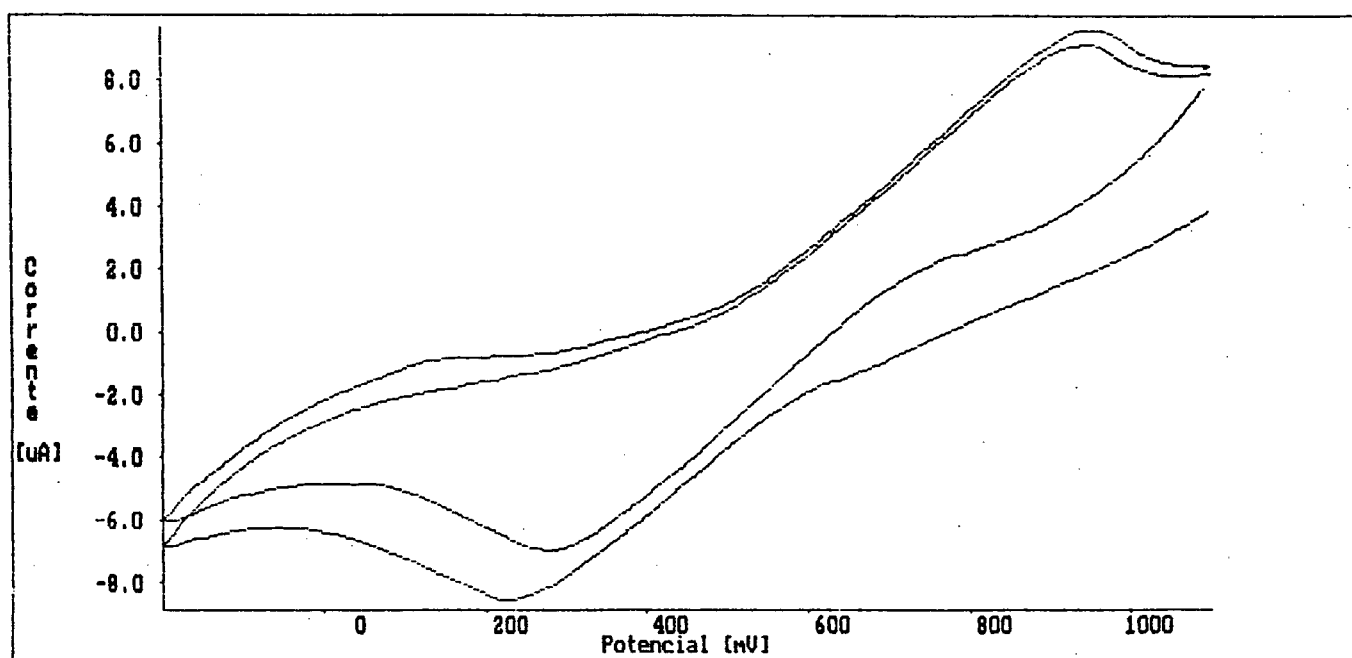


Figura 48. Voltamograma durante a síntese aquosa *in situ*. Eletrodo de platina contendo filme de quitosana foi mergulhado em eletrólito de suporte de KClO_4 , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ClOH}_2]^+$. Contra-eletrodo de platina. Velocidade de varredura de 20 mVs^{-1} . Estão registrados os dois primeiros ciclos. Antes da varredura manteve-se o potencial em $1,1 \text{ V}$ durante 1000 segundos. Referência: ECS.

Realmente, ao término do experimento, o conteúdo da microcélula estava nitidamente verde, revelando, de novo, ocorrência da reação que, possivelmente, produz a espécie binuclear de Ru II e III, desta vez através da oxidação eletroquímica do rutênio. Como se verifica no voltamograma da Figura 48, não houve indícios eletroquímicos do aparecimento de uma nova espécie ligada à quitosana.

Uma segunda tentativa foi feita em meio aquoso, porém, evitando que o complexo ficasse em solução, em região afastada em relação ao polímero, misturou-se antes, complexo e polímero e, então, aplicou-se a mistura assim preparada sobre eletrodo de ouro. O voltamograma da Figura 49 mostra os cinco primeiros ciclos obtidos neste experimento.

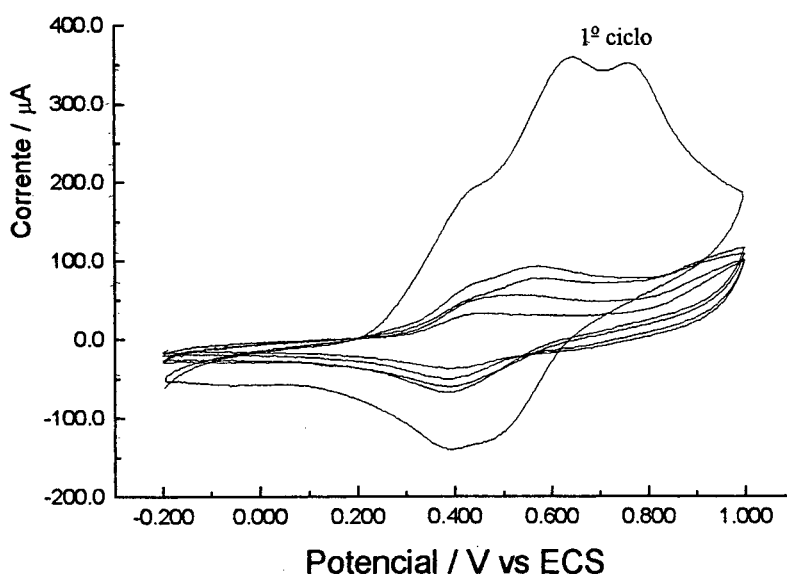


Figura 49. Voltamograma durante a síntese aquosa *in situ*. Eletrodo de trabalho de ouro contendo filme de quitosana misturada a $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ClOH}_2]^+$. Eletrólito de suporte de KCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$. Contra-eletrodo de platina. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Estão registrados os cinco primeiros ciclos. As correntes caíram com o tempo, devido à dissolução do polímero na superfície do eletrodo de trabalho.

As ondas anódicas de maior intensidade do primeiro ciclo estão na região mais ou menos esperada para o complexo não ligado, mas os potenciais de pico do último ciclo são muito próximos daqueles obtidos para o polímero redox da síntese *ex situ* aquosa. Isto pode ser melhor observado na Figura 50, na qual estão sobrepostos os voltamogramas do quinto

ciclo deste experimento e o voltamograma da Figura 44, obtido quando o polímero redox da síntese *ex situ* foi aplicado por evaporação sobre eletrodo de ouro.

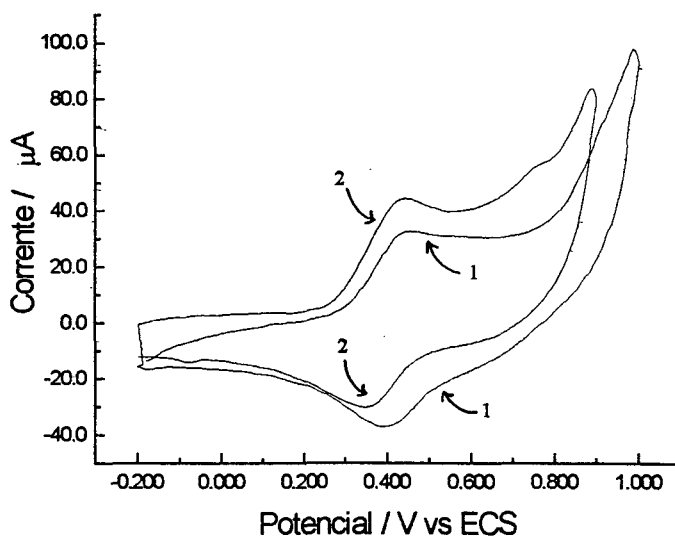


Figura 50. Sobreposição do voltamograma do quinto ciclo da Figura 49 (1) com o voltamograma da Figura 44 (2). A semelhança entre os dois parece indicar semelhanças entre as espécies químicas obtidas nas sínteses *ex situ* e *in situ*.

Este resultado parece indicar a possibilidade de obtenção do polímero redox, a temperatura ambiente e em tempos inferiores aos requeridos na síntese *ex situ*, através da geração *in situ* de Ru III. Infelizmente, mais uma vez ficou claro, pelas quedas das correntes com os ciclos sucessivos, que não houve efetiva imobilização adsorptiva do material polimérico sobre o eletrodo metálico, inviabilizando a obtenção de um eletrodo modificado de bom desempenho.

Como a quitosana manifestou-se insolúvel em dimetilformamida (que dissolve bem o complexo $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$), tentou-se repetir a síntese *in situ* neste meio, objetivando-se, assim, evitar que as correntes viessem a cair com a ciclagem de potenciais. Este estudo está referido na página 104 como a “terceira tentativa” de síntese *in situ* pela ciclagem de potenciais. O voltamograma da Figura 51 foi registrado após 4 horas, ciclando o potencial à temperatura ambiente. Tal como esperado, ao contrário do estudo anterior, este voltamograma não mudou na escala de tempo de cinco ciclos.

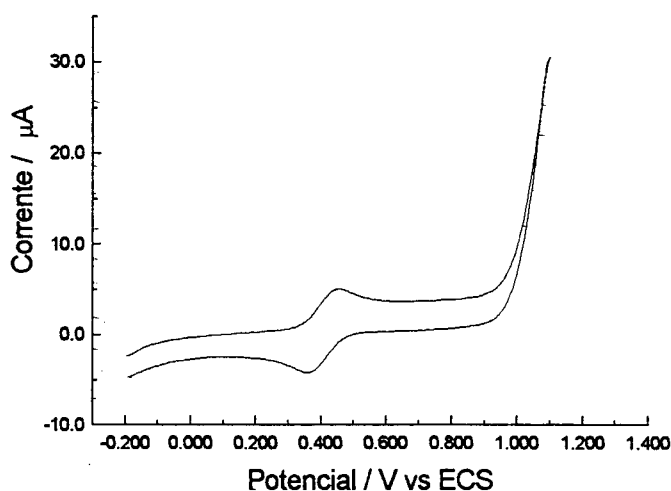


Figura 51. Voltamograma durante a síntese *in situ* em DMA. Eletrodo de trabalho de platina contendo filme de quitosana imerso em DMA+Ru(bpy)₂Cl₂, em microcélula. Eletrólitos de suporte: LiCl 0,1mol L⁻¹ (dentro da microcélula) e KClO₄ 0,1mol L⁻¹ (fora da microcélula). Contra-eletrodo de platina. Velocidade de varredura de 100mV s⁻¹. Está registrado o primeiro ciclo. As correntes não decresceram com o tempo.

Em essência, este voltamograma é o mesmo que o obtido na síntese *ex situ* aquosa (Figura 44). Isto permite inferir que a espécie produzida na superfície do eletrodo é o polímero redox QTS-[Ru(bpy)₂Cl]⁺. Novamente, é bastante interessante notar que a síntese pôde ser realizada em DMA, à temperatura ambiente e em tempos relativamente curtos, quando houve a geração *in situ* de Ru III.

Para mostrar como evoluiu esta síntese, a Figura 52 mostra, sobrepostos, o primeiro e o último ciclo (quatro horas depois). Coerentemente, no primeiro ciclo, as ondas catódica e anódica foram muito discretas e com grande deslocamento de potenciais de pico, decorrente da queda ôhmica na matriz polimérica ainda muito pouco rutenada.

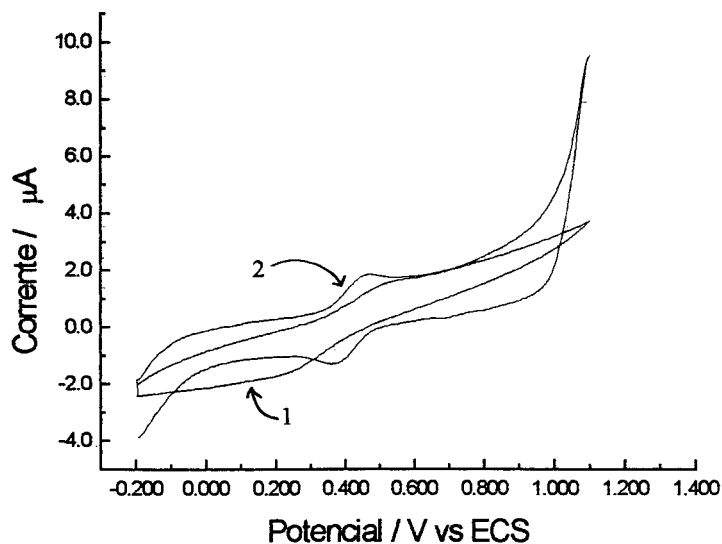


Figura 52. Sobreposição do primeiro voltamograma (1) com aquele obtido após 4h (2), na síntese *in situ* em DMA. Condições descritas na Figura 51.

Como o polímero redox obtido desta maneira, sobre eletrodo de platina, não poderia ser transferido para meio aquoso sem provocar a dissolução do filme eletroativo, tentou-se reproduzir estas sínteses *in situ* usando-se eletrodos de carbono vítreo sobre os quais se havia imobilizado covalentemente quitosana. Tais estudos não conduziram a sinais eletroquímicos que se pudessem distinguir das correntes de fundo. Pode-se admitir a possibilidade de que isto tenha ocorrido por conta de uma quantidade excessiva de material polimérico na superfície do eletrodo.

A segunda estratégia mencionada para obter o polímero na superfície do eletrodo, consistiu em imobilizar o polímero redox obtido *ex situ*. Inicialmente, foram usadas para o polímero redox as manobras de imobilização da quitosana com DCC. Diversas tentativas foram realizadas sem que se obtivesse, no eletrodo resultante, qualquer sinal eletroquímico que se pudesse atribuir ao rutênio. Finalmente, tentou-se co-reticular o polímero redox, já pronto via síntese *ex situ*, e quitosana imobilizada na superfície de um eletrodo de carbono vítreo. O voltamograma da Figura 53 foi obtido após esta co-reticulação.

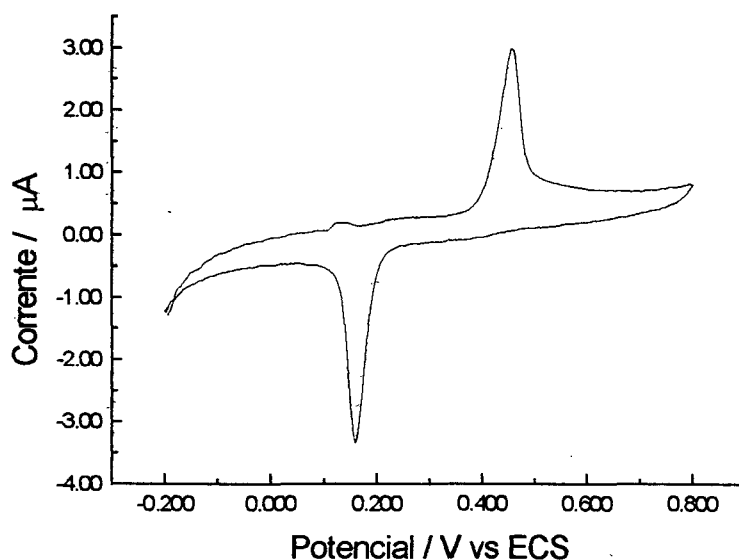


Figura 53. Voltamograma do polímero redox QTS-[Ru(bpy)₂Cl]⁺ reticulado à superfície de eletrodo. Sobre eletrodo de trabalho de carbono vítreo, contendo quitosana ligada covalentemente, evaporou-se solução do polímero redox obtido *ex situ* e se reticulou com glutaraldeído. Eletrólito de suporte de NH₄Cl 0,05mol L⁻¹. Contra-eletrodo de platina. Velocidade de varredura de 50mVs⁻¹. Está registrado o primeiro ciclo.

O voltamograma da Figura 53 mostra correntes bem destacadas em relação ao sinal de fundo mas o deslocamento dos potenciais de pico é muito grande: quase 300mV! Isto significa uma irreversibilidade tal que impede o eletrodo modificado de atuar eletrocataliticamente, inviabilizando este processo de imobilização. Observe-se que, o deslocamento de potencial verificou-se praticamente apenas na região catódica, encontrando-se o pico anódico, essencialmente, no mesmo valor que o voltamograma da Figura 44. Por algum motivo a reticulação afetou a energia necessária ao processo de redução de modo muito mais intenso que ao de oxidação.

A fim de verificar como seria a resposta de um biossensor que tivesse como mediador o polímero redox sintetizado *ex situ*, montou-se um protótipo tal como se descreveu na página 103. Os voltamogramas da Figura 54 mostram a diferença para a solução sem glicose e com glicose.

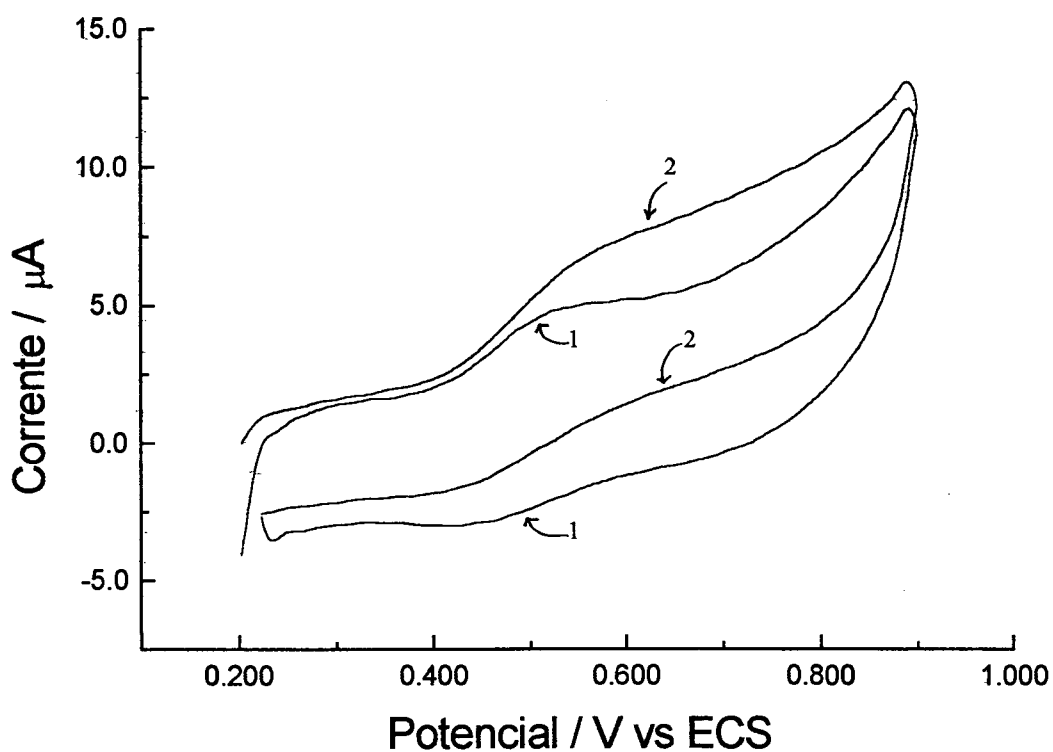


Figura 54. Protótipo de biossensor e sua resposta à glicose. Eletrodo de trabalho de ouro contendo filme do polímero redox QTS- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$ e glicose oxidase co-reticulada. Eletrólito de suporte de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7. Contra-eletrodo de platina. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Voltamograma “1” antes, e “2” depois, da adição de glicose.

