



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

CLEIDIVAN SILVA MACENA

Emprego da Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM) na investigação de processos interfaciais visando o desenvolvimento de sensores químicos

São Luís - MA

2017

CLEIDIVAN SILVA MACENA

Emprego da Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM) na investigação de processos interfaciais visando o desenvolvimento de sensores químicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Santos Damos

São Luís - MA

2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Silva Macena, Cleidivan.

Emprego da Microscopia Eletroquímica de Varredura SECM na investigação de processos interfaciais visando o desenvolvimento de sensores químicos / Cleidivan Silva Macena. - 2017.

111 f.

Orientador(a): Flávio Santos Damos.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, UFMA, 2017.

1. GOx. 2. Grafeno. 3. HRP. 4. Nanotubos de carbono. 5. SECM. I. Santos Damos, Flávio. II. Título.

CLEIDIVAN SILVA MACENA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

Aprovado em: _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Flávio Santos Damos (Orientador - UFMA)

Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra (Examinador - UFMA)

Prof. Dr. Leonardo Baltazar Cantanhede (Examinador - IFMA)

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado às crianças adultas que, quando pequenas, sonharam em se tornar cientistas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Flávio Santos Damos, pela excelente orientação, apoio e incentivo investidos.

À Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia da Silva Luz, pelos conselhos e incentivo ao longo desses dois anos.

Aos meus pais, Maria e Raimundo, aos meus irmãos, Cleidson e Layane, pelo incentivo e apoio.

A toda a minha família, avós, tios, primos e sobrinhos, pela torcida e incentivo.

À minha esposa Andréia Silva Gomes, pelo companheirismo, dedicação e apoio.

Ao Companheiro de LabS Sakae Yotsumoto Neto, pelo tempo e ajuda dispensados.

Aos companheiros do LabS com os quais foram divididos os últimos anos de aprendizado.

A Universidade Federal do Maranhão, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica (INCT-Bio) pelo apoio financeiro.

Ao Grande Arquiteto Do Universo, por projetar nossos sonhos interiores em realizações exteriores.

Quanto maior seja o número de olhares, de olhares distintos que saibamos empregar para ver uma mesma coisa, tanto mais completo será nosso 'conceito' sobre ela, tanto mais completa será nossa 'objetividade'.

(Nietzsche)

RESUMO

O presente trabalho demonstrou a potencialidade da Microscopia Eletroquímica de Varredura (Scanning Electrochemical Microscopy - SECM) no entendimento de sistemas enzimáticos usando as enzimas glicose oxidase (GOx) e a peroxidase de raiz forte (HRP) como modelo de reconhecimento. Ademais, avaliou diferentes plataformas, como: Grafeno (Gr) e Nanotubos de Carbono (CNTs) na resposta de sistemas enzimáticos através de curvas de aproximação e imagens. Neste sentido, a reatividade das enzimas GOx e HRP foi avaliada no modo gerador/coletor sobre plataforma isolante. Adicionalmente, a HRP foi estudada comparativamente sobre plataforma de grafeno Gr, CNTs e sobre superfície condutora. O uso da técnica SECM na investigação desses sistemas mostrou sua aplicabilidade na investigação de reações catalisadas por enzimas e mostrou ainda que os CNTs foram a melhor plataforma para imobilização da HRP. Além disso, mostrou a aplicação da SECM em sistemas enzimáticos para a determinação seletiva de compostos isômeros: catecol e hidroquinona.

Palavras-chaves: SECM, HRP, GOx, Grafeno, Nanotubos de carbono.

ABSTRACT

The present work demonstrated the potential of Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) in the understanding of enzymatic systems using the enzymes glucose oxidase (GOx) and the peroxidase of strong root (HRP) as recognition model. In addition, it evaluated different platforms, such as: Graphene (Gr) and Carbon Nanotubes (CNTs) in the response of enzymatic systems through approximation curves and images. In this sense, the reactivity of the GOx and HRP enzymes was evaluated in the generator / collector mode on an insulating platform. In addition, the HRP was studied comparatively on graphene platform Gr, CNTs and on conductive surface. The use of the SECM technique in the investigation of these systems showed its applicability in the investigation of reactions catalyzed by enzymes and also showed that CNTs were the best platform for immobilization of HRP. In addition, it showed the application of SECM in enzymatic systems for the selective determination of compounds isomers: catechol and hydroquinone.