Pode-se verificar na Figura 54 um aumento de $2,31 \mu\text{A}$ na corrente anódica, lida a aproximadamente 600 mV , quando se adiciona glicose em meio aeróbico. Em meio anaeróbico, o aumento foi de apenas $0,85 \mu\text{A}$, mas este resultado foi claramente afetado pela gradual perda do filme eletródico para a solução de pH 7. Estes resultados, embora precários, indicam que a obtenção de um biossensor para glicose com polímero redox de quitosana é possível, desde que se consiga imobilizá-lo de modo efetivo na superfície do eletrodo.

2.3.3 – Conclusões

1. Um polímero redox catiônico com matriz de quitosana, solúvel em meio neutro com centro mediador de $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}^+$ e perfeitamente acoplável à glicose pode ser obtido reagindo-se por 5h à temperatura de 70°C uma solução aquosa de quitosana contendo $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ClOH}_2^+$, com pH em torno de 6.

2. Alternativamente, o polímero redox pode ser produzido na própria superfície do eletrodo se solução de quitosana for ali evaporada e o eletrodo for imerso em solução de $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ (em dimetilacetamida) e for aplicado um potencial que seja capaz de, eletroquimicamente, gerar Ru III.

3. O grau de rutenação alcançado nestas sínteses é baixo, fazendo com que, devido à queda ôhmica, os potenciais de pico obtidos em voltametria cíclica, estejam deslocados de, no mínimo, 100mV.

4. A imobilização do polímero redox sobre a superfície do eletrodo permanece problemática, considerando que não se conseguiu alcançar um bom sinal eletroquímico via ancoramento covalente do polímero redox pronto, nem tampouco reagindo a quitosana previamente ancorada covalentemente na superfície do eletrodo.

5. Desenvolver um modo de controlar a quantidade de quitosana que se imobiliza covalentemente na superfície do eletrodo de carbono vítreo, mostrou-se fundamental, pois o excesso é nitidamente prejudicial. Tal objetivo pode ser alcançado pelo teste Ag (descrito na página 100) e polindo-se gradualmente o eletrodo modificado por quitosana.

Tais conclusões determinaram o redirecionamento do trabalho, no sentido de obter um novo polímero redox, que produzisse um voltamograma cíclico mais próximo da ausência de deslocamento dos potenciais de pico, correntes intensas e estáveis. Procurou-se um complexo cujo centro metálico fosse de Ru III, mais duro que Ru II, portanto, em princípio, mais favorável para a reação com quitosana. Secundariamente, buscou-se um ligante que fosse mais duro que bipyridina, a fim de baixar o valor de $E_{1/2}$, considerando que mediadores com potenciais redox menores estão menos sujeitos à interferências. A escolha recaiu sobre $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$. O fato deste complexo possuir apenas uma posição lábil também é interessante pois, evitam-se os casos de reticulação indesejável e de geração de picos voltamétricos múltiplos (associados às espécies mono e di-substituídas).

2.4- Síntese de um polímero redox por reação de QTS com $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$ e sua resposta voltamétrica a oxigênio.

Basicamente, a síntese *ex situ* aquosa seguiu a mesma estratégia descrita para $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$: após remoção por prata do cloro da esfera de coordenação, o complexo foi reagido com solução aquosa de quitosana. A reação foi conduzida em pH 3 e em pH 5 e acompanhada por espectroscopia na região do ultravioleta, que permitiu avaliar o rendimento relativo nos dois casos. Após purificação por diálise, o rendimento absoluto foi avaliado pelo grau de rutenação, via espectrometria de massas. Além das quantidades estequiométricas de polímero e complexo (mistura equimolar complexo : unidade monomérica de quitosana), experimentou-se sintetizar o polímero redox com excesso de complexo, visando a alcançar um maior grau de rutenação. Uma titulação potenciométrica foi feita, neutralizando os grupos NH_3^+ do polímero redox acidulado, com o propósito de avaliar a quantidade de grupos ligantes NH_2 remanescentes após síntese. A solução do polímero redox obtido foi evaporada sobre a superfície de eletrodo metálico e o comportamento eletroquímico avaliado por voltametria cíclica. O polímero redox obtido *ex situ* e purificado foi ancorado covalentemente sobre carbono vítreo. O comportamento eletroquímico do eletrodo assim modificado e sua resposta a oxigênio foram estudados por voltametria cíclica. Comparou-se a resposta voltamétrica a oxigênio dissolvido, obtida por eletrodos de carbono (carbono vítreo, pasta de carbono e epóxi grafitada) não modificados e modificados pelo polímero redox QTS- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{2+/3+}$. Este estudo foi feito para verificar a vantagem obtida pelo uso dos eletrodos modificados na detecção de oxigênio.

2.4.1-Experimental

A água, solventes orgânicos e reagentes analíticos utilizados nesta etapa foram tal como se descreveu nas seções anteriores 2.2.1 e 2.3.1. A resina epóxi, sempre que citada, foi Araldite de secagem normal. O complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$ foi adquirido da firma Aldrich e usado tal como recebido.

Sistema eletroquímico

Os eletrodos não modificados necessários, e o potenciostato utilizados nesta etapa foram tais como se descreveu nas seções 2.2.1 e 2.3.1. Os eletrólitos de suporte foram:

solução de KCl 0,1mol L⁻¹ em água, ou solução aquosa de KOH (em concentração necessária para assegurar um pH entre 12 e 13). Todas as desaerações das soluções de eletrólito foram realizadas através de borbulhamento de nitrogênio ou argônio, por tempos variáveis de um minuto até meia hora. A saturação do eletrólito de suporte com oxigênio foi feita borbulhando-se ar proveniente de um pequeno compressor de uso médico (marca ns modelo st3), durante 15 minutos.

Eletródos modificados

Eletrodo de ouro com filme de polímero redox. Oito porções da solução de polímero redox purificado, de 10μL cada uma, foram evaporadas sobre a superfície de um eletrodo de

ouro polido e tratado por ultrassom. Usando eletrólito de suporte de KCl 0,1mol L⁻¹ aquoso, com pH 7 e perfeitamente desaerado, varreu-se o potencial de -0,6V até 0,4V a 50mV s⁻¹, registrando-se o voltamograma do primeiro ciclo.

Eletrodo de carbono vítreo oxidado. Seguiu-se exatamente o processo de Jinrui e Bin²⁴. Inicialmente, um eletrodo de carbono vítreo foi polido, imerso em banho de ultrassom e seco ao ar. Uma mistura oxidante foi preparada com 0,45g de KMnO₄ + 0,03g de KNO₃ + 4mL de H₂SO₄ concentrado. Nesta solução verde foi imersa a superfície do eletrodo de carbono vítreo, e, sob temperatura ambiente, aguardou-se 30 minutos, após o que se considera que a superfície esteja rica em grupamentos carboxila. Lavou-se rapidamente com água e deixou-se em H₂O₂ 3% m/m, a fim de remover os resíduos de compostos de manganês. Finalmente, lavou-se com água.

Eletrodo de carbono vítreo modificado pelo polímero redox QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+}. Modificou-se ligeiramente o processo da DCC, descrito na seção 2.3. Sobre a superfície do eletrodo oxidado aplicaram-se 10μL da solução do polímero QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+} (este volume corresponde a 0,04 μg de Ru). Deixou-se evaporar o solvente (água) ao ar e, em seguida, manteve-se o eletrodo em um pequeno dessecador contendo sílica-gel por 2h. A superfície do eletrodo foi então imersa em uma solução de 0,1g de dicitlohexilcarbodiimida em 0,5mL de dimetilacetamida (DMA) e 0,5mL de acetonitrila. Manteve-se a reação por 3h no interior do pequeno dessecador. Após isto,

lavou-se a superfície do eletrodo, sucessivamente com: DMA; etanol; água; ácido acético 2%*m/v* e água.

Eletrodo de pasta de carbono modificado pelo polímero redox QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+}. Em semimicro béquer de polietileno, sobre 40mg de grafite eletroquímico marca Fischer depositaram-se 60μL da solução do polímero redox proveniente da diálise (este volume corresponde a 0,24μg de Ru). Após homogeneização, a pasta resultante foi deixada, a temperatura ambiente, por 12h em um pequeno dessecador sobre sílica gel. Ao grafite modificado e completamente seco foram perfeitamente misturados 16μL de óleo mineral Nujol. A pasta foi aplicada na cavidade de um eletrodo e a superfície eletródica (com área geométrica de 4,9mm²) polida por suaves movimentos em uma folha de papel para impressoras a jato de tinta (Chamex Premium 90g m⁻²).

Eletrodo de epóxi + grafite oxidado. Preparou-se um eletrodo de epóxi grafitada não modificado. Paralelamente a esta preparação, oxidou-se o grafite que constituiria a superfície do eletrodo. Para tanto, preparou-se uma mistura com 0,45g de KMnO₄ + 0,03g de KNO₃ + 40mL de H₂SO₄ concentrado. A 20mL desta mistura verde foram adicionados 0,25g de grafite Aldrich 1-2μm. Manteve-se agitação por 30 segundos e verteu-se a mistura em 500mL de água para interromper a reação. A adição de água mudou a cor de verde para púrpura. Adicionou-se, aos poucos, H₂O₂ 3%*m/m* até completo descoramento que garante eliminação do permanganato. Centrifugou-se a 3000rpm durante 6 minutos, eliminando-se o sobrenadante. Lavou-se o precipitado por centrifugação até que as águas de lavagem fornecessem uma condutividade de 1μS cm⁻¹. O grafite, assim oxidado, foi seco em estufa a 110°C por 1h e reservado em dessecador. A superfície do eletrodo, contendo grafite oxidado, foi preparada de acordo com as indicações fornecidas na literatura¹¹³ para grafite não modificado. Foram intimamente misturados, 56mg de grafite oxidado com 44mg de resina epóxi (apenas o adesivo). Desta pasta foi aplicada uma fina camada sobre o eletrodo de epóxi grafitada recém preparado (a preparação recente do eletrodo base mostrou-se importante para promover uma perfeita aderência do material da superfície). Deixou-se a superfície do eletrodo 5 minutos em contato com vapores de HF 40%*m/m*, seguido de aquecimento entre 50-60°C durante 5 minutos. Aplicou-se uma nova fina camada da pasta de epóxi + grafite oxidado e repetiu-se tratamento por HF e aquecimento. Uma terceira

camada foi aplicada e reticulada por HF. Lavou-se o eletrodo com água em abundância, secou-se e deu-se polimento, esfregando a superfície do eletrodo em papel para impressoras a jato de tinta (Chamex Premium 90g m⁻²).

Eletrodo de epoxi grafitada modificado pelo polímero redox QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+}. Este foi preparado exatamente como se descreveu para carbono vítreo, usando, todavia, o eletrodo de epoxi + grafite oxidado, descrito no parágrafo anterior.

Eletrodo de pasta de carbono oxidado. Este foi preparado exatamente como se descreveu para pasta de carbono sem modificações, usando todavia o grafite oxidado.

Síntese dos polímeros redox *ex situ* em meio homogêneo (aquoso)

A reação, com quantidades equimolares de unidades monoméricas de quitosana e complexo, foi feita adaptando-se procedimento da literatura¹⁰⁴. Em um microtubo de centrífuga foram adicionados 32,2mg de complexo a 1,2mL de solução aquosa de trifluoroacetato de prata (23,1mg de Ag₂O dissolvidos em 1,2mL de ácido trifluoroacético, HTFA, 2mol L⁻¹). A suspensão resultante foi perfeitamente desaerada por borbulhamento de argônio e deixada em estufa à 70°C durante 1h, com enérgica agitação ocasional. Após a aquação, centrifugou-se a 3000rpm por 3 minutos e separou-se a solução do precipitado de AgCl.

Paralelamente á aquação, 21,1mg de quitosana foram misturados (em béquer de polietileno) a 12 gotas de HTFA a 2 %m/v e uma gota de metanol. A pasta resultante foi agitada vigorosamente com um bastão de polietileno, até que se tornasse perfeitamente homogênea. Adicionou-se, então, 10mL de água a 70°C e misturou-se bem. Este procedimento assegura rápida dissolução do polímero. Desaerou-se esta solução com argônio.

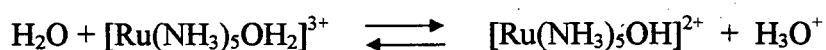
As duas soluções, de complexo e polímero, foram misturadas (em um frasco de teflon dotado de tampa hermética) e o pH cuidadosamente elevado por solução aquosa de KOH, usando-se o próprio eletrodo de vidro para homogeneisar. Parte do polímero tornou-se então, um precipitado muito fino, quase imperceptível visualmente. Após intensa

104. Kuehn, C.G.; Taube, H.- Journal of American Chemical Society 98:3 (1976) 689.

desaeração, o frasco foi lacrado e a reação conduzida a 70°C em ausência de luz, durante 12h.

A escolha do pH apropriado para conduzir a síntese em água envolveu algumas considerações importantes. Do ponto de vista conformacional do polímero, já foi discutido que um pH baixo, como 3, favorece o acesso aos grupos de interesse (página 20). Do ponto de vista da solubilidade do polímero, de igual modo são favoráveis os valores mais baixos de pH. Todavia, com os grupos amins protonados, torna-se necessário ao grupo substituinte competir com a acidez dos prótons deslocando-os da matriz, processo tanto mais difícil quanto menor for o pH. Normalmente, foi considerado um compromisso razoável entre estes limites, justamente o valor do pKa da quitosana, em torno de 6. Mas o complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{OH}_2]^{3+}$, resultante da aquação, introduz novas considerações. Segundo Kuehn e Taube¹⁰⁴, o pKa do complexo monoaquo é 4,2. Portanto, em qualquer pH acima deste valor, o grupo predominante na 6ª posição do complexo será hidroxila e não água. Os autores determinaram que o complexo hidroxilado seria 10^{11} vezes mais estável que o aquado. Isto permitiu concluir que qualquer pH acima do pKa da quitosana seria impróprio, tanto do ponto de vista do polímero (insolubilidade e conformação enovelada), quanto do complexo (grande predomínio de hidroxilas na esfera de coordenação). O pH 3 foi considerado um bom ponto de partida. Um possível valor acima deste foi decidido da seguinte maneira.

Se o pKa do complexo é 4,2, então o Ka é $10^{-4,2}$. Considerando o equilíbrio



da constante, Ka, para este equilíbrio, deduz-se que

$$\frac{a[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{OH}]^{2+}}{a[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{OH}_2]^{3+}} = \frac{10^{-4,2}}{a \text{H}_3\text{O}^+} = 10^{(\text{pH} - 4,2)}$$

Portanto, em pH 4,2 as atividades das duas espécies relacionadas ao complexo são iguais. Fazendo o mesmo para o equilíbrio de desprotonação dos grupos NH_3^+ da quitosana, vem

104. Kuehn, C.G.; Taube, H.- Journal of American Chemical Society 98:3 (1976) 689.

$$\frac{a \text{ QTS-NH}_3^+}{a \text{ QTS-NH}_2} = 10^{(6,3 - \text{pH})}$$

Partindo de uma mistura equimolar entre o complexo e as unidades monoméricas de quitosana, admitiu-se a situação na qual, à medida que a reação prosseguisse, as hidroxilas deslocadas do complexo neutralizariam perfeitamente os prótons deslocados da quitosana, sem alterar o pH inicial. Isto seria satisfeito quando as duas frações acima fossem iguais, ou seja

$$10^{(\text{pH} - 4,2)} = 10^{(6,3 - \text{pH})}$$

O pH que satisfaz esta equação é 5,25.

Desta maneira, a síntese foi conduzida em pH 3 e em pH 5 e o rendimento nos dois casos foi comparado.

Purificação dos polímeros redox

Foi conduzida por diálise, exatamente como descrito na seção 2.3.1 (síntese partindo de $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$).

Determinação do grau de rutenação dos polímeros redox

Em linhas gerais, foi feito exatamente como descrito na seção anterior (síntese partindo de $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$). O grau de rutenação obtido nas diversas tentativas foi comparado através da banda localizada na faixa de $277 \pm 4\text{nm}$. Uma correção tangencial de linha de base foi traçada sobre o espectro. Calculou-se a relação entre a absorvância correspondente ao pico no citado comprimento de onda, lida a partir da linha de base, e a absorvância da linha de base no mesmo comprimento de onda. Admitiu-se que quanto maior esta relação, maior o rendimento da síntese, pois partiu-se de uma mesma mistura reacional. A Figura 55 ilustra este artifício.

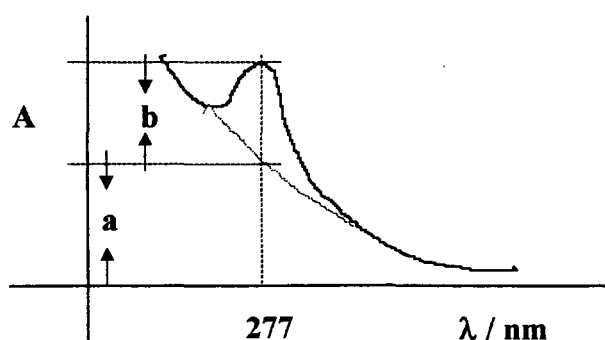


Figura 55. Avaliação do rendimento relativo da reação *ex situ* através da espectroscopia no ultravioleta. A relação b/a é proporcional ao rendimento de reações que partem de iguais concentrações dos reagentes.

Estudo da resposta voltamétrica a oxigênio

Usando como eletrodo de trabalho carbono vítreo modificado pelo polímero redox QTS- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{2+/3+}$ e, em célula de três eletrodos com eletrólito de suporte KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ aquoso (pH 8), varreu-se o potencial de $-0,7\text{V}$ até $0,4\text{V}$ a 50 mV s^{-1} , registrando-se o voltamograma do primeiro ciclo. Repetiu-se este experimento com 4 diferentes graus de desaeração no eletrólito de suporte, controlados por diferentes tempos de borbulhamento de nitrogênio. Os 5 voltamogramas obtidos foram comparados entre si. Repetiu-se este experimento para um mesmo grau de desaeração do eletrólito de suporte, mas ajustado com KOH a valores de pH 10, 12 e 13. Os 4 voltamogramas foram comparados entre si.

Comparação entre as respostas a O_2 dos eletrodos modificados e não modificados.