Keywords: SECM, HRP, GOx, Graphene, Carbon nanotubes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Componentes do SECM. 1) microeletrodo, 2) substrato, 3) (bi)potentiostato, 4) eletrodos de referência e auxiliar, 5) sistema de posicionamento (x, y, z), 6) microcomputador.....	20
Figura 2 - Diagrama esquemático de uma célula eletroquímica usada em SECM...21	21
Figura 3 - Representação esquemática das diferentes geometrias e padrões difusionais (representados pelas setas) para microeletrodos. a) microeletrodo esférico, b) microeletrodo hemisférico, c) microeletrodo de disco, d) microeletrodo de anel.	22
Figura 4 - Representação esquemática das linhas de campo difusional para, a) macroeletrodos de disco, b) microeletrodos de disco.	23
Figura 5 - Representação esquemática do transporte massa em eletrodos.	24
Figura 6 - Variação do perfil de concentração em função da distância e do tempo de eletrólise de espécies solúveis para uma região controlada por difusão em macroeletrodo.	27
Figura 7 - Perfil de uma curva cronoamperométrica teórica para macroeletrodos com geometria de disco.	28
Figura 8 - Variação do perfil de concentração em função da distância e do tempo de eletrólise de espécies solúveis para uma região controlada por difusão em microeletrodo.....	30
Figura 9 - Perfil de uma curva cronoamperométrica teórica para microeletrodos com geometria de disco.	31
Figura 10 - Representação esquemática mostrando o fenômeno de <i>Feedback Positivo</i>	35
Figura 11 - Efeito do R_g sobre o perfil das curvas de aproximação teóricas para o modo de Feedback Positivo.	38
Figura 12 - Representação esquemática mostrando o fenômeno de Feedback Negativo.	39
Figura 13 - Efeito do R_g sobre o perfil das curvas de aproximação teóricas para o modo de Feedback Negativo.....	40
Figura 14 - Esquema do modo Microeletrodo Gera/ Substrato Coleta.	41
Figura 15 - Esquema do modo Substrato Gera/ Microeletrodo Coleta.	42

Figura 16 - Esquema do modo de imagem em SECM.	43
Figura 17 - Diferentes Categorias de biossensores e formas de transdução do sinal.	44
Figura 18 - Representação tridimensional da estrutura quaternária da glicose oxidase com o cofator FAD em destaque.	48
Figura 19 - Representação tridimensional da estrutura quaternária da peroxidase de raiz forte (isoenzima C) com o grupo Heme em destaque feita por cristalografia de raios-X.	50
Figura 20 - (Bi)Potenciostato-Galvanostato AUTOLAB 128N da Metrohm-Pensalab.	53
Figura 21 - Microscópio Eletroquímico de Varredura.	54
Figura 22 - Representação esquemática do substrato de referência.	54
Figura 23 - Célula usada em Microscopia Eletroquímica de Varredura.	55
Figura 24 - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de ferricianeto de potássio 5 mmol.L ⁻¹ em KCl 0,1 mol.L ⁻¹ utilizando microeletrodos de platina. (a) e (c) microeletrodo com raio nominal de 5 µm. (b) e (d) microeletrodo de raio nominal 12,5 µm. Velocidade de varredura de 100 mV.s ⁻¹ . O voltamograma em (A) foi realizado sobre substrato condutor e em (B) sobre substrato isolante. Os voltamogramas em (C) foram simulados nas mesmas condições dos voltamogramas experimentais. ...	59
Figura 25 - Curvas de aproximação SECM no modo de <i>Feedback</i> de corrente normalizada vs. distância normalizada utilizando microeletrodo A) 5 µm B) 12,5 µm em superfícies a) e c) condutora, b) e d) isolante em solução de ferricianeto de potássio 5 mmol.L ⁻¹ em KCl 0,1 mol.L ⁻¹ . O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl _(KCl sat.) . Velocidade aproximação de 10 µm.s ⁻¹	62
Figura 26 - Varredura lateral no eixo x usando o modo operacional de <i>Feedback</i> obtidas em solução de ferricianeto de potássio 5 mmol.L ⁻¹ em KCl 0,1 mol.L ⁻¹ utilizando microeletrodos de platina a) microeletrodo de raio 5 µm, b) microeletrodo de raio 12,5 µm. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl _(KCl sat.) . Velocidade lateral de 10 µm.s ⁻¹	64
Figura 27 - Voltamogramas cíclicos realizados em PBS 0,1 mol.L ⁻¹ (pH=7,0) em microeletrodo de platina (Pt) raio 12,5 µm variando a concentração de H ₂ O ₂ em a) PBS, b) 0,5 mmol.L ⁻¹ , c) 1,0 mmol.L ⁻¹ , d) 1,5 mmol.L ⁻¹ , e) 2,0 mmol.L ⁻¹ ...	66