O eletrólito de suporte usado foi KOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para todos os casos. Com o eletrólito saturado de oxigênio e usando-se carbono vítreo como eletrodo de trabalho, obteve-se um voltamograma, em célula de três eletrodos, varrendo-se o potencial de $+0,200\text{V}$ a $-0,600\text{V}$, a 50 mV s^{-1} . Registrou-se, então, dois parâmetros voltamétricos: o potencial de pico catódico (E_{pc}) e a corrente de pico catódica (i_{pc}). Repetiu-se o mesmo procedimento para o eletrólito completamente desaerado, anotando-se a corrente catódica lida no mesmo valor de potencial de antes. Repetiram-se os dois voltamogramas (eletrólito saturado de O_2 e desaerado) para os eletrodos de carbono vítreo oxidado e carbono vítreo

modificado pelo polímero redox QTS- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{2+/3+}$. Este estudo foi realizado também para os eletrodos de epóxi grafitada, epóxi + grafite oxidado e epóxi grafitada modificado pelo polímero. De igual modo foi feito para os eletrodos de pasta de carbono, pasta de carbono oxidado e pasta de carbono modificado pelo polímero.

2.4.2-Resultados e discussão

Apesar das previsões favoráveis ao complexo de rutênio III em relação ao do rutênio II, a síntese aquosa usando $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{OH}_2]^{3+}$ não conduziu a rendimento superior. O grau de rutenação, obtido por espectrometria de massas, foi de apenas 0,75%.

A solução do polímero redox, apresentou-se amarelada e sua banda característica pode ser observada no espectro da Figura 56.

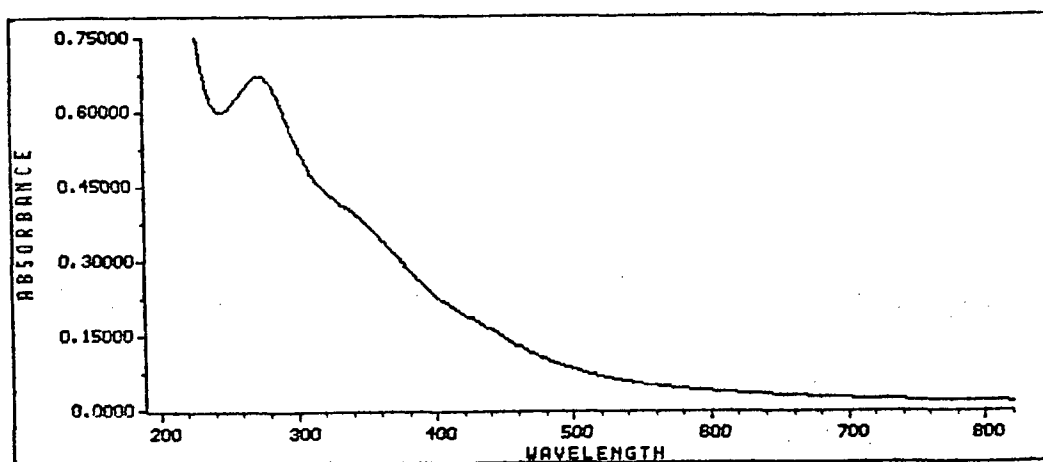


Figura 56. Espectro de absorção molecular do polímero redox QTS- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{3+}$ em meio aquoso na região UV-Vis. Absorvâncias medidas contra branco de água.

As espécies de relevância para a síntese em questão, tem bandas com absorvância máxima em faixas de comprimento de onda indicadas na Tabela 4.

Tabela 4 - $\lambda_{\text{máx}}$ das espécies de rutênio

| Espécie | $\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}$ |
|---|------------------------------------|
| $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5 \text{OH}_2]^{3+}$ | 332 ± 4 440 ± 4 |
| $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5 \text{OH}]^{2+}$ | 300 ± 4 |
| QTS - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{3+}$ | 277 ± 4 440 ± 4 |
| ?? (de cor púrpura) | 546 ± 4 |

Na tabela 4 há alusão a uma espécie de cor púrpura. Ela apareceu apenas no início de algumas sínteses e não foi possível estabelecer sua identidade química. As demais espécies da Tabela 4 têm diferentes tonalidades de amarelo.

O estudo da influência do pH no rendimento da síntese, revelou que o valor 5 é favorável. A relação (citada na Figura 55) entre os segmentos “b” e “a” para o pH 5 forneceu o valor de 0,55 enquanto que para o pH 3 o valor calculado foi 0,48 (13% menor). Parece ser mais difícil deslocar os prótons da matriz polimérica, em pH 3, do que as hidroxilas do complexo, em pH 5.

A Figura 57 mostra o voltamograma obtido por evaporação da solução do polímero redox QTS - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{2+/3+}$, purificado, sobre a superfície de eletrodo de ouro.

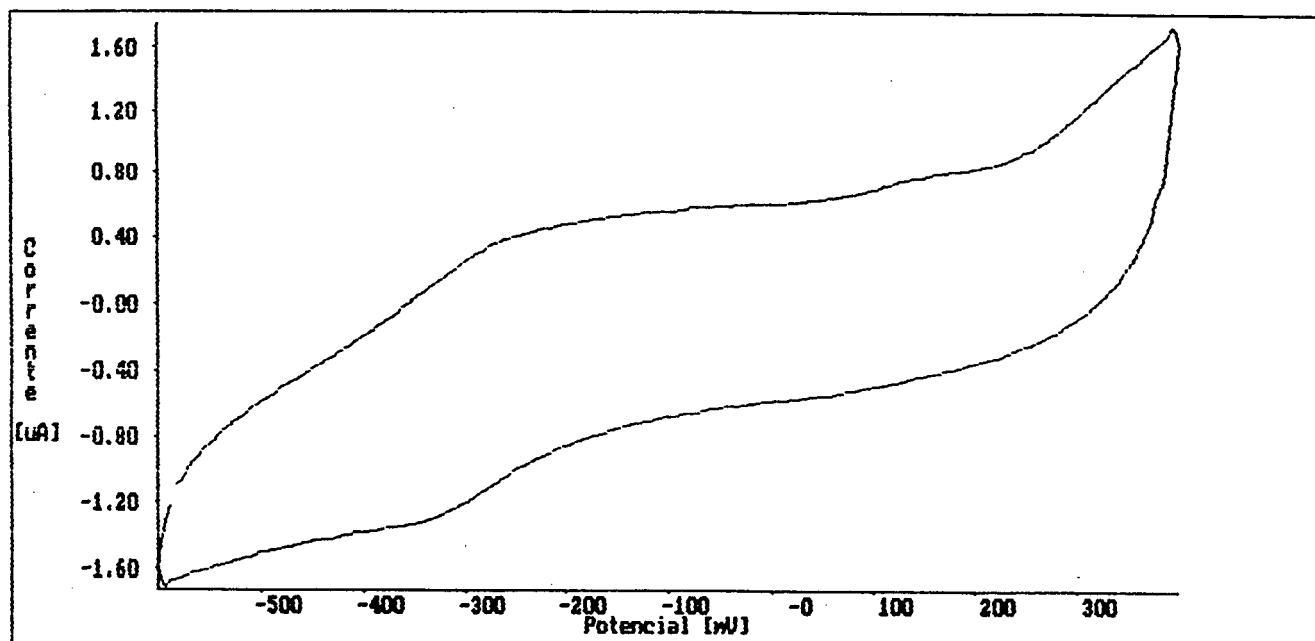


Figura 57. Voltamograma do polímero redox QTS-[Ru(NH₃)₅]^{3+/2+}. Eletrodo de trabalho foi ouro sobre o qual foi evaporada solução do polímero redox obtido *ex situ* em meio aquoso. Contra-eletrodo de platina. Eletrólito de suporte de KCl 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura de 50 mVs⁻¹. Referência: ECS.

Como se pode observar, as correntes de pico foram muito dissimuladas em relação ao fundo, certamente devido ao grau de rutenação bastante baixo. Uma explicação cabal para este voltamograma exigiria estudos intensivos que viessem esclarecer o mecanismo de interação entre o polímero QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+}, o oxigênio e o eletrodo base. Não foi possível ainda realizar tais estudos.

Após purificação e ancoramento covalente do polímero QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+} sobre eletrodo de carbono vítreo, obtiveram-se os voltamogramas sobrepostos na Figura 58, cada um correspondente a um certo grau de desaeração do eletrólito de suporte. Embora neste primeiro ensaio a concentração de oxigênio não tenha sido controlada de modo rigoroso, percebe-se que o eletrodo modificado respondeu de modo sensível ao oxigênio dissolvido.

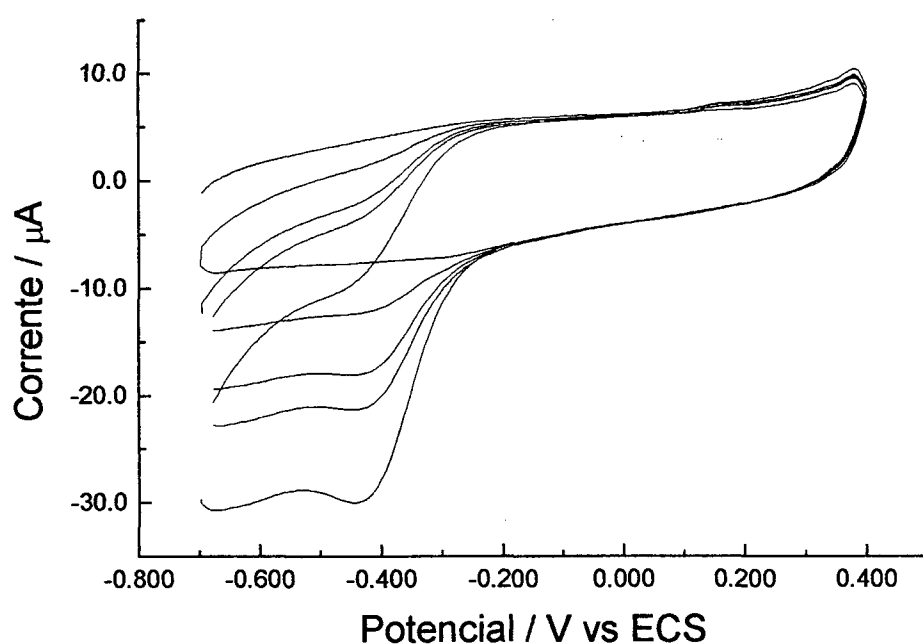


Figura 58. Voltamogramas de eletrodo modificado pelo polímero redox QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+} em diferentes graus de desaeração. Eletrodo de trabalho de carbono vítreo contendo o polímero redox covalentemente ligado. Eletrólito de suporte de KCl 0,1 mol L⁻¹ em pH 8. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. As correntes catódicas são maiores para as soluções mais aeradas.

Verificou-se que tal comportamento era bastante afetado pelo pH do meio, tal como pode ser observado nos voltamogramas da Figura 59. Neste caso, o grau de desaeração foi o mesmo, mudando-se apenas o pH do eletrólito de suporte.

Os voltamogramas das Figuras 58 e 59 podem ser interpretados como a electrocatálise da redução de dioxigênio promovida pelo polímero redox.

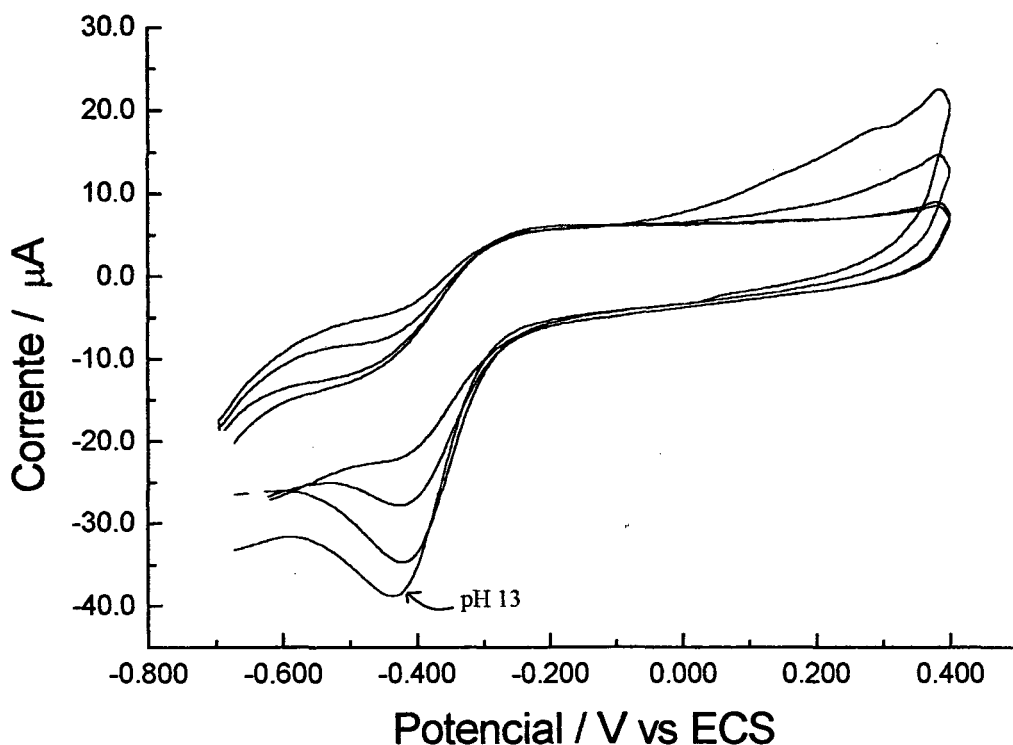
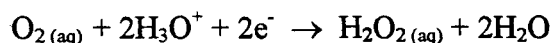


Figura 59. Voltamogramas do eletrodo modificado pelo polímero redox QTS- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{3+/2+}$ em eletrólitos de diferentes valores de pH. Os valores de pH foram 8, 10, 12, e 13. As correntes catódicas foram crescentes, para uma mesma concentração de O_2 dissolvido, à medida que o pH crescia. As demais condições foram idênticas às da Figura 58.

O expressivo aumento nas correntes, ocasionado pela elevação de pH, pode ser atribuído à migração de contra-íons hidroxila, exigida pelas mudanças no estado de oxidação do rutênio (ver páginas 90 e 91). Neste caso, como se trata de um polycation, o contra-íon de maior mobilidade em meio aquoso seria justamente hidroxila, sendo, por esta lógica, compreensível a obtenção de correntes mais intensas em soluções de pH mais elevado. O modo como o processo eletroquímico foi influenciado pelo pH constitui, *per se*, um argumento em favor da eletrocatalise, pois a redução do oxigênio sobre eletrodos inertes não modificados é afetada pelo pH, mas de modo bem distinto: partindo da reação



é possível inferir que ela será mais espontânea em valores de pH mais baixos¹¹². Portanto, o potencial requerido para reduzir o oxigênio a uma certa taxa, seria cada vez mais baixo com

112. Adams, R.N. - *Electrochemistry at Solid Electrodes*. Marcel Dekker, Inc. New York, 1969.

a elevação do pH, ou, analisando de outro ângulo, seria obtida uma corrente cada vez menor para um potencial fixo, se o processo estivesse ocorrendo sobre a superfície de eletrodo inerte. Mas o que se observa no voltamograma da Figura 59 é que, à medida que o pH foi elevado, o processo se passou, essencialmente, no mesmo potencial, **aumentando** as correntes. Isto seria típico dos processos de redução que, normalmente requerendo sobrepotenciais, pela intervenção de um mediador reduzem este sobrepotencial, possibilitando a realização do processo em um potencial menos negativo, determinado pelo mediador, caracterizando eletrocatalise. Todavia, considerando os resultados expressos na Tabela 5, percebe-se que o processo ocorre aproximadamente no mesmo potencial, para o eletrodo modificado ou não, sendo apenas os valores de corrente fortemente afetados pelo polímero modificador. Provavelmente, o potencial do mediador seja praticamente o mesmo que o do processo redox deslocado de seu valor de equilíbrio por algum sobrepotencial. Neste caso, a eletrocatalise estaria caracterizada apenas pelo aumento das correntes catódicas no caso do eletrodo modificado.

Tabela 5. Resposta voltamétrica a oxigênio dissolvido obtida por vários eletrodos. *

| | Carbono Vítreo | | | Epóxi Grafitada | | | Pasta de Carbono | | |
|---------------|----------------|---------|------------|-----------------|---------|------------|------------------|---------|------------|
| | normal | oxidado | modificado | normal | oxidado | modificado | normal | oxidado | modificado |
| Epc (V) | -0,400 | -0,400 | -0,440 | -0,540 | -0,540 | -0,540 | -0,540 | -0,540 | -0,540 |
| ipc sat. (μA) | -4,7 | -11,0 | -38,0 | -9,54 | -27,99 | -31,00 | -8,16 | -427 | -20,4 |
| ipc sem (μA) | -3,5 | -5,0 | -7,5 | -0,54 | -4,33 | -5,94 | -1,03 | -427 | -1,99 |
| Δipc (μA) | 1,2 | 6,0 | 30,5 | 9,00 | 23,66 | 25,06 | 7,13 | 0 | 16,3 |

*Referência: ECS. Eletrólito de suporte: KOH 10⁻¹ mol L⁻¹.

A comparação dos valores para o parâmetro Δipc, expressos na Tabela 5, indicam a vantagem da modificação dos eletrodos estudados pelo polímero redox QTS - [Ru(NH₃)₅]³⁺ na detecção de oxigênio. Como este parâmetro está ligado à sensibilidade, fica, conseqüentemente evidente, a vantagem analítica. Os dados da Tabela 5 mostram uma vantagem apenas discreta para o caso do eletrodo de epóxi grafitada modificado pelo

polímero em relação ao oxidado, o que não ocorre nos casos dos demais eletrodos. Esta preparação foi repetida três vezes sem melhores resultados. Muito provavelmente isto esteja relacionado ao processo de ancoramento do polímero redox na superfície do eletrodo. Alguma interferência da DCC (ou seus solventes) deve ter havido sobre a matriz de epoxi. Um procedimento alternativo precisa ser tentado no futuro, possivelmente o processo do cloreto de tionila²⁴.

Uma diferente interpretação, alternativa à eletrocatalise, para o aumento das correntes catódicas, evidente na Tabela 5 para o eletrodo modificado pelo polímero redox, seria associá-lo a um efeito de área. O polímero seria um meio que possibilitaria um aumento de área da interface eletrodo-eletrólito e com isto das correntes, de acordo com o tratamento teórico de Randles-Sevcik (ver página 12). De qualquer forma, este aumento da superfície eletródica só é possível se admitirmos que o polímero esteja atuando através da transição $\text{Ru (II)} \rightleftharpoons \text{Ru (III)}$, uma vez que a matriz polimérica, em si mesma, não é favorável à transferência eletrônica (ver página 39). Neste modelo, fica difícil dar conta do aumento das correntes catódicas com a elevação de pH, pois, como foi discutido nas páginas 20 a 23, a elevação de pH acarretaria no polímero uma conformação mais enovelada que redundaria em diminuição e não aumento da superfície eletródica. Porém, admitindo que este efeito não seja muito pronunciado, o aumento da concentração de hidroxilas favorecendo o trânsito dos contra-íons necessários á transição $\text{Ru (II)} \rightleftharpoons \text{Ru (III)}$, pode explicar aquilo que foi observado, mantendo como possível este modelo.

24. Jinrui, X.; Bin, L.- Analyst 119 (1994) 1599.

2.5-Estudos visando à aplicação do polímero redox QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+} como sensor de oxigênio dissolvido.

Considerando a resposta a oxigênio exibida pelo eletrodo de epóxi grafitada modificado pelo polímero redox QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+}, decidiu-se avaliar seu desempenho em um sistema de fluxo. Para tanto, construiu-se uma célula amperométrica tubular usando este eletrodo de trabalho. Com esta célula montou-se um sistema em fluxo para determinação de oxigênio dissolvido. A calibração deste sistema foi feita por intermédio do método titulométrico de Winckler⁷⁵.

2.5.1 -Experimental

Todos os reagentes citados a seguir foram de grau analítico e usados como recebidos. A água usada em todas as preparações, com condutividade de 0,1 μS cm⁻¹, foi desionizada em sistema Milli-Q da firma Millipor. A resina epóxi, sempre que citada, foi Araldite de secagem normal. A solução do polímero redox foi proveniente da preparação descrita na seção 2.4.

Sistema eletroquímico

As medidas voltamétricas foram feitas no potenciostato citado na seção 2.4. Todas as desaerações ou saturação de oxigênio das soluções de eletrólito foram feitas como descrito naquela seção.

Célula amperométrica tubular para detecção em fluxo de oxigênio dissolvido.

Adaptou-se um fio de cobre (0,5mm de diâmetro) a um pedaço (2cm) de seringa hipodérmica descartável de 1mL, preenchendo-se o interior do tubo com resina epóxi, sem grafite. A reticulação da resina, neste caso, foi feita com o próprio agente endurecedor do fabricante. Após o endurecimento inicial, ele foi completado deixando-se mais 2h a 120°C, em estufa. Um furo longitudinal foi feito com uma broca de 2mm. Obteve-se, então, uma peça como descreve a Figura 60. A parte do fio de cobre alinhada em relação ao furo longitudinal foi revestida por 3 camadas de epóxi + grafite oxidado, exatamente como descrito para o eletrodo de epóxi + grafite oxidado. Cada camada foi, tal como antes, reticulada por HF, seguido de aquecimento. Lavou-se muito bem, com água. A ponta do fio

75. APHA, AWWA E WPCF- Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. Edited by Greenberg, A.E.; Trussel, R.R.; Clesceri, L.S. 16th ed., 1985.

e suas partes dobradas foram isoladas por epóxi sem grafite. Sobre o grafite oxidado ancorou-se o polímero QTS- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{2+/3+}$, do mesmo modo que foi empregado para o eletrodo de carbono vítreo, já descrito nesta seção. A peça assim obtida constituiu o eletrodo de trabalho da célula amperométrica tubular.

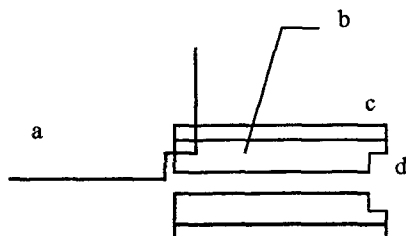


Figura 60. Peça contendo eletrodo base da célula amperométrica tubular. Um fio de cobre “a” com 0,5mm de diâmetro foi aprisionado em um tubo preenchido com resina epóxi “b”. O tubo “c” consistia de um pedaço de seringa hipodérmica de 1mL, com 2cm de comprimento. O cilindro de resina possuía um furo de 2mm de diâmetro ao longo de todo seu comprimento. O orifício “d” destinava-se a acomodar um tubo de “tygon” que permitia o acoplamento ao sistema FIA.

Preparou-se uma outra peça, de formato semelhante ao do eletrodo de trabalho, preenchendo-se um pedaço (2cm) de seringa hipodérmica de 1mL com epóxi grafitada + HF (0,44g de epoxi + 0,56g de grafite + 1 a 2 gotas de HF 40%/m/m¹¹³). Após endurecimento a temperatura ambiente, o cilindro resultante foi deixado 12h em estufa a 50-60°C. Perfurou-se então, longitudinalmente o cilindro de epóxi grafitada com uma broca de 2mm de diâmetro. Um fio de cobre foi fixado perpendicularmente à peça valendo-se de epóxi grafitada. A peça assim obtida, descrita na Figura 61, constituiria o eletrodo auxiliar da célula amperométrica tubular.

113. Henriques, H.P; Fogg, A.G.- Preparation of Grafite-loaded Epoxy-based Voltammetric Electrodes Using a Multi-layer Coating and Hardening Technique. *Analyst* 109 (1984) 1195-1199.

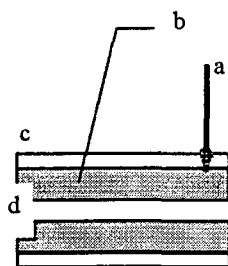


Figura 61. Peça que constitui o eletrodo auxiliar da célula amperométrica tubular. Um fio de cobre "a" foi fixado numa peça cilíndrica de epóxi grafitada "b". A peça de epóxi, dotada de um orifício longitudinal com 2mm de diâmetro, foi obtida reticulando-se o adesivo epóxi no interior de um pedaço de seringa hipodérmica descartável, de 1mL, "c" com 2cm de comprimento. O orifício "d" destinava-se ao acoplamento ao sistema FIA, através de tubo de "tygon".

As duas peças descritas pelas Figuras 60 e 61 foram unidas com resina epoxi sem grafite. Para maior firmeza, as duas peças foram envolvidas por um tubo de silicone. O conjunto foi fixado em uma base pesada. O sistema de referência foi acoplado em série, valendo-se do eletrodo de calomelano saturado Radelkis, obtendo-se a célula completa como descreve, de modo esquemático, a Figura 62.

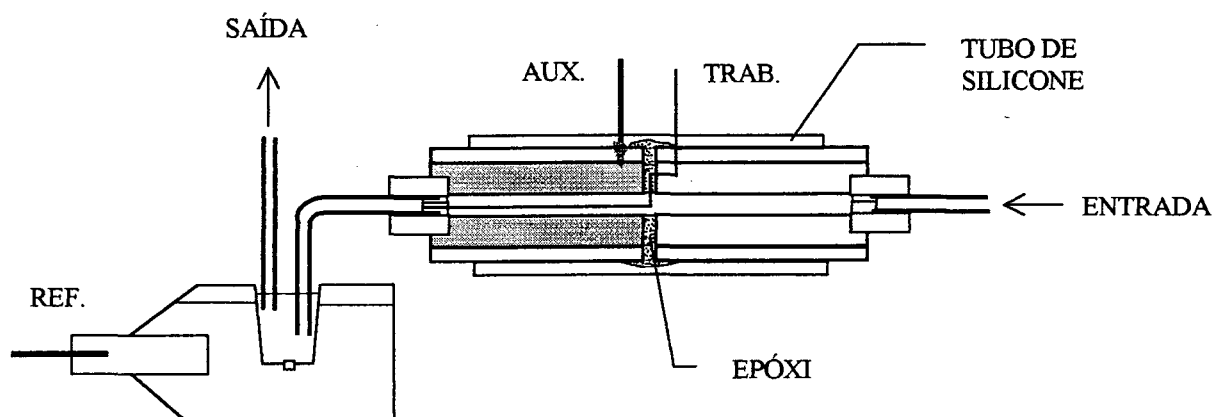


Figura 62. Célula amperométrica tubular. As duas peças descritas nas Figuras 60 e 61 foram acopladas com resina epóxi sem grafite e esta união foi reforçada com um tubo de silicone. A entrada das soluções em fluxo está indicada, à direita da figura e a saída (à esquerda) desembocava na cavidade do eletrodo de referência. Daí, a aspiração era promovida pela bomba peristáltica. "REF.", "AUX." E "TRAB." Indicam, respectivamente, os contactos dos eletrodos de referência, auxiliar e trabalho da célula.

Sistema de fluxo.

Uma bomba peristáltica Ismatec modelo 07341 – 15, de quatro canais, operando a 30rpm, foi utilizada para movimentar os líquidos. A linha de base correspondia ao sinal do eletrólito de suporte: água (primeiro canal, com vazão de $2,7\text{mL min}^{-1}$) misturada, por confluência, a solução de KOH 1mol L^{-1} (segundo canal, com vazão de $1,1\text{mL min}^{-1}$). Estes dois líquidos eram mantidos permanentemente desaerados pelo contínuo borbulhamento de N_2 . O terceiro canal (vazão de $2,6\text{mL min}^{-1}$) era destinado a transportar as soluções analíticas para uma alça de amostragem de 15cm e o quarto canal (vazão de $6,9\text{mL min}^{-1}$) aspirava o excedente de líquido que se acumulava na cavidade do eletrodo de referência. Tubos de “tygon”, com diâmetros escolhidos em função das vazões desejadas, operaram na bomba peristáltica. Os demais tubos foram de polietileno com diâmetro interno de 0,8mm. Após a confluência, a zona de amostragem seguia para a célula tubular, descrita na Figura 62, onde um sinal de corrente era obtido entre o eletrodo de trabalho (polarizado a $-0,550\text{V}$ vs ECS). Este sinal era acompanhado em tempo real na tela do microcomputador, sendo cada pico obtido correspondente ao oxigênio dissolvido na solução analítica. A Figura 63 ilustra de modo esquemático o arranjo dos componentes no sistema.

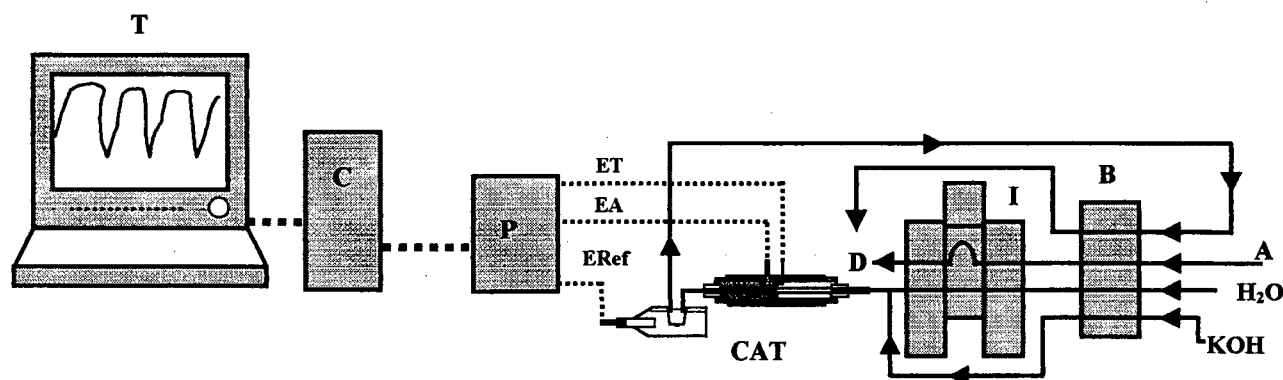


Figura 63. Diagrama de fluxos para estudos sobre determinação de oxigênio dissolvido. As linhas cheias indicam o percurso dos líquidos e as linhas pontilhadas, os condutores elétricos necessários ao controle e aquisição de dados. “A”- canal ($2,6\text{mL min}^{-1}$) destinado a conduzir as soluções analíticas à alça de amostragem de 15cm. “B”- bomba peristáltica. “I”- injetor proporcional. “D”- descarte. “CAT”- célula amperométrica tubular. “ET”- eletrodo de trabalho. “EA”- eletrodo auxiliar. “ERef”- eletrodo de referência de calomelano saturado. “P”- potenciostato. “C”- computador. “T”- tela, onde se obtinha o amperograma em tempo real. A linha de base era o sinal correspondente ao eletrólito de suporte, obtido pela mistura, em confluência, de água ($2,7\text{mL min}^{-1}$) e solução de KOH 1mol L^{-1} ($1,1\text{mL min}^{-1}$), perfeitamente desaeradas por borbulhamento contínuo de N_2 . O quarto canal ($6,9\text{mL min}^{-1}$) destinava-se a aspirar o líquido que se acumulava na cavidade do eletrodo de referência.

Padronização do sistema em fluxo.

Devido a grande dificuldade de preparação de soluções analíticas de oxigênio dissolvido, a padronização do sistema em fluxo foi feita determinando-se este analito pelo sinal amperométrico no sistema descrito, e, a mesma solução analítica, pelo consagrado método de Winckler⁷⁵. Dois frascos dotados de hermética rolha esmerilhada e comumente usados na determinação de oxigênio, foram saturados deste gás através do borbulhamento de ar durante um tempo (rigorosamente igual para os dois frascos) de 15 minutos. De um dos frascos foram aspiradas 5 replicatas para o sistema em fluxo e registrados os picos correspondentes. Ao outro frasco, seguindo o procedimento padrão, foram adicionados 1mL de solução de MnSO_4 2mol L^{-1} e 1mL de solução alcalina de iodeto-azida ($12,5\text{mol L}^{-1}$ em KOH, 1mol L^{-1} em KI e $0,15\text{mol L}^{-1}$ em NaN_3). O precipitado branco de $\text{Mn}(\text{OH})_2$ formado reagiu com o oxigênio dissolvido produzindo precipitado escuro de $\text{MnO}(\text{OH})_2$. Após uns 5min, foi adicionado 1mL de H_2SO_4 concentrado. Isto dissolveu o precipitado e, o Mn^{4+} produzido, reagindo com o iodeto presente, liberou I_2 em quantidade equivalente ao oxigênio dissolvido. Usando amido como indicador, este iodo foi titulado gravimetricamente por solução de tiosulfato de sódio $23,97\mu\text{mol g}^{-1}$ de solução aquosa (padronizado, na mesma ocasião, por KIO_3 $4,293\mu\text{mol g}^{-1}$ de solução aquosa). A relação estequiométrica de interesse é: $1\text{mol de O}_2 : 4\text{mol de S}_2\text{O}_3^{2-}$. Partindo da solução saturada de oxigênio, produziram-se outras soluções analíticas, em pares de frascos, borbulhando-se N_2 durante tempos de: 1, 3, 10, 15, 20 e 30 minutos (rigorosamente iguais para cada um dos dois frascos). Em cada par de frascos, um foi destinado ao sistema em fluxo (5 replicatas) e o outro à determinação pelo método padrão (triplicatas, com desvio padrão de 1%). Até 10 minutos de desaeração, foram usados 50mL como alíquota para a titulação. Para os tempos de 15, 20 e 30 minutos de desaeração, foram usados 100mL para a titulação. Esta providência garantiu em cada titulação, pelo menos 4 algarismos significativos na massa da solução de tiosulfato.

75. APHA, AWWA E WPCF- Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. Edited by Greenberg, A.E.; Trussel, R.R.; Clesceri, L.S. 16th ed., 1985.

2.5.2-Resultados e discussão

A escolha do potencial que seria aplicado ao eletrodo de trabalho da célula em fluxo, foi feita a partir do voltamograma realizado com o sistema operando nas mesmas vazões que seriam utilizadas para as determinações. O voltamograma obtido está ilustrado na Figura 64.

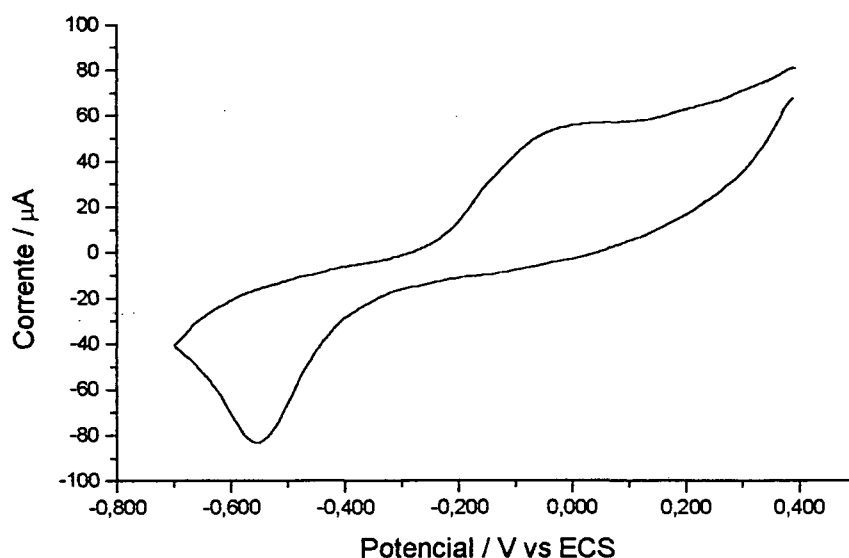


Figura 64. Voltamograma de oxigênio dissolvido na célula amperométrica tubular. Usou-se o sistema descrito na figura 60, operando com as vazões necessárias às determinações, varrendo-se o potencial a 50mVs^{-1} . O potencial de pico catódico, localizado a $-0,550\text{V}$, foi então usado para todas as determinações subseqüentes. Como “amostra” usou-se água saturada de oxigênio.

As curvas de corrente versus tempo, obtidas operando a 30 amostras h^{-1} , quando o eletrodo de trabalho encontrava-se polarizado a -550V , ou seja os diagramas (ou ainda amperogramas) tinham, basicamente, o aspecto apresentado na Figura 65. Como parâmetro analítico, foram utilizadas as correntes medidas desde a linha de base até o máximo do pico, sem utilizar o programa de filtragem (por transformada de Fourier) do potenciostato. Para uma mesma concentração de oxigênio dissolvido, após algum treino de uso do sistema, a reprodutibilidade destas correntes chegaram a um desvio padrão relativo de até

0,5 % para $n = 3$. Para diminuir o nível de ruído, tentou-se envolver a célula amperométrica tubular em uma gaiola de Faraday, mas isto não surtiu efeito. O ruído pareceu estar associado às minúsculas cavidades de nitrogênio, usado na desaeração, e carregado até a célula pelo deslocamento dos fluidos. Talvez um outro método de desaeração (vácuo e ultrassom, por exemplo) pudesse inibir este problema.