- Figura 28** - Curvas de aproximação do microeletrodo frente ao substrato isolante modificado com a enzima glicose oxidase obtidas por SECM (corrente normalizada vs. distância normalizada). As curvas de aproximação foram obtidas a) na ausência de GOx e b) na presença de GOx em 5 mmol.L⁻¹ de glicose. Todas as medidas foram obtidas na presença de oxigênio molecular (ar em equilíbrio). O potencial aplicado ao microeletrodo foi +600 mV vs. Ag/AgCl (KCl sat.). Velocidade de aproximação de.....67
- Figura 29** - Diagrama esquemático do mecanismo reacional da GOx empregando a glicose como substrato e o par O₂/H₂O₂ para as medidas de SECM.....68
- Figura 30** - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,00) em superfície isolante com GOx imobilizada variando a concentração de glicose a) 1,0 mmol.L⁻¹, b) 5,0 mmol.L⁻¹, c) 10 mmol.L⁻¹, d) 20 mmol.L⁻¹, e) 30 mmol.L⁻¹ e f) 50 mmol.L⁻¹ (usando como mediador redox o oxigênio molecular). O potencial aplicado ao microeletrodo foi de +600 mV vs. Ag/AgCl (KCl sat.). Velocidade de aproximação de 2,5 μm.s⁻¹.....69
- Figura 31** - Imagens SECM obtidas em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,00) com uma concentração de glicose de 30 mmol.L⁻¹ e microeletrodo polarizado em +600 mV vs. Ag/AgCl(KCl sat.). Na Figura 27(A) na presença de GOx e 27(B) na ausência de GOx. Velocidade de aquisição da imagem 25 μm.s⁻¹ em uma região de (200 μm – 200 μm) nos eixos x-y, respectivamente.70
- Figura 32** - Voltamogramas cíclicos realizados em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) em microeletrodo de platina (Pt) raio 12,5 μm variando a concentração de H₂Q em a) PBS, b) 0,5 mmol.L⁻¹, c) 1 mmol.L⁻¹, d) 1,5 mmol.L⁻¹, e) 2,0 mmol.L⁻¹. Velocidade de varredura 100 mV.s⁻¹.....73
- Figura 33** - Diagrama esquemático do mecanismo eletrocatalítico de reação da HRP usando o par redox H₂Q/BQ e peróxido de hidrogênio no modo de SG/TC SECM. .74
- Figura 34** - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP imobilizada em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂Q e variando a concentração de H₂O₂ em a) 0,2 mmol.L⁻¹, b) 0,4 mmol.L⁻¹, c) 0,6 mmol.L⁻¹; d) 1,0 mmol.L⁻¹, e) 2,0 mmol.L⁻¹. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl(KCl sat.). Velocidade de aproximação de 10 μm.s⁻¹.75

Figura 35 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP imobilizada em PBS 0,1 mol.L ⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L ⁻¹ de H ₂ O ₂ e variando a concentração de H ₂ Q em a) 0,2 mmol.L ⁻¹ , b) 0,4 mmol.L ⁻¹ , c) 0,6 mmol.L ⁻¹ ; d) 1,0 mmol.L ⁻¹ , e) 2,0 mmol.L ⁻¹ . O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl _(KCl sat.) . Velocidade de aproximação de 10 μm.s ⁻¹	76
Figura 36 - Representação esquemática da estrutura cristalográfica do grafeno.....	77
Figura 37 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP/Gr imobilizada em PBS 0,1 mol.L ⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L ⁻¹ de H ₂ Q e variando a concentração de H ₂ O ₂ em a) 0,2 mmol.L ⁻¹ , b) 0,4 mmol.L ⁻¹ , c) 0,6 mmol.L ⁻¹ ; d) 1,0 mmol.L ⁻¹ , e) 2,0 mmol.L ⁻¹ . O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl _(KCl sat.) . Velocidade de aproximação de 10 μm.s ⁻¹	78
Figura 38 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP/Gr imobilizada em PBS 0,1 mol.L ⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L ⁻¹ de H ₂ O ₂ e variando a concentração de H ₂ Q em a) 0,2 mmol.L ⁻¹ , b) 0,4 mmol.L ⁻¹ , c) 0,6 mmol.L ⁻¹ ; d) 1,0 mmol.L ⁻¹ , e) 2,0 mmol.L ⁻¹ . O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl _(KCl sat.) . Velocidade de aproximação de 10 μm.s ⁻¹	80
Figura 39 - Estrutura helicoidal esquemático de uma folha de grafeno e as diferentes formas de formação dos nanotubos de carbono (CNTs).....	81
Figura 40 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP/CNTs imobilizada em PBS 0,1 mol.L ⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L ⁻¹ de H ₂ Q e variando a concentração de H ₂ O ₂ em a) 0,2 mmol.L ⁻¹ , b) 0,4 mmol.L ⁻¹ , c) 0,6 mmol.L ⁻¹ ; d) 1,0 mmol.L ⁻¹ , e) 2,0 mmol.L ⁻¹ . O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl _(KCl sat.) . Velocidade de aproximação de 10 μm.s ⁻¹	82
Figura 41 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP/CNTs imobilizada em PBS 0,1 mol.L ⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L ⁻¹ de H ₂ O ₂ e variando a concentração de H ₂ Q em a) 0,2 mmol.L ⁻¹ , b) 0,4 mmol.L ⁻¹ , c) 0,6 mmol.L ⁻¹ ; d) 1,0 mmol.L ⁻¹ , e) 2,0 mmol.L ⁻¹ . O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl _(KCl sat.) . Velocidade de aproximação de 10 μm.s ⁻¹	83

Figura 42 - Imagens SECM obtidas em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) com uma concentração de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂Q e 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e microeletrodo polarizado em -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.) com a enzima HRP/ CNTs imobilizada. Velocidade de aquisição da imagem 25 μm.s⁻¹.85

Figura 43 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície condutora com HRP/CNTs imobilizada em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂Q e variando a concentração de H₂O₂ em a) 0,2 mmol.L⁻¹, b) 0,4 mmol.L⁻¹ , c) 0,6 mmol.L⁻¹, d) 0,8 mmol.L⁻¹, e) 1,0 mmol.L⁻¹ e f) 2,0 mmol.L⁻¹. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.). Velocidade de aproximação de 10 μm.s⁻¹.86

Figura 44 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície condutora com HRP/CNTs imobilizada em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e variando a concentração de H₂Q em a) 0,2 mmol.L⁻¹, b) 0,4 mmol.L⁻¹ , c) 0,6 mmol.L⁻¹, d) 0,8 mmol.L⁻¹, e) 1,0 mmol.L⁻¹ e f) 2,0 mmol.L⁻¹. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.). Velocidade de aproximação de 10 μm.s⁻¹.88

Figura 45 - Imagens SECM obtidas em ferricianeto de potássio 5 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹ e microeletrodo polarizado em -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.) com a enzima HRP/CNTs imobilizada sobre eletrodo de ouro. Velocidade de aquisição da imagem 75 μm.s⁻¹ em uma região de (500 μm - 500 μm) nos eixos x e y, respectivamente. .89

Figura 46 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP/CNTs imobilizada em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de CC e variando a concentração de H₂O₂ em a) 0,2 mmol.L⁻¹, b) 0,4 mmol.L⁻¹, c) 0,6 mmol.L⁻¹, d) 0,8 mmol.L⁻¹, e) 1,0 mmol.L⁻¹ e f) 2,0 mmol.L⁻¹. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.). Velocidade de aproximação de 10 μm.s⁻¹.91

Figura 47 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP/CNTs imobilizada em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e variando a concentração de CC em a) 0,2 mmol.L⁻¹, b) 0,4 mmol.L⁻¹, c) 0,6 mmol.L⁻¹, d) 0,8 mmol.L⁻¹, e) 1,0 mmol.L⁻¹ e f) 2,0 mmol.L⁻¹. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.). Velocidade de aproximação de 10 μm.s⁻¹.92