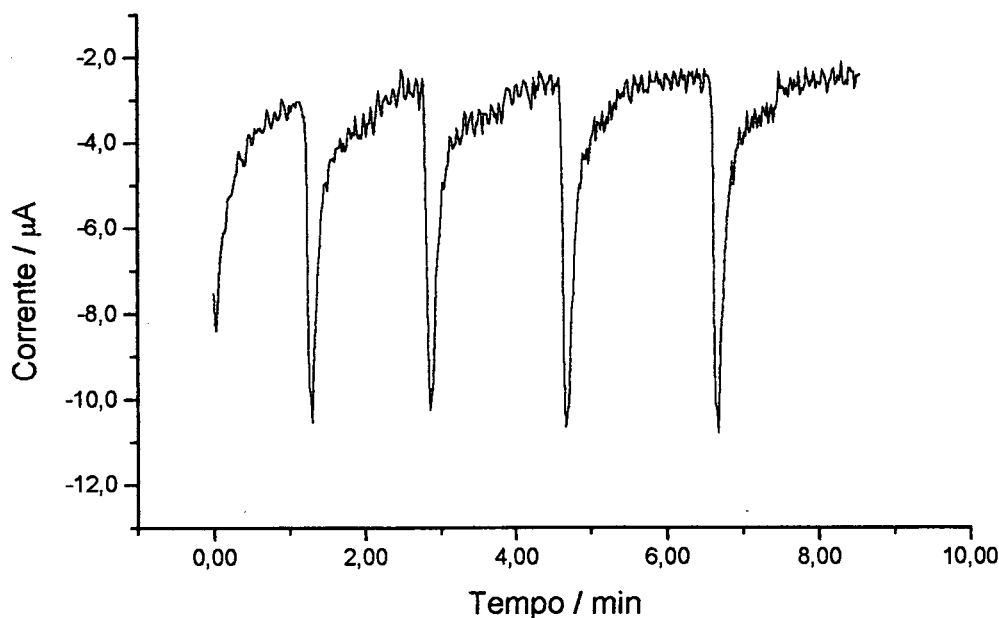


Figura 65. Diagrama obtido, no sistema ilustrado na Figura 63, para $6,824\text{mg O}_2$ dissolvido L^{-1} . Foram feitas 4 injeções sucessivas de uma água que, inicialmente saturada de oxigênio, foi desaerada durante 1min de borbulhamento por nitrogênio.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos pelo sistema ilustrado na Figura 63, em correlação com as titulações realizadas pelo método de Winckler. Pode-se observar que, após 30 min de desaeração, ainda havia na solução $1,171\text{mg de O}_2 \text{ L}^{-1}$. Isto provavelmente ocorreu devido à utilização de nitrogênio comum, sem qualquer tratamento para eliminação de resíduos de oxigênio. Nas condições em que o experimento foi realizado, este valor de $1,171\text{mg de O}_2 \text{ L}^{-1}$ constituiu-se no limite de detecção (sinal aproximadamente igual a 3 vezes o ruído). O limite de detecção também foi afetado pela presença de resíduos de O_2 no nitrogênio, pois, como o sinal do carregador era exatamente determinado pelo oxigênio

residual no nitrogênio, ficava difícil distinguir o sinal da amostra em relação ao fundo. Outra observação pertinente é sobre os desvios padrão obtidos nas leituras das correntes de pico, variáveis de 0,5 a 6,5 %. Verificou-se que isto também ocorria devido às minúsculas cavidades de nitrogênio que, arrastadas até a célula de detecção de forma aleatória, acarretavam um ruído variável dificultando a localização exata da linha de base nos fiagramas. Com um pouco de cuidado e treino no manuseio do sistema, verificou-se ser possível desvios padrão relativos tão pequenos quanto 1%, ou mesmo 0,5 %.

Tabela 6. Correntes de pico nos fiagrama x OD

| Tempo de borbulhamento de nitrogênio (min) | Concentração de OD pelo método de Winckler (mgL ⁻¹) | Corrente de pico no fiagrama (μA) |
|--|---|-----------------------------------|
| 0,0 | 7,529 (dpr = 1,2% para n=3) | 8,50 (dpr = 1,4% para n=3) |
| 1,0 | 6,824 (dpr = 1,2% para n=3) | 7,12 (dpr = 6,5% para n=3) |
| 3,0 | 5,703 (dpr = 1,2% para n=3) | 5,79 (dpr = 2,5% para n=3) |
| 10 | 3,215 (dpr = 1,2% para n=3) | 2,58 (dpr = 0,8% para n=3) |
| 15 | 2,397 (dpr = 1,2% para n=3) | 2,29 (dpr = 4,0% para n=3) |
| 20 | 1,685 (dpr = 1,2% para n=3) | 1,23 (dpr = 0,5% para n=3) |
| 30 | 1,171 (dpr = 1,2% para n=3) | 0,37 (dpr = 5,6% para n=3) |

dpr = desvio padrão relativo

Lançando os dados de corrente e concentração em gráfico, obtém-se a curva analítica da Figura 66.

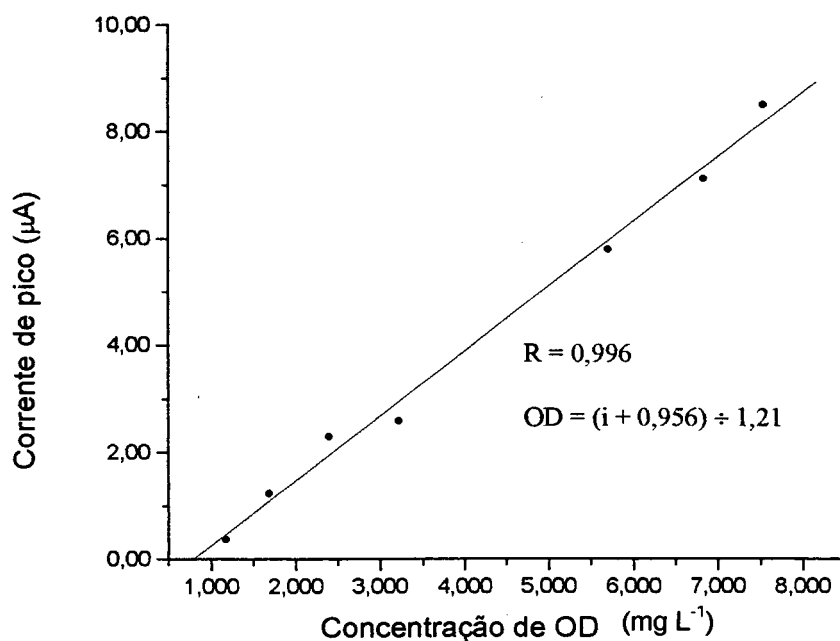


Figura 66. Curva analítica para oxigênio dissolvido. Na equação, “i” é a corrente de pico, em μA e “OD” é a concentração de oxigênio dissolvido em mg L^{-1} .

Oxidantes fortes normalmente são sérios interferentes nas determinações amperométricas de oxigênio dissolvido. Como o sistema, descrito na Figura 63, operou com o eletrodo de trabalho em $-0,550\text{V}$, seria previsível o mesmo tipo de interferência. Esta hipótese foi testada comparando o sinal de quatro injeções sucessivas para uma água saturada de oxigênio ($7,529 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) com o obtido para a mesma água, contendo também $4,00 \text{ mg cloro ativo L}^{-1}$. Os resultados obtidos foram

Solução saturada de oxigênio, sem cloro----- $5,67\mu\text{A}$ (dpr = 7,7%; n = 4)

Solução saturada de oxigênio com $4,00 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ ----- $5,68\mu\text{A}$ (dpr = 7,6%; n = 4)

mostrando que, nas condições do teste, o sinal para oxigênio não foi afetado pelo cloro. Sem dúvida, é preciso considerar que o potencial redox do cloro é fortemente afetado pelo pH, sendo oxidante mais forte em meio ácido. Como o sistema operava em pH 12, em parte a atenuação do poder oxidante do cloro pode explicar a ausência de interferência, mas é também possível atribuir à eletrocatalise, promovida pelo polímero QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+}, uma alta especificidade para dioxigênio. Novamente, uma explicação satisfatória para a ausência de interferência do cloro requer estudos intensivos que venham esclarecer o mecanismo do processo redox no eletrodo modificado pelo polímero.

2.6-Estudos visando à aplicação do polímero redox QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+} em biossensores de tecido imobilizado.

A possibilidade de aplicação de QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+} como polímero mediador das oxireduases, associada à facilidade de sua imobilização em uma matriz de pasta de carbono⁷⁹, ambas conjugadas com o uso de tecidos vegetais como fonte (barata e de grande estabilidade) de enzimas^{114,115}, conduziram a testes no sentido da construção de um biossensor usando tecido de batata doce desidratado (TBD) em um eletrodo de pasta de carbono. O sinal voltamétrico em eletrólito desaerado, para crescentes concentrações de H₂O₂, foi estudado em diferentes versões: eletrodo de pasta de carbono sem modificações; eletrodo de pasta de carbono contendo apenas o polímero mediador QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+}; eletrodo de pasta de carbono contendo só TBD e eletrodo de pasta de carbono contendo TBD + o polímero mediador QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+}. A fim de comparar a eficiência mediadora do polímero com a do oxigênio nas condições estudadas, foi feito mais um ensaio: eletrodo de pasta de carbono contendo só TBD em eletrólito saturado de O₂.

2.6.1-Experimental

Todos os reagentes citados a seguir foram de grau analítico e usados como recebidos. A água usada em todas as preparações, com condutividade de 0,1 μS cm⁻¹, foi desionizada em sistema Milli-Q da firma Millipor. O grafite usado em todos os eletrodos de pasta de carbono foi específico para finalidade eletroquímica, da marca Fischer. Todas as desaerações das soluções de eletrólito foram realizadas através de borbulhamento de nitrogênio (comum, sem qualquer tratamento para remoção de oxigênio residual), durante meia hora. O polímero redox QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+} foi preparado exatamente como descrito na seção 2.4.

Tecido de batata doce desidratado

O tecido de batata doce desidratado, gentilmente cedido por outro laboratório, foi preparado a partir de batatas (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) selecionadas, adquiridas diretamente de um produtor local. Foram lavadas, descascadas, picadas e secas em uma estufa à vácuo (Sheldon Manufacturing, Inc.) durante 3h a 30°C. Um liquidificador doméstico foi usado então para reduzir o material a finas partículas, cujo tamanho foi

79. Rodrigues, C. A. - Preparações de Derivados do Biopolímero Quitosana e sua Utilização em Eletrodos Modificados. Exame de Qualificação ao Doutorado. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1995.

114. Vieira, I.C.; Fatibello-Filho, O.; Angnes, L. - *Analytica Chimica Acta* 19930 (1999) 1.

115. Signori, C.A.; Fatibello-Filho, O. - *Química Nova* 17:1 (1994) 38.

selecionado por peneiras de modo que seu diâmetro fosse inferior a 100 μ m. Este material (um sólido em pó, de aspecto branco, ligeiramente amarelado) foi estocado em um dessecador a 25°C e usado como fonte enzimática de peroxidase (E.C. 1.11.1.7.).

Sistema eletroquímico

Os eletrodos não modificados e o potenciostato necessários foram descritos na seção 2.4. O eletrólito de suporte foi solução de KCl 0,1mol L⁻¹ em água (pH = 6,3).

Eletrodos modificados

Eletrodo de pasta de carbono modificado por QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+}. Sobre 40mg de grafite eletroquímico depositaram-se 20 μ L da solução do polímero redox proveniente da diálise (este volume corresponde a 0,08 μ g de Ru). Após homogeneização, a pasta resultante foi deixada, a temperatura ambiente, por 12h em um pequeno dessecador sobre sílica gel. Ao grafite modificado e completamente seco foram perfeitamente misturados 16 μ L de óleo mineral Nujol. A pasta foi aplicada na cavidade de um eletrodo base e a superfície eletródica polida por suaves movimentos em uma folha de papel destinado a fotocópias.

Eletrodo de pasta de carbono modificado por TBD. Foram perfeitamente misturados 40mg de grafite eletroquímico com 6,2mg de TBD. Em seguida, 16 μ L de óleo mineral Nujol foram adicionados e homogeneizou-se perfeitamente. A pasta resultante foi aplicada na cavidade de um eletrodo base e a superfície eletródica polida por suaves movimentos em uma folha de papel destinado a fotocópias.

Eletrodo de pasta de carbono modificado por QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+} + TBD. Foram perfeitamente misturados 40mg de grafite eletroquímico, 6,2mg de TBD e 20 μ L da solução do polímero redox proveniente da diálise. Esta mistura foi deixada por 12h em um dessecador sobre sílica gel. À mistura seca foram adicionados 16 μ L de óleo mineral Nujol e homogeneizou-se perfeitamente. A pasta resultante foi aplicada na cavidade de um eletrodo base e a superfície eletródica polida por suaves movimentos em uma folha de papel destinado a fotocópias.

Estudo da resposta dos eletrodos à peróxido de hidrogênio

Os estudos voltamétricos foram conduzidos em uma célula de três eletrodos contendo 18mL de eletrólito de suporte. Esta solução foi intensamente desaerada e, em seguida, realizou-se a varredura de potenciais de +0,600V até -0,600V (ou -0,800V) com uma velocidade de varredura de 50mV s⁻¹. O voltamograma foi registrado e 10μL de solução de H₂O₂ (Vetec) 1,80mol L⁻¹ foram adicionados. Desaerou-se por mais 5min e repetiu-se a varredura de potenciais, exatamente como antes, registrando-se o novo voltamograma. Realizaram-se mais três adições de peróxido, obtendo-se novos voltamogramas. Como o acréscimo de volume à célula é desprezível, as concentrações foram: 0,00; 1,00 x 10⁻³; 2,00 x 10⁻³; 3,00 x 10⁻³; 4,00 x 10⁻³ mol de H₂O₂ L⁻¹. Este estudo foi realizado para os eletrodos preparados: eletrodo de pasta de carbono sem modificações; eletrodo de pasta de carbono contendo apenas o polímero mediador QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+}; eletrodo de pasta de carbono contendo apenas TBD; eletrodo de pasta de carbono contendo TBD + o polímero mediador QTS-[Ru(NH₃)₅]^{2+/3+}. A fim de estudar a capacidade mediadora do oxigênio sobre o centro redox da peroxidase de TBD, o estudo da resposta voltamétrica a H₂O₂ foi repetido, usando-se como eletrodo de trabalho pasta de carbono modificada por TBD (sem polímero redox) em uma solução de eletrólito saturada de oxigênio. Nos 25 voltamogramas registrados, leu-se a corrente catódica a -0,600V e estes valores, para cada eletrodo, foram comparados. Os dados obtidos foram arranjados como curvas analíticas para peróxido de hidrogênio.

2.6.2-Resultados e discussões

Os voltamogramas obtidos (para os cinco casos estudados), sem H_2O_2 e com uma adição de H_2O_2 , estão apresentados na Figura 67.

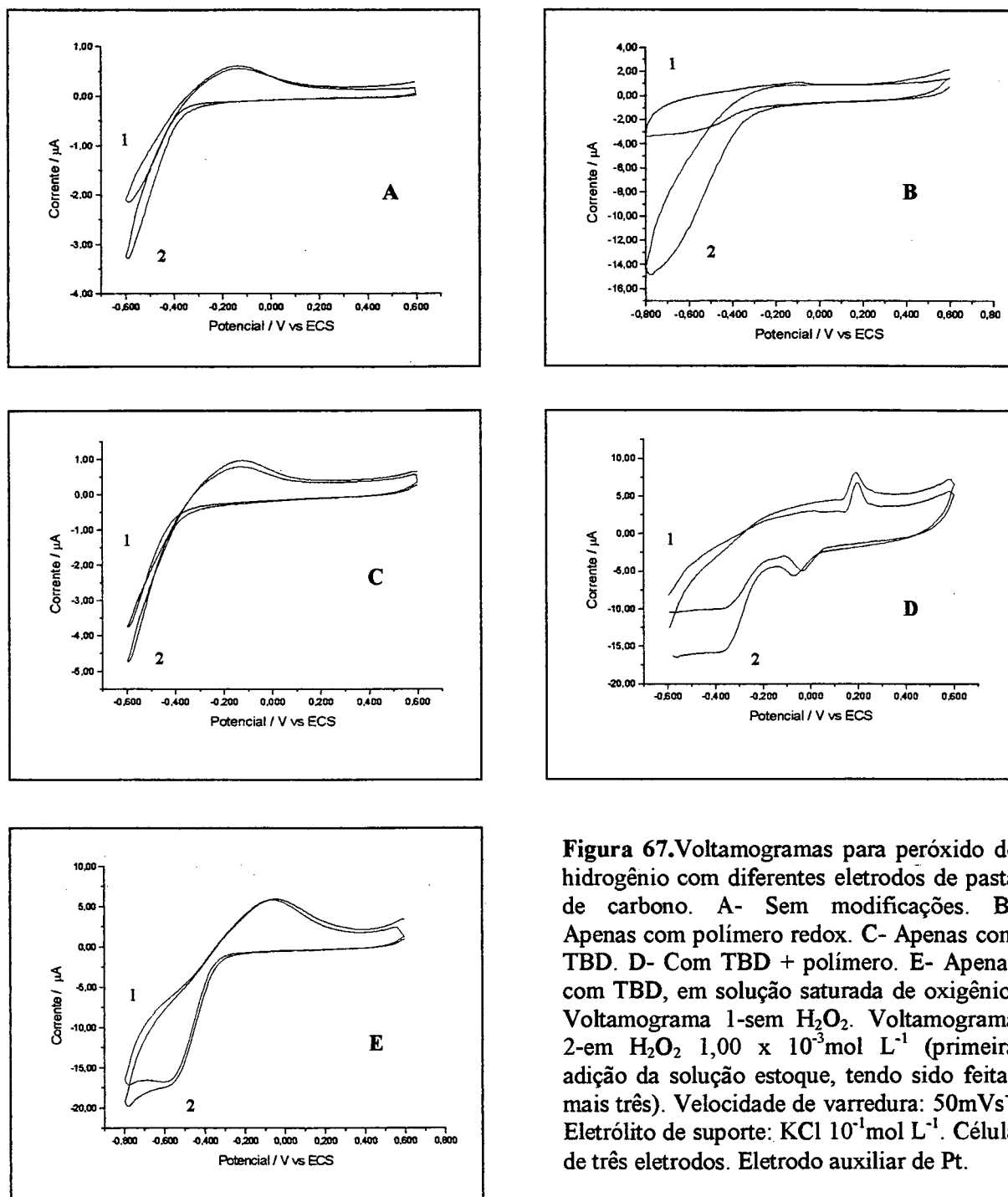


Figura 67. Voltamogramas para peróxido de hidrogênio com diferentes eletrodos de pasta de carbono. A- Sem modificações. B- Apenas com polímero redox. C- Apenas com TBD. D- Com TBD + polímero. E- Apenas com TBD, em solução saturada de oxigênio. Voltamograma 1-sem H_2O_2 . Voltamograma 2-em H_2O_2 $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (primeira adição da solução estoque, tendo sido feitas mais três). Velocidade de varredura: 50 mVs^{-1} . Eletrólito de suporte: $\text{KCl } 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. Célula de três eletrodos. Eletrodo auxiliar de Pt.

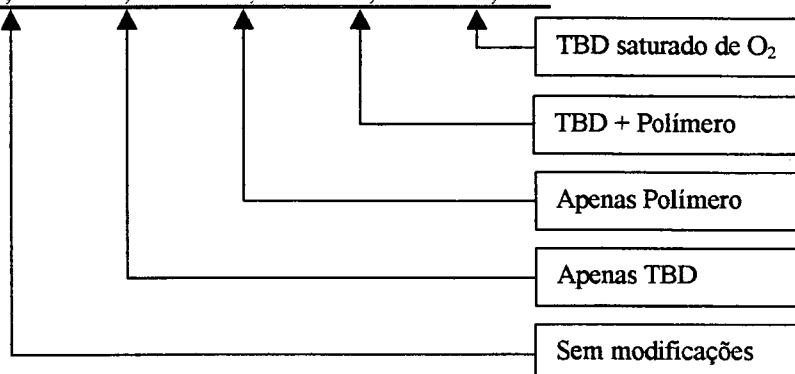
As correntes catódicas, lidas nos voltamogramas a $-0,600\text{V}$, para cada concentração de H_2O_2 , estão arrançadas na Tabela 7.

Tabela 7. Correntes catódicas x concentração de H_2O_2

| Concentração de H_2O_2 (mol L^{-1}) | i_1 (μA) | i_2 (μA) | i_3 (μA) | i_4 (μA) | i_5 (μA) |
|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0,00000 | -2,14 | -3,74 | -2,97 | -10,21 | -16,70 |
| 0,00100 | -3,28 | -4,69 | -10,89 | -17,50 | -17,40 |
| 0,00200 | -4,20 | -5,29 | -15,56 | -24,24 | -19,00 |
| 0,00300 | -5,00 | -5,90 | -19,16 | -29,36 | -20,80 |
| 0,00400 | -5,78 | -7,00 | -22,20 | -36,48 | -22,40 |

i_1, i_2, i_3, i_4, i_5 são as correntes catódicas lidas nos voltamogramas a $-0,600\text{V}$.

Janela de potencial: $+0,60\text{V}$ a $-0,60\text{V}$
 Velocidade de varredura: 50mV s^{-1}
 Eletrólito de suporte: $\text{KCl } 10^{-1}\text{mol L}^{-1}$



Se os dados da Tabela 7 forem lançados em gráfico, obtém-se o aspecto mostrado na Figura 68.

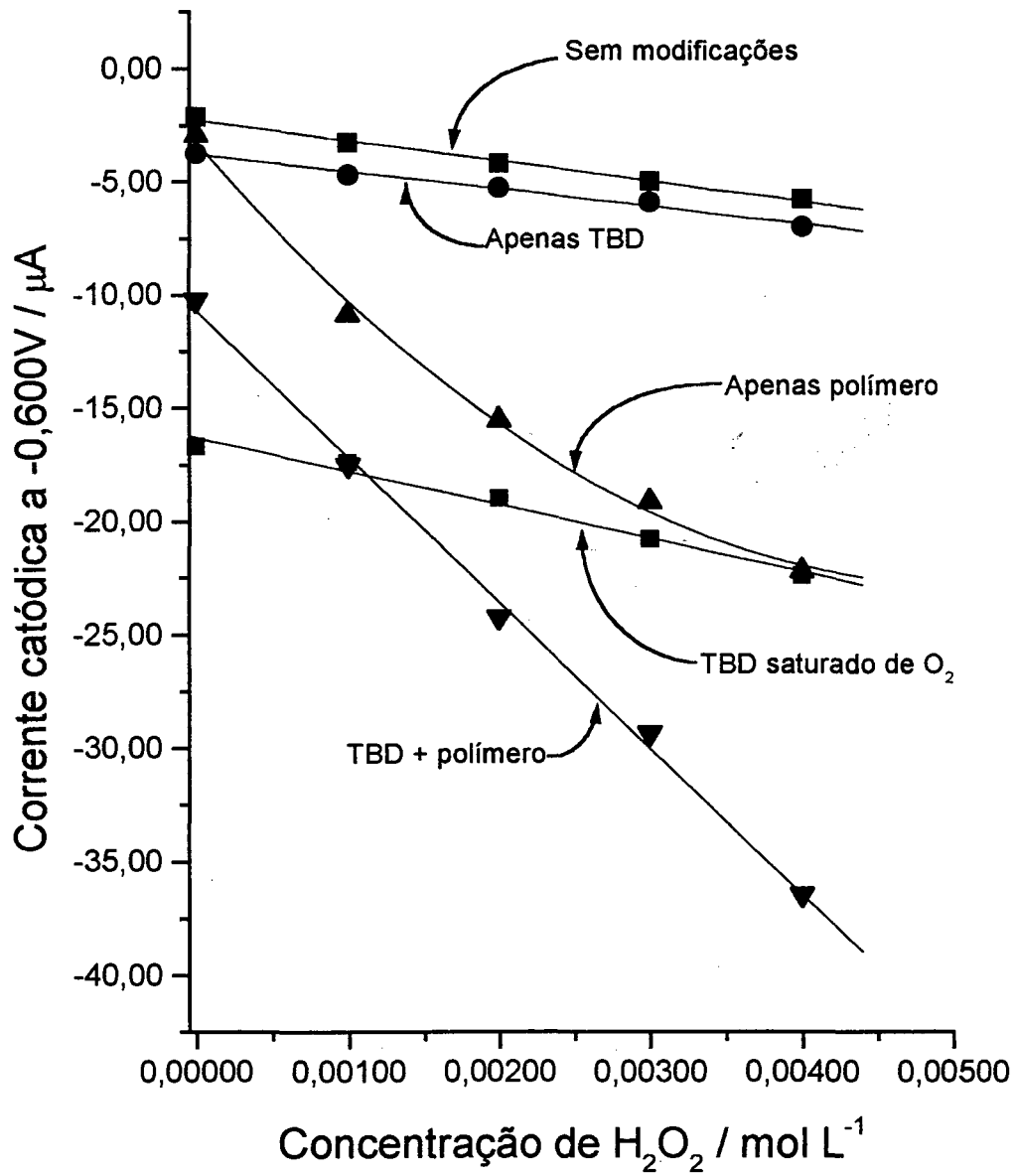


Figura 68. Curvas analíticas para peróxido de hidrogênio, obtidas com os dados da Tabela 7.

Através da regressão linear para os pontos do caso “TBD + polímero redox” foi obtida a equação

$$C = -(i + 10,68) \div 6440 \quad (r = 0,998 \text{ para } n = 5)$$

sendo “C” a concentração de H_2O_2 em mol L^{-1} e “i” a corrente em μA , lida a $-0,600\text{V}$.

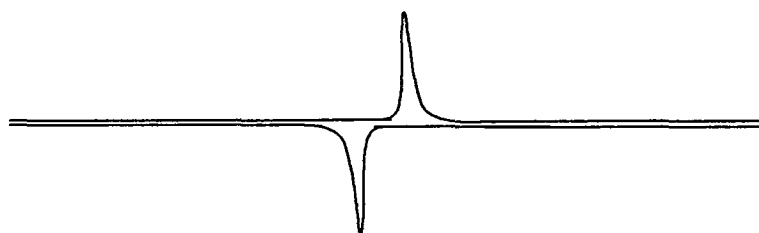
As curvas analíticas da Figura 68 permitem estabelecer algumas conclusões.

1ª) Sem mediador, nas condições estudadas, a peroxidase não consegue promover eficiente catálise, pois a curva obtida para o eletrodo modificado apenas por TBD essencialmente acompanha aquela obtida pelo eletrodo não modificado.

2ª) A eletrocatalise na redução de H_2O_2 a água, promovida apenas pelo polímero $\text{QTS-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{2+/3+}$, inicialmente ocasionando uma sensibilidade comparável ao caso “TBD + polímero”, parece alcançar uma saturação, pois perde-se a linearidade de sinal à medida que cresce a concentração de H_2O_2 .

3ª) Nas condições estudadas, o oxigênio mostra-se um mediador bem menos eficiente que o polímero redox, pois o caso “TBD saturado de O_2 ” apresentou uma sensibilidade bastante inferior à obtida no caso “TBD + polímero”.

4ª) A associação do tecido de batata doce com o polímero redox $\text{QTS-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{2+/3+}$ em uma matriz de pasta de carbono representa, para a detecção de peróxido de hidrogênio, uma excelente alternativa ao eletrodo não modificado.



LITERATURA CITADA

1. DENARO, A. R.- **Fundamentos de Eletroquímica**. Editora Edgard Blucher, São Paulo, 1974.
2. SKOOG and LEARY- **Principles of Instrumental Analysis**. 4th edition, Saunders Publishing, 1992.
3. FAULKNER, L. R. - **Understanding Electrochemistry: Some Distinctive Concepts**. *Journal of Chemical Education* 60:4 (1983) 262-264.
4. EVANS, D. H.; O'Connell, K. M.; Petersen, R. A.; Kelly, M. J.- **Cyclic Voltammetry**. *Journal of Chemical Education* 60:4 (1983) 291-293.
5. BERTOTTI, M. e PLETCHER, D.- **Estudos Eletroquímicos Envolvendo a Redução Catalisada de Bromato em Microeletrodo de Mercúrio na Presença de Mo(VI)**. *Anais da Associação Brasileira de Química* 46:3 (1997) 189-195.
6. CORREIA, A. N.; MASCARO, L.H.; MACHADO, S.A.S.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.- **Ultramicroeletrodos: Parte I: Revisão Teórica e Perspectivas**. *Química Nova* 18:5 (1995) 475-480.
7. BARD, A.J.- **Chemical Modification of Electrodes**. *Journal of Chemical Education* 60:4 (1983) 302-304.
8. PAUL, H.J.; LEDDY, J.- **Direct Determination of Transfer Coefficient from Cyclic Voltammetry: Isopoints as Diagnostics**. *Analytical Chemistry* 67 (1995) 1661-1668.
9. SHIGEARA, K.; OYAMA, N.; ANSON, F.C.- **Electrochemical Responses of Electrodes Coated with Redox Polymers**. *Journal of American Chemical Society* 103 (1981) 2552-2558.
10. MUZZARELLI, R.A.A.- **Chitin**. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978.
11. MUZZARELLI, R.A.A.; JENIAUX, C.; GOODAY, G.W.(ed.) - **Chitin in Nature and Technology**. Plenum Press. New York, 1986.
12. HIRANO, S.; OHE, Y.; ONO, H.- **Selective N-acylation of Chitosan**. *Carbohydrate Research*, 47 (1976) 315-320.
13. HELLER, A.- **Electrical Connection of Enzyme Redox Centers to Electrodes**. *The Journal of Physical Chemistry* 96:9 (1992) 3579-3587.
14. MUZZARELLI, R.A.A.; JENIAUX, C.; GOODAY, G.W.(ed.) - **Chitin in Nature and Technology**. Plenum Press. New York, 1986. Página 343.

15. MUZZARELLI, R.A.A.; JENIAUX, C.; GOODAY, G.W. (ed.) - **Chitin in Nature and Technology**. Plenum Press. New York, 1986. Página 341.
16. MUZZARELLI, R.A.A. - **Chitin**. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 81.
17. MUZZARELLI, R.A.A.; JENIAUX, C.; GOODAY, G.W. (ed.) - **Chitin in Nature and Technology**. Plenum Press. New York, 1986. Página 389.
18. DOMARD, A.; RINAUDO, M. - Gel Permeation Chromatography of Cationic Polymer on Cationic Porous Silica Gels. **Polymer Communications**, 25 (1984) 55-58.
19. HELLER, A. - Electrical Wiring of Redox Enzymes. **Acc. Chem. Res.** 23 (1990) 128-134.
20. OYAMA, N. AND ANSON, F. - Polymeric Ligands as Anchoring Groups for the Attachment of Metal Complexes to Graphite Electrode Surfaces. **Journal of the American Chemical Society** 101:13 (1979) 3450-3456.
21. PEARSON, R. G. - Hard and Soft Acids and Bases. **Journal of the American Chemical Society** 85:22 (1963) 3533-3539.
22. KURAUCHI, Y.; TSUROMORI, E.; OHGA, K. - A Glassy Carbon Electrode Modified with N-(2-Hydroxybenzyl)chitosan for Voltammetric Determinations of Cu^{2+} and Pb^{2+} . **Bulletin of Chemical Society of Japan**. 62 (1989) 1341-1342.
23. HIKIMA, S.; KAKIZAKI, T.; TAGA, M.; HASEBE, K. - Enzyme Sensor for L-lactate with a Chitosan-mercury Film Electrode. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry** 345 (1993) 607-609.
24. JINRUI, X.; BIN, L. - Preconcentration and Determination of Lead Ions at a Chitosan-modified Glassy Carbon Electrode. **Analyst** 119 (1994) 1599-1601.
25. RODRIGUES, C. A.; FÁVERE, V. T.; STADLER, E.; LARANJEIRA, M.C.M. - Concentration of Anions on Poly (N-Acetyl-D-glucosamine) Derivative-Modified Carbon Paste Electrode. **Journal of Brazilian Chemical Society** 4:1 (1993) 14-16.
26. HIKIMA, S.; KAKIZAKI, T.; HASEBE, K. - Flow Injection Method for the Polarographic Determination of l-Lactate Using an Immobilized Enzyme Reactor. **Analytical Sciences** 8 (1992) 165-168.
27. MIGUEZ, M.J.B. - Sistema de Encapsulação de Urease com Quitosana-PVA: Reatividade e Aplicações. Tese de Doutorado., Depto de Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1997.
28. MUZZARELLI, R.A.A.; JENIAUX, C.; GOODAY, G.W. (ed.) - **Chitin in Nature and Technology**. Plenum Press. New York, 1986. Página 428.

29. MOORE, J.W. AND MOORE, E.A. - **Environmental Chemistry**. Academic Press Inc. New York, 1976.
30. MUZZARELLI, R.A.A.- **Chitin**. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 109.
31. MUZZARELLI, R.A.A.- **Chitin**. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 137.
32. MUZZARELLI, R.A.A.; JENIAUX,C.; GOODAY,G.W.(ed.) - **Chitin in Nature and Technology**. Plenum Press. New York, 1986. Página 407.
33. MUZZARELLI, R.A.A.; JENIAUX,C.; GOODAY,G.W.(ed.) - **Chitin in Nature and Technology**. Plenum Press. New York, 1986. Página 336, entrada 4.
34. MUZZARELLI, R.A.A.; JENIAUX,C.; GOODAY,G.W.(ed.) - **Chitin in Nature and Technology**. Plenum Press. New York, 1986. Página 331.
35. MUZZARELLI, R.A.A.; JENIAUX,C.; GOODAY,G.W.(ed.) - **Chitin in Nature and Technology**. Plenum Press. New York, 1986. Página 321.
36. FÁVERE, V.T.- Adsorção de íons Cu II, Cd II, Ni II, Pb II, e Zn II pelo Biopolímero Quitina, Quitosana e pelas Quitosanas Modificadas. Tese de doutoramento. Depto. de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1994.
37. MUZZARELLI, R.A.A.- **Chitin**. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 139.
38. MUZZARELLI, R.A.A.- **Chitin**. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 140.
39. MUZZARELLI, R.A.A.- **Chitin**. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 147.
40. MUZZARELLI, R.A.A.- **Chitin**. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 149.
41. MUZZARELLI, R.A.A.- **Chitin**. 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 145.
42. SMITH AND MARTELL - **Critical Stability Constants**. Vol. 2 e 3. Plenum Press, New York, 1975.
43. SHRIVER, D.F.; ATKINS, P.W.; LANGFORD, C.H. - **Inorganic Chemistry**. Oxford University Press. Oxford, 1992.

44. RODRIGUES, C.A.- **Preparações de Derivados do Biopolímero Quitosana e sua Utilização em Eletrodos Modificados.** Tese de Doutorado. Depto de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.
45. KLUG, M.; SANCHES, M.N.M.; LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T.; RODRIGUES, C.A.- **Análise das Isotermas de Adsorção de Cu(II), Cd(II), Ni(II) e Zn(II) por N-(3,4-Dihidroxibenzil) quitosana Empregando o Método da Regressão não Linear.** *Química Nova* 21:4 (1998) 410-413.
46. MUZZARELLI, R.A.A.; ISOLATI, A.; FERRERO, A.- **Chitosan Membranes. Ion Exchange and Membranes** 1 (1974) 193-196.
47. MUZZARELLI, R.A.A.- **Chitin.** 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 73.
48. JOSEPH, J.; GOMATHI, H.; RAO, G.P.- **Modification of Carbon Electrodes with Zinc Hexacyanoferrate.** *Journal of Electroanalytical Chemistry* 431 (1997) 231-235.
49. MUZZARELLI, R.A.A.- **Chitin.** 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 89.
50. MUZZARELLI, R.A.A.- **Chitin.** 1st edition, Pergamon Press Ltd. Oxford, England, 1978. Página 89.
51. SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C.- **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** 3^a edição. Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1979.
52. MUZZARELLI, R.A.A.; JENIAUX, C.; GOODAY, G.W.(ed.) - **Chitin in Nature and Technology.** Plenum Press. New York, 1986. Página 300.
53. BILLMEYER, F.W.- **Textbook of Polymer Science.** 3rd edition. Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons. New York, 1984.
54. MUZZARELLI, R.A.A.; JENIAUX, C.; GOODAY, G.W.(ed.) - **Chitin in Nature and Technology.** Plenum Press. New York, 1986. Página 338.
55. RICHARDS, E.G.- **An Introduction to the Physical Properties of Large Molecules in Solution.** Cambridge University Press. Cambridge, London, 1980.
56. METILLE, M.J.; HESTER, R.D.- **Water Soluble Polymers.** cap. 18. Editado por Shalaby, W.; Shalaby, C.; McCormick, L.; Butler, G.B. ACS Symposium Series 467, 1991.
57. BROUSSIGNAC, J.- **Un Haut Polymère Naturel Peu Connu Dans L'Industrie- Le Chitosan.** *Chimie Industrielle et Générale* 99:9 (1970) 1241-1247.

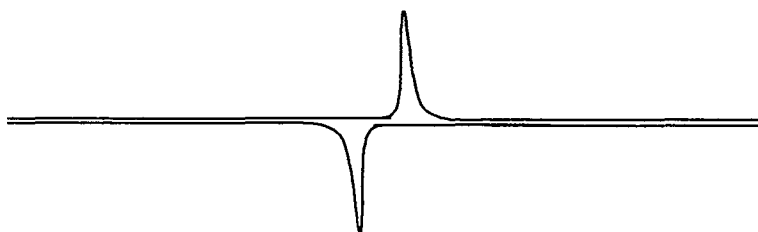
58. DOMSZY, J.G.; ROBERTS, A.F.- Evaluation of Infrared Spectroscopic Technique for Analysing Chitosan. **Makromolecular Chemistry** 186 (1985) 1671-1677.
59. MOORE, G.K.; ROBERTS, G.A.F.-Determination of the Degree of N-acetylation of Chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules** 2 (1980) 115-116.
60. MUZZARELLI, R.A.A.; JENIAUX, C.; GOODAY, G.W.(ed.) - **Chitin in Nature and Technology**. Plenum Press. New York, 1986. Página 385.
61. TURNER, A.P.F.; KARUBE, I.; WILSON, G.S (Edit.) - **Biosensor, Fundamentals and Applications**. Oxford University Press, Oxford, 1987.
62. EDELMAN, P.G.; WANG, J (Edit.) - **Biosensor & Chemical Sensor- Optimizing Performance Through Polymeric Materials**. ACS Symposium Series 487, 1991.
63. MAGNA, A.; CAPELATO, M.D.; FATIBELLO-FILHO, O.- Glucose Electrode Based on Immobilized Glucose Oxidase on a Tungsten-tungsten Oxide Electrode. **Journal of Brazilian Chemical Society** 4:2 (1993) 72-75.
64. DEGANI, Y.; HELLER, A.- Electrical Communication between Redox Centers of Glucose Oxidase and Electrodes via Electrostatically and Covalently Bound Redox Polymers **Journal of American Chemical Society** 111 (1989) 2357-2358.
65. CALVO, E.J.; DANILOWICZ, C.; DIAZ, L.- Enzyme Catalysis at Hydrogel-modified Electrodes with Redox Polymer Mediator. **Journal of Chemical Society Faraday Transation** 89:2 (1993) 377-384.
66. KOOPAL, C.G.J.; NOLTE, R.J.M.- Kinetic Study of Third-generation biosensors. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics** 33 (1994) 45-53.
67. NARASIMHAN, K.; WINGARD, L.B.- Enhanced Direct Electron Transport with Glucose Oxidase Immobilized on (Aminophenyl)boronic Acid Modified Glassy Carbon Electrode. **Analytical Chemistry** 58:14 (1986) 2984-2987.
68. GLEZER, V.; LEV, O.- Sol-Gel Vanadium Pentoxide Glucose Biosensor. **Journal of American Chemical Society** 115 (1993) 2533-2534.
69. TOR, R.; FREEMAN, A.- New Enzyme Membrane for Enzyme Electrodes. **Analytical Chemistry** 58:6 (1986) 1042-1046.
70. COSNIER, S.; INNOCENT, C.; JOUANNEAU, Y.- Amperometric Detection of Nitrate via a Nitrate Reductase Immobilized and Electrically Wired at the Electrode Surface. **Analytical Chemistry** 66:19 (1994) 3198-3201.
71. GUILBAULT, G.G.- **Analytical Uses of Immobilized Enzymes**. Marcel Dekker, Inc. New York, 1984.

72. REACH, G.; WILSON, G.S.- Can Continuous Glucose Monitoring Be Used for the Treatment of Diabetes? *Analytical Chemistry* 64:6 (1992) 381A-386A.
73. HENRY, C.- Getting under the Skin. *Analytical Chemistry, News & Features* 70 (1998) 594A-598A.
74. MORRISON, R.; BOYD, R.- *Química Orgânica*. Edições Cardoso, 1967. Página 711.
75. GREENBERG, A.E.; TRUSSEL, R.R.; CLESCERI, L.S. (Edit.) - *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. APHA, AWWA E WPCF. 16th ed., 1985.
76. SAWYER, D.T.; HANEMANM, W.R. ; BEEBE, J. - *Chemistry Experiments for Instrumental Methods*. John Wiley & Sons. New York, 1984.
77. BOND, A.M.- *Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*. Marcel Dekker. New York, 1980.
78. NAKAMURA, S.; HAYASHI, S.; KOGA, K.- Effect of Periodate Oxidation on the Structure and Properties of Glucose Oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 445 (1976) 294-308.
79. RODRIGUES, C. A.- *Preparações de Derivados do Biopolímero Quitosana e sua Utilização em Eletrodos Modificados*. Exame de Qualificação ao Doutorado. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1995.
80. LUMLEY-WOODYEAR, T.; ROCCA, P.; LINDSAY, J.; DROR, Y.; FREEMAN, A.; HELLER, A.- Polyacrilamide-Based Redox Polymer for Connecting Redox Centers of enzymes to Electrodes. *Analytical Chemistry* 67:8 (1995) 1332-1338.
81. OLSSON, B.; LUNBACK, H.; JOHANSSON, G.; SCHELLER, F.; NENTWIG, J.- Theory and Application of Diffusion-Limited Amperometric Enzyme Electrode Detection in Flow Injection Analysis of Glucose. *Analytical Chemistry* 58:6 (1986) 1046-1052.
82. JURKIEWICZ, M.; ALEGRET, S.; FÀBREGAS, E.- Comparison of Flow Injection Analytical Biosystems Based on Open-Tube and Packed-Bed Enzyme Reactors *Analytica Chimica Acta* 370 (1998) 47-58.
83. GORTON, L.; CSOREGI, E.; DOMINGUEZ, E.; EMNÉUS, J.; JONSSON-PETTERSSON, G.; MARKO-VARGA, G.; PERSSON, B.- Selective Detection in Flow Analysis Based on the Combination of Immobilized Enzymes and Chemically Modified Electrodes. *Analytica Chimica Acta* 250 (1991) 203-248.
84. REIS, B.F.; GINÉ, M.F.; KRONKA, E.A.M.- A Análise Química por Injeção em Fluxo Contínuo. *Química Nova* 12:1 (1989) 82-91.

85. FANG, Z.- **Flow Injection Separation and Preconcentration**. Published jointly by VCH Weinheim and VCH New York, 1993.
86. GANZAROLLI, E.M.; LEHMKUHL, A.; QUEIROZ, R. R.U.; SOUZA, I.G.- Titulador Potenciométrico Automatizado Baseado em Sistema de Fluxo Monossegmentado. *Química Nova* 22:1 (1999) 53-57.
87. MARIN, M.A.B.; SILVA, R.C.; LEHMKUHL, A.; SILVA, J.B.B.; GANZAROLLI, E. M.; QUEIROZ, R.R.U.- Sistema Automático para Determinação de Cianeto Livre e Total Empregando Eletrodo Tubular Íon-Seletivo de Membrana Homogêna. *Química Nova* 23:1 (2000) 23-29.
88. GIACOMOZZI, C.; NETO, J.A.G.; SOUZA, I.G.; QUEIROZ, R.R.U.- High Current-density Anodic Electrodeposition in Flow Injection System for the Determination of Aluminium, Copper and Zinc in non-ferroalloys by Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Automated Methods & Management in Chemistry* 21:1 (1999) 17-22.
89. RIZOV, I.; ILCHEVA, L.- Differential Flow Injection Potentiometry. *Analytica Chimica Acta* 311 (1995) 175-181.
90. CARVALHO, R.M.- Determinação Potenciométrica de Cloreto em Argamassas de Paredes Empregando Sistema de Injeção em Fluxo. Dissertação de Mestrado. Depto. de Química. UFSC (1997).
91. MARIN, M.A.B.; GANZAROLLI, E.M.; QUEIROZ, R.R.U.; SOUZA, I.G.- Uma Célula Simples para Adaptação de Eletrodos Seletivos Comerciais em Sistemas de Análises em Fluxo. *Química Nova* 21:6 (1998) 802-803.
92. FACCHIN, I.; PASQUINI, C.- Extração Líquido-Líquido em Sistemas de Fluxo. *Química Nova* 21:1 (1998) 60-68.
93. MATTOS, I.L.; QUEIROZ, R.R.U.- Pervaporação: Uma Técnica de Separação Contínua não Cromatográfica. *Química Nova* 21:2 (1998) 202-205.
94. CLEAR, J.M.; KELLY, J.M.; O'CONNEL, C.M.; VOS, J.G.- Preparation, Characterization, and Photochemical Properties of Bis(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) Complexes of 4-Vinyl-pyridine, Poly-4-Vinylpyridine, and Copolymers. *Journal of Chemical Research S* (1981) 260-261.
95. FURBEE, W.J.; KUWANA, T.; KELLY, R.S. - Fractured Carbon Fiber-Based Biosensor for Glucose. *Analytical Chemistry* 66:9 (1994) 1575.
96. CALVERT, J.M.; MEYER, T.J.- Polypyridine Complexes of Ruthenium(II) Bound to Poly (4-vinylpyridine). Synthesis, Characterization and Thin-Film Electrochemistry of a Series of Bis(bipyridine) Metallopolymers. *Inorganic Chemistry* 21:11 (1982) 3978-3989.

97. FORSTER, R.J.; KELLY, A.J.; VOS, J.G.; LYONS, M.E.G.- The Effect of Supporting Electrolyte and Temperature on the Rate of Charge Propagation Through Thin Films of $[\text{Os}(\text{bipy})_2\text{PVP}_{10}\text{Cl}]\text{Cl}$ Coated on Stationary Electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 270 (1989) 365-379.
98. BARISCI, J.N.; WALLACE, G.G.; WILKE, E.A.; MEANEY, M.; SMYTH, M.R.; VOS, J.G.- The Use of Chemisorbed Electrocatalytic Polymers for Detection in Flowing Solutions. *Electroanalysis* 1 (1989) 245-250.
99. GREGG, B.A.; HELLER, A.- Crosslinked Redox Gels Containing Glucose Oxidase for Amperometric Biosensor Applications. *Analytical Chemistry* 62:3 (1990) 258-263.
100. OHARA, T.J.; RAJAGOPALAN, R.; HELLER, A.- "Wired" Enzyme Electrodes for Amperometric Determination of Glucose Oxidase or Lactate in the Presence of Interfering Substances. *Analytical Chemistry* 66:15 (1994) 2451-2457.
101. LIAUDET, E.; BATTAGLINI, F.; CALVO, E.J.- Electrochemical Study of Sulphonated Ferrocenes as Redox Mediators in Enzyme Electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 293 (1990) 55-68.
102. SCHUHMANN, W.; OHARA, T.J.; SCHMIDT, H.L.; HELLER, A.- Electron Transfer between Glucose Oxidase and Electrodes via Redox Mediators Bound with Flexible Chains to the Enzyme Surface. *Journal of American Chemical Society* 113:4 (1991) 1394-1397.
103. CALVO, E.J.; DANILOWICZ, C.; DIAZ, L.- A New Polycationic Hydrogel for Three Dimensional Enzyme Wired Modified Electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 369 (1994) 279-282.
104. KUEHN, C.G.; TAUBE, H.- Ammineruthenium Complexes of Hydrogen Sulfide and Related Sulfur Ligands. *Journal of American Chemical Society* 98:3 (1976) 689-702.
105. GREGG, B.A.; HELLER, A.- Redox Polymer Films Containing Enzymes. *The Journal of Physical Chemistry* 95:15 (1991) 5970-5975.
106. WISHART, J.F.; BINO, A.; TAUBE, H.- A Very Short Ruthenium(II)-Nitrogen Heterocycle Bond: Crystal Structures of Pentaamine (N-methylpyrazinium) Ruthenium(II) Iodide and Pentaamine (N-methylpyrazinium) Ruthenium(III) p-Toluenesulfonate Pentahydrate. *Inorganic Chemistry* 25 (1986) 3318-3321.
107. SULLIVAN; SALMON; MEYER - Mixed Phosphine 2,2'- Bipyridine Complexes of Ruthenium. *Inorganic Chemistry* 17 (1978) 3334-3341.
108. SILVA, R.C.; SOUZA, I.G.- Eletrodos Artesanais para Voltametria. *Química Nova* 21:4 (1998) 477-480.

109. INZELT, G. - Role of Polymeric Properties in the Electrochemical Behavior of Redox Polymer-Modified Electrodes. *Electrochimica Acta* 34:2 (1989) 83-91.
110. DWYER, F.P.; GOODWIN, H.A.; GYARFAS, E.C. - Mono and Bis-(2,2'-bipyridine) and -(1,10-phenantroline) Chelates of Ruthenium and Osmium. *Aust. J. Chem.* 16 (1963) 544-548.
111. BRODE, W.R. - **Chemical Spectroscopy**. John Wiley & sons Inc. New York, 1943.
112. ADAMS, R.N. - **Electrochemistry at Solid Electrodes**. Marcel Dekker, Inc. New York, 1969.
113. HENRIQUES, H.P; FOGG, A.G. - Preparation of Grafite-loaded Epoxy-based Voltammetric Electrodes Using a Multi-layer Coating and Hardening Technique. *Analyst* 109 (1984) 1195-1199.
114. VIEIRA, I.C.; FATIBELLO-FILHO, O.; ANGNES, L. - Zucchini Crude Extract-Palladium-Modified Carbon Paste Electrode for the Determination of Hydroquinone in Photografic Developers *Analytica Chimica Acta* 19930 (1999)1-7.
115. SIGNORI, C.A.; FATIBELLO-FILHO, O. - Biossensor Amperométrico para a Determinação de Fenóis Usando um Extrato Bruto de Inhame (Alocasia macrorrhiza). *Química Nova* 17:1 (1994) 38-42.
116. JANATA, J.; BEZEGH, A. - Chemical Sensors. *Analytical Chemistry* 60:12 (1988) 62R-74R.
117. JANATA, J. - Chemical Sensors. *Analytical Chemistry* 62:12 (1990) 33R-44R.
118. JANATA, J. - Chemical Sensors. *Analytical Chemistry* 64:12 (1992) 196R-219R.
119. JANATA, J.; JOSOWICZ, M.; DEVANEY, R.S. - Chemical Sensors. *Analytical Chemistry* 66:12 (1994) 207R-228R.



ELETRÓDOS ARTESANAIS PARA VOLTAMETRIA

Reinaldo Carvalho Silva

Escola Técnica Federal de Santa Catarina - Av. Mauro Ramos, 950 - 88020-300 - Florianópolis - SC

Ivan Gonçalves de Souza

Depto. de Química - Universidade Federal de Santa Catarina - 88040-900 - Florianópolis - SC

Recebido em 19/3/97; aceito em 3/12/97

HOMEMADE ELECTRODES FOR VOLTAMMETRY. This paper describes the construction and performance of homemade electrodes for voltammetric purpose using cheap materials, like pipette tips and asbestos fiber. A good cost-to-benefit relation makes this devices specially designed for student use, expecting to improve the broadcasting of electroanalytical methods in Brazilian schools.

Keywords: reference electrode; working electrode; auxiliary electrode.

INTRODUÇÃO

Um questionário preenchido por professores participantes do Curso de Aperfeiçoamento em Análise Instrumental para Docentes Latino Americanos, realizado em 1991 na Escola Técnica Federal de Química do Rio de Janeiro, mostrou que em nenhuma das escolas técnicas com curso de química no Brasil, Paraguai e Equador se ensinava a voltametria nas atividades de química analítica. Ainda hoje persiste esta realidade, apenas um pouco atenuada nos cursos de graduação, embora a eletroanalítica venha representando já uns 14% das publicações brasileiras em química analítica¹, provavelmente como resultado de grande produtividade de poucos grupos. Em parte, esta situação deve-se ao elevado custo de potenciostatos e eletrodos, tornando-os inacessíveis para o ensino em algumas escolas técnicas e universidades. Sem o auxílio destes materiais, ficam prejudicados o domínio técnico e, por falta de apoio concreto, também o domínio teórico. Instrumentos não comerciais de baixo custo aparecem em nossa literatura técnica²⁻⁹. Todavia, a confecção de eletrodos artesanais não tem recebido o devido destaque, razão pela qual procuramos desenvolvê-los, descrevendo aqui o que poderá ser de ajuda a outros que venham a se encontrar na mesma situação. Superada a dificuldade de ordem prática, interessantes estudos iniciais poderão ser realizados¹⁰. A própria feitura dos eletrodos pelos alunos representa um ganho pedagógico pelo "desvelar das caixas-pretas".

EXPERIMENTAL

O amianto usado foi para filtração, de fibra média, da Reagen. As ponteiros de pipetador foram de 2 tamanhos: a BRAND amarela de 10-100 μ L e a KACIL branca de 10-250 μ L (Camelo & Cia). O mercúrio para eletrodo de calomelano foi grau analítico mas deverá ser o mais puro que se puder dispor. O mesmo é válido para os fios de prata e platina. O grafite precisa ser especial para finalidade eletroquímica. Nós usamos o grafite SYNTH sem qualquer especificação, com resultados insatisfatórios devido à alta corrente capacitiva e alta queda ôhmica dos eletrodos de grafite. Os tubos de vidro de todas as preparações referem-se a vidro neutro de fácil amolecimento por calor, com diâmetros, interno de 2,5 mm e externo de 4 mm. O fio de platina, sempre que citado, tem 0,5 a 1,0 mm de diâmetro. O fio de cobre em todos os eletrodos foi fio elétrico residencial com diâmetro de 1mm, do qual se retirou a capa isolante. A resina epoxi foi ARALDITE normal, só sendo usado o tubo de adesivo (o HF é o agente de reticulação). Fita de PTFE (teflon) foi fita veda-juntas com 8-10

mm de largura. A seringa de vacina foi PLASTIPAK B-D de 1mL (descartável) da qual só não foi aproveitada a parte de metal da agulha. Ferroceno P.A. foi purificado por sublimação. A acetonitrila foi grau espectroscópio, seca em peneira molecular de 4 angstrom. A água foi deionizada em sistema MILLI-Q DA FIRMA MILIPOR (condutividade de 0,1 μ S/cm). Todas as demais substâncias foram grau analítico e utilizadas tal como recebidas. A solda foi em fio de 1mm de diâmetro, de estanho e chumbo (63/37), contendo decapante, usada para montagem de circuitos eletrônicos. A lupa ideal é uma binocular, usada pelos biólogos, no aumento de umas 20x, mas uma de relojoeiro já é satisfatória. O maçarico foi à gás butano, sem ar comprimido.

As medidas de potencial dos eletrodos foram feitas submergindo-os em KCl saturado e ligando-os a um medidor de pH, lendo-se na escala de milivolt vs. ECS. As medidas de resistência de junção foram feitas mergulhando o eletrodo pronto em KCl saturado e, usando um eletrodo de prata, mediu-se, com multímetro, a corrente gerada por fonte de corrente alternada de 50-60 HZ, calculando-se a resistência pela lei de Ohm¹¹. A velocidade de difusão de íons cloreto através da junção, mediu-se por titulação (método de Mhor), após deixar-se o eletrodo com a ponta em água deionizada por 72 horas. A vazão de eletrólito através da junção, foi feita deixando-se em ambiente úmido a ponteira com junção completamente cheia de KCl saturado (coluna de água de 40 mm). Após 66 horas, completou-se o nível original com pipeta graduada, medindo-se o volume. Todas as medidas voltamétricas foram realizadas no potenciostato da MICROQUÍMICA IND. E COM. LTDA com controle e aquisição de dados por microcomputador 386, dotado de placa conversora do mesmo fabricante.

ELETRÓDOS DE REFERÊNCIA

A junção e o corpo destes eletrodos são constituídos de fibra de amianto comprimida na ponta de ponteira de pipetador de 10-100 μ L. Cortam-se 4 mm da ponta da ponteira, deixando-se uma abertura de, aproximadamente, 0,8 mm de diâmetro. Coloca-se uma porção de amianto tal que, comprimida, venha a medir entre 5 e 10 mm de altura. Percute-se a ponteira para acomodar a fibra na sua parte mais fina e aperta-se o amianto com uma ferramenta mantendo a ponteira na vertical com a ponta sobre uma superfície plana e limpa. Com um martelinho, golpeia-se a ferramenta sobre a fibra até que esta resulte bem compactada. O grande mérito desta junção é que, simples e barata, pode ser descartada em caso de suspeita de colmatagem ou contaminação (Amianto é nocivo. Evite-se contato ou inalação).

O eletrodo de calomelano é preparado, para trabalhos em meio aquoso, baseando-se nas instruções do livro de Adams¹². Mistura-se cloreto mercurioso em pó com mercúrio, em geral escrupulosamente limpo, até que fique cinza brilhante. Adicionam-se gotas de KCl saturado até que se obtenha uma pasta homogênea. Um tubo de vidro com 23 mm de comprimento é soldado a um fio de platina com 10-15 mm de comprimento, de modo que fiquem uns 5 mm para fora do tubo. Ao ser retirado do calor do maçarico, esfria-se o tubo em dessecador. Com a pasta de calomelano-Hg, enche-se o interior do tubo, deixando-se 1-2 mm que serão preenchidos com fibra de amianto.

Enche-se o corpo do eletrodo com solução saturada de KCl, valendo-se da seringa de 1 mL com uma ponteira de pipetador no lugar da agulha, ou de um conta-gotas de ponta longa e fina. Cuide-se para que não hajam bolhas de ar. Finalmente, acoplam-se ponteira e tubo de vidro, evitando-se a formação de bolhas de ar. Este acoplamento é conseguido valendo-se de um pedaço de ponteira de 10-250 μL , conforme ilustra a figura 1.

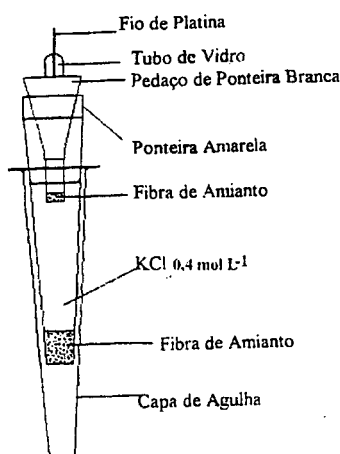


Figura 1. Eletrodo de referência de calomelano.

Ao final de um dia de trabalho esvazia-se o eletrodo e recarrega-se com nova solução de KCl. Estando fora de uso, é conveniente deixar-se o eletrodo com a ponta encaixada na capa da agulha da seringa contendo solução de KCl a 0,4 mol L⁻¹. Periodicamente, devem ser feitos testes de desempenho com este eletrodo, tal como indica Galster¹¹.

Em havendo necessidade de evitar os íons cloreto que migram pela junção, deve-se acoplar uma segunda junção, construída tal como a primeira, contendo eletrólito inerte, como KNO₃. Para isso é necessário um pedaço de ponteira de 10-250 μL adaptado à ponta da primeira junção.

Estudamos para este eletrodo o valor de potencial de eletrodo, a resistência da junção, a velocidade de difusão de íons cloreto pela junção do eletrodo pronto e a vazão de eletrólito pela junção. A tabela 1 mostra os resultados obtidos.

Tabela 1. Características do eletrodo de calomelano artesanal.

| Características | junção simples | junção dupla |
|---|----------------|--------------|
| Potencial X ECS comercial/mV | 0,1 - 2 | 0,1 - 2 |
| Resistência da junção/k Ω | 1,3 - 1,9 | 2,6 - 3,8 |
| Velocidade de difusão de Cl ⁻ / $\mu\text{mol h}^{-1}$ | 1,5 | 0,2 |
| Vazão de eletrólito/ $\mu\text{L h}^{-1}$ | 1,4 | - |

Pode-se preparar também o eletrodo de Ag/AgCl seguindo indicações de Sawyer e Roberts¹³. Todavia, percebemos que tal eletrodo exige sempre a dupla junção para evitar o aparecimento de picos voltamétricos devido à prata que migra através da junção como [AgCl₂].

Para trabalhos em meio não-aquoso descrevemos o eletrodo de Ag/Ag⁺ 0,01 mol L⁻¹ indicado por Sawyer e Roberts¹³. Um fio de prata é cortado com comprimento de 25 mm, sua ponta enrolada na ponta de fio de cobre com 20 mm de comprimento e ali soldada em seguida. Escolhe-se uma agulha de injeção descartável, cujo diâmetro coincida com o do fio de prata e extrai-se a agulha de seu suporte com um alicate. No orifício resultante, introduz-se o fio de prata, deixando-se o terminal de cobre para a parte mais larga do suporte da agulha e acomodando a parte da solda dentro da cavidade. Preenche-se esta cavidade com epoxi-HF¹⁴ (1 gota de HF 40% + 0,5g de resina epoxi) e espera-se uma noite a temperatura ambiente, completando a reticulação por mais 2h a 60°C (HF é nocivo. Trabalhar em capela!). O fio de prata é então polido por lixa 600, decapado por HNO₃ 1+1, lavado em acetona e seco ao ar. Prepara-se AgNO₃ a 0,01 mol/L em acetonitrila e carrega-se o corpo do eletrodo (preparado tal como para o ECS) com esta solução. Acopla-se com firmeza o fio de prata ao corpo do eletrodo, segurando-se pelo suporte do fio. Recomenda-se uma segunda junção, contendo o eletrólito de suporte¹³. Estando fora de uso, manter dentro de uma capa de agulha contendo o eletrólito (Figura 2). Este eletrodo mostrou-se adequado para voltametria de complexos em CH₃CN, usando como padrão interno o par ferroceno/ferrocínio, recomendado por Gagné¹⁵.

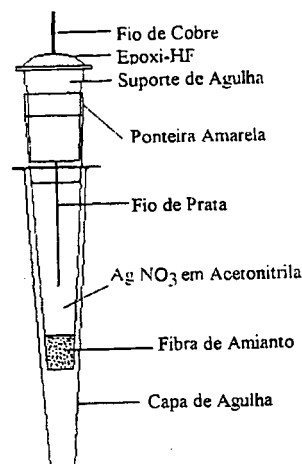


Figura 2. Eletrodo de referência de Ag / Ag⁺ para trabalhos em meio não aquoso.

Em 10 varreduras de potencial a 50mVs⁻¹, realizadas ao longo de 5 h de trabalho, usando o eletrodo Ag/Ag⁺ preparado como referência, disco de platina como eletrodo de trabalho e fio de platina como contra-eletrodo, obtivemos, para o ferroceno 10⁻³ mol L⁻¹ em acetonitrila, E_{1/2} (médio) = 54 mV com desvio padrão de 2,0%. O eletrólito de suporte foi o hexafluorofosfato de tetrabutilamônio a 0,1 mol L⁻¹. Sendo 400mV o E_{1/2} do ferroceno¹⁵, temos para Ag/Ag⁺ a 0,01 mol L⁻¹ em acetonitrila: 346mV.

ELETRODO AUXILIAR

Privilegiando a compactação, o melhor eletrodo seria simplesmente um fio de platina que, projetando-se para fora da célula, conecta-se ao potenciostato. Todavia, a parte não imersa não necessita ser de Pt, podendo ser construídos dois eletrodos auxiliares com um pedaço de fio de platina de 50mm: Corta-se o tubo de vidro com 50mm de comprimento e solda-se o fio de

platina em uma de suas pontas, valendo-se de um maçarico e permitindo que 10mm do fio fique para o interior do tubo. Esfria-se e introduz-se no interior do tubo um pedaço de 60mm de fio de cobre bem limpo (usar HNO_3 1+1 e lavar com acetona secando-se ao ar), fazendo com que se projete uns 10mm para fora dele. Introduz-se também pequenos pedaços de solda junto com o cobre, dentro do tubo. Mantendo a posição vertical, aquece-se rapidamente ao maçarico, apenas para fundir a solda, unindo a platina ao cobre. Dá-se o acabamento final com fita de teflon, fechando a parte superior do eletrodo. Para maior compactação, pode-se enrolar a ponta de platina formando uma espiral (Figura 3). A fim de permitir sua fixação na célula voltamétrica, adapta-se um pedaço de ponteira de 10-250 μL ao corpo deste eletrodo.

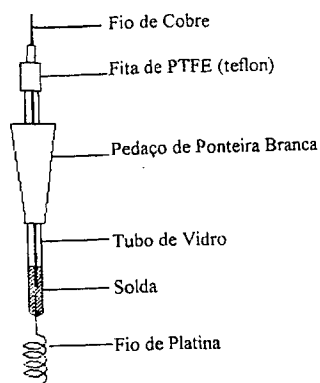


Figura 3. Eletrodo auxiliar de platina.

ELETRODO DISCO DE PLATINA

Com um pedaço de apenas 6 mm de fio de platina pode-se construir um eletrodo tipo disco com corpo de vidro. Para tanto, estira-se o tubo de vidro na chama do maçarico de forma a produzir uma ponta. Corta-se o tubo no comprimento total de uns 50 mm e, aquecendo a ponta afilada dá-se-lhe espessura evitando, porém, que venha a fechar, impedindo a passagem do fio de platina. Fora da chama, adapta-se o fio de platina, de forma que fique apenas ligeiramente para fora da ponta afilada. Na chama oxidante do maçarico, aquece-se a ponta afilada imprimindo um movimento de rotação ao tubo de vidro, retirando-se logo em seguida da região muito aquecida. É preciso examinar com uma lupa a junção vidro-platina: se aí houver bolhas será impossível preparar o eletrodo, sendo necessário quebrar o vidro, recuperar o fio de platina e recomeçar. Estas bolhas são difíceis de evitar, mas é possível obter resultado satisfatório usando vidro neutro (de baixo "ponto de fusão"), chama bem quente, platina bem limpa e operação rápida, evitando sobreaquecimento do metal. Ao retirar o calor da chama, fazê-lo aos poucos a fim de evitar trincas no vidro, que também inutilizam o eletrodo. Esfriada completamente, lixa-se a ponta de platina até eliminá-la por completo. Prossegue-se desgastando a ponta do eletrodo com uma lixa 400 molhada, até que haja uma superfície plana em redor do disco de platina. Em seqüência, usa-se lixa 600, 1200 e alumina até que vidro e platina estejam espelhados ao exame com uma lupa. É vital que sejam removidas todas as partículas de um abrasivo antes que se passe para outro mais fino. Ao final, deixar somente a ponta do eletrodo por 5 minutos em água deionizada no ultra-som. Adapta-se um fio de cobre exatamente como foi descrito para o eletrodo auxiliar. Havendo necessidade, maiores orientações sobre trabalhos em vidro podem ser encontradas em Barbour¹⁶. Adapta-se, por fim, um pedaço de ponteira tal como no eletrodo auxiliar.

Um eletrodo assim preparado forneceu o voltamograma cíclico de hexacianoferrato de potássio apresentado na figura 4. Um polimento mais cuidadoso e soluções melhor desaeeradas produzem um voltamograma mais próximo do ideal.

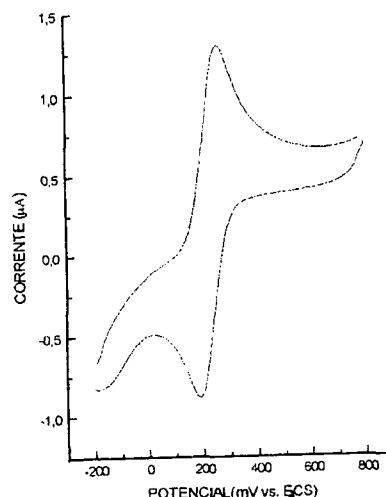


Figura 4. Voltamograma cíclico de uma solução $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} . Eletrólito de suporte KNO_3 (1 mol L^{-1}). Eletrodo de disco de platina.

ELETRODO DE EPOXI GRAFITADA

Este eletrodo de trabalho pode ser construído de acordo com instruções de Henriques e Fogg¹⁴. Mistura-se 0,44g de epoxi com 0,56g de grafite até que fique uma massa completamente homogênea. A cada grama desta mistura, adicionam-se 1-2 gotas de HF a 40% e mistura-se muito bem. (trabalhar na capela pois HF é muito nocivo!). Corta-se a ponta de uma ponteira de 10 - 100 μL de modo que a abertura tenha de 1,5 a 2,0 mm de diâmetro e comprime-se esta ponta sobre a epoxi grafitada que deve subir de 3 a 5 mm pela ponteira. Firmando a ponta sobre superfície plana e lisa, compacta-se a pasta com o auxílio de um bastão de vidro afilado ao maçarico e inserido pela ponta mais grossa da ponteira. Por este lado, introduz-se um fio de cobre (bem limpo e seco com HNO_3 1+1 e acetona) que penetra na pasta de 1 a 3 mm, deixando uns 2 mm de epoxi grafitada além do cobre. Fecha-se a parte de maior diâmetro com epoxi-HF sem grafite (1g de epoxi + 2 gotas de HF) (Figura 5). Deixa-se reticulando por uma noite à temperatura ambiente e mais 2 h a 60°C. Alisa-se a ponta do eletrodo na seqüência de lixas 400, 600 e 1200. Ao final, poli-se com alumina e aplica-se ultra-som por 5 min em água. A superfície final do eletrodo deverá ter brilho especular. Se o exame à lupa revelar pequenas crateras na superfície do eletrodo, deve-se aí comprimir mais epoxi grafitada, sem HF, produzindo uma fina camada que se deve endurecer em vapor de HF por 5 min, seguido de aquecimento por 5 min a 60°C. Segue-se polimento em alumina e aplicação de ultra-som. Este ciclo deve ser repetido, se necessário, comprimindo bem a epoxi grafitada sobre a superfície do eletrodo. Um pedaço de papel celofane auxilia nesta aplicação.

Um eletrodo deste tipo forneceu o voltamograma apresentado na figura 6. O sucesso na preparação destes eletrodos está criticamente dependente da qualidade do grafite.

ELETRODO DE PASTA DE GRAFITE

Um pedaço de 50 mm de tubo de vidro é cortado e uma de suas pontas polida com lixa e alumina para que fique bem

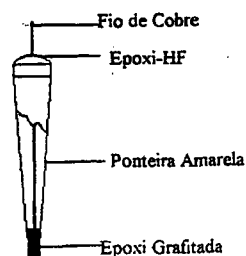


Figura 5. Eletrodo de epoxi grafitada.

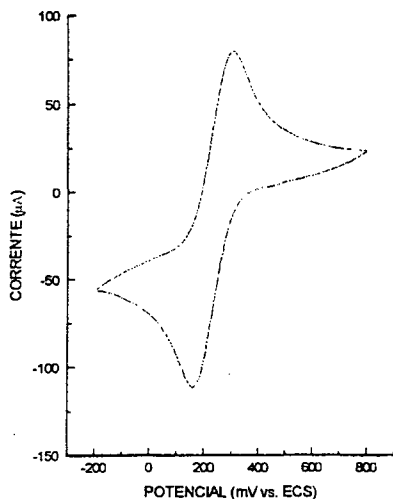


Figura 6. Voltamograma cíclico de uma solução $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} . Eletrólito de suporte KNO_3 (1 molL^{-1}). Eletrodo de epoxi grafitada.

lisa e circularmente uniforme (observe-se sob a lupa). Um pedaço de fio de cobre é colocado em seu interior de modo que haja uma ponta vazia de uns 3 mm (Figura 7). Fixa-se o fio de cobre com epoxi grafitada-HF na extremidade que ficará vazia e com epoxi-HF sem grafite na extremidade que servirá de contato com o potenciostato. Livra-se a ponta vazia de qualquer porção de epoxi grafitada e HF, deixando o vidro bem limpo. Reticula-se a resina epoxi como foi descrito para o eletrodo de epoxi grafitada e lava-se o eletrodo com água, secando-o em seguida. A cavidade vazia será então preenchida com pasta de grafite¹²: 1,5g de grafite são misturados a 0,9 mL de óleo mineral NUJOL até que fique bem homogêneo. Preenche-se a cavidade do eletrodo com esta pasta, evitando-se espaços vazios. Sobre uma folha de papel lisa e limpa, esfrega-se a ponta do eletrodo com movimentos em oito, inicialmente com força e gradualmente de modo mais suave, a fim de obter uma superfície bem lisa. Retira-se qualquer excesso de pasta de grafite antes de usar o eletrodo. A renovação da superfície é feita por remoção escrupulosa da pasta de grafite da ponta, substituindo-a por nova porção. Um eletrodo deste tipo forneceu o voltamograma da figura 8. Resultados melhores podem ser conseguidos pela diminuição da resistência elétrica do eletrodo, por exemplo, pela inserção de um fio de platina entre cobre e pasta de grafite. Mas isto não será necessário se grafite de boa qualidade for usado na resina e na pasta.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ademir Neves (UFSC), pelas orientações e materiais para voltametria de complexos em acetonitrila. À CAPES, CNPq E FINEP, pelo apoio financeiro.

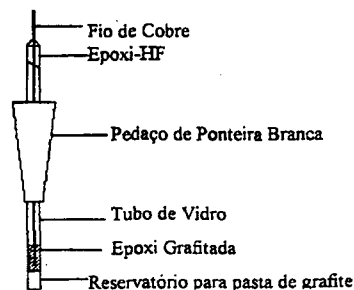


Figura 7. Eletrodo de pasta de grafite.

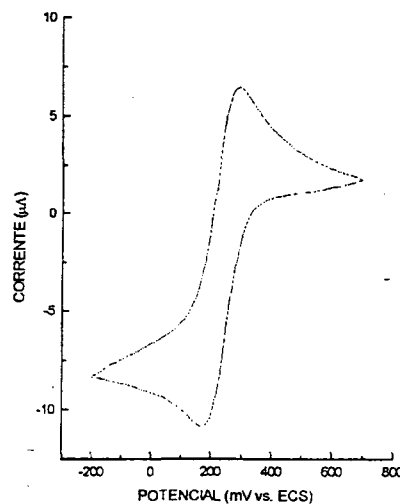


Figura 8. Voltamograma cíclico de uma solução $6 \times 10^{-3} \text{ mol/L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} . Eletrólito de suporte KNO_3 (1 molL^{-1}). Eletrodo de pasta de grafite.

REFERÊNCIAS

- Nóbrega, J. A.; Neves, E. A.; Rocha, F. R. P.; Luccas, P. O.; Oliveira, V.; Gouveia, S. T.; *Quím. Nova* **1996**, *19*, 684.
- Lopes, N.; Fugihara, C. S.; Sumodjo, P. T.; Benedetti, A. V.; *Quím. Nova* **1987**, *10*, 132.
- Boodts, J. F. C.; Galli, A. M.; Bottecchia, O. L.; *Quím. Nova* **1988**, *11*, 228.
- Pela, C. A.; Bruçó, J. L.; Stradiotto, N. R.; *Quím. Nova* **1989**, *12*, 94.
- Reis, B. F.; *Quím. Nova* **1989**, *12*, 282.
- Mazo, L. H.; *Quím. Nova* **1991**, *14*, 87.
- Gruber, J.; Pardini, V. L.; Viertler, H.; *Quím. Nova* **1992**, *15*, 83.
- Reis, B. F.; Giné, M. F.; Kronka, E. A. M.; *Quím. Nova* **1992**, *15*, 231.
- Li, R. W. C.; Nakamura, M. S.; Gruber, J.; *Quím. Nova* **1996**, *19*, 311.
- Sawyer; Hanemann; Beebe; *Chemistry Experiments for Instrumental Methods*; John Wiley & Sons; New York, 1984.
- Galster, H.; *pH Measurement*; VCH; Weinheim, 1991.
- Adams, R. N.; *Electrochemistry at Solid Electrodes*; Marcel Dekker, Inc.; New York, 1969.
- Sawyer, D. T.; Roberts, J. L.; *Electrochemistry for Chemists*; John Wiley & Sons; New York, 1974.
- Henriques, H. P.; Fogg, A. G.; *Analyst* **1984**, *109*, 1195.
- Gagné, R. R.; Koval, C. A.; Lisensky, G. C.; *Inorg. Chem.* **1980**, *19*, 2854.
- Barbour, R.; *Glassblowing for Laboratory Technicians*; Pergamon Press; Oxford, 1978.