- Figura 48** - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície condutora com HRP/CNTs imobilizada em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de CC e variando a concentração de H₂O₂ em a) 0,2 mmol.L⁻¹, b) 0,4 mmol.L⁻¹, c) 0,6 mmol.L⁻¹, d) 0,8 mmol.L⁻¹, e) 1,0 mmol.L⁻¹ e f) 2,0 mmol.L⁻¹. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.). Velocidade de aproximação de 10 μm.s⁻¹.93
- Figura 49** - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP/CNTs imobilizada em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e variando a concentração de CC em a) 0,2 mmol.L⁻¹, b) 0,4 mmol.L⁻¹, c) 0,6 mmol.L⁻¹, d) 0,8 mmol.L⁻¹, e) 1,0 mmol.L⁻¹ e f) 2,0 mmol.L⁻¹. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.). Velocidade de aproximação de 10 μm.s⁻¹.94
- Figura 50** - Voltamogramas cíclicos referentes ao eletrodo de ouro, (curva 1) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ H₂Q e (curva 2) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ CC. Os voltamogramas foram obtidos no intervalo de potencial de -200 a 400 mV vs. Ag/AgCl em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH = 7,0). Velocidade de varredura 100 mV.s⁻¹.95
- Figura 51** - Curvas cronoamperométrica com HRP/CNTs imobilizada sobre superfície condutora em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e variando a concentração de H₂Q, A) em Branco (preta), 0,05 mmol.L⁻¹ (vermelha), 0,15 mmol.L⁻¹ (azul), d) 0,25 mmol.L⁻¹ (rosa), e) 0,40 mmol.L⁻¹ (verde). B) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e variando a concentração de CC, Branco (preta), 0,05 mmol.L⁻¹ (vermelha), 0,15 mmol.L⁻¹ (azul), d) 0,25 mmol.L⁻¹ (rosa), e) 0,40 mmol.L⁻¹ (verde). O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.).96
- Figura 52** - Relação entre a corrente de redução versus a concentração de H₂Q e CC em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e variando a concentração de H₂Q (50 – 400 μmol.L⁻¹) (Preta). Na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e variando a concentração de CC, (50 – 400 μmol.L⁻¹) (Vermelha). O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.).98

LISTA DE TABELA

- Tabela 1** - Dependência dos coeficientes k_1 , k_2 , k_3 e k_4 , k_1' , k_2' , k_3' , k_4' , em função do R_g do microeletrodo em forma de disco para uma reação sob controle difusional para *Feedback Negativo* e *Feedback Positivo*.34
- Tabela 2** - Algumas coenzimas que servem como carregadores transitórios de átomos ou grupos funcionais específicos.....46
- Tabela 3** - Alguns íons inorgânicos que servem de cofatores para enzimas.47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM: Microscópio de Força Atômica (Atomic Force Microscope)

D_j : Coeficiente de Difusão

FB: Modo de Feedback (Feedback Mode)

GC: Modo Gerador/Coletor (Gerador/Coletor Mode)

GOx: Glicose Oxidase

HRP: Peroxidase de raiz forte (Horseradish Peroxidase)

I_C : Corrente Capacitiva

I_d : Corrente Difusional

I_F : Corrente Faradaica

I_N : Corrente Normalizada

iR : Queda Ôhmica

$J_j(x)$: Densidade de Corrente

PBS: Fosfato monobásico de potássio (KCl/KH₂PO₄)

R_g: Registro do Microeletrodo: definido como a razão entre o raio da parte isolante e o raio da parte condutora ($R_g = a_{vidro} / a$)

SECM: Microscopia Eletroquímica de Varredura (Scanning Electrochemical Microscopy)

SG-TG: Substrato Gera/Microeletrodo Coleta (Substrate Generation/Tip Collection)

SPM: Microscopia de Varredura por Sonda (Scanning Probe Microscopy)

STM: Microscopia de Varredura por Tunelamento (Scanning Tunneling Microscopy)

TG-SC: Microeletrodo Gera/Substrato Coleta (Tip Generation/ Substrate Collection)

IBM: International Business Machines

kD: KiloDalton

FAD: Dinucleótido de Flavina e Ademina (Flavin-Adenine-Dinucleotide)

CNTs: Nanotubos de Carbono (Carbon nanotubes)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Princípios da Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM)	19
1.2 Microeletrodos	21
1.2.1 Geometria em Microeletrodos	22
1.2.2 Padrão de Difusão em Eletrodos	23
1.2.3 Transporte de Massa em Eletrodos: efeitos sobre corrente e concentração	24
1.3 Modos de Operação da SECM	32
1.3.1 Modo de Feedback	32
1.3.2 Modo Amperométrico Gerador/Coletor (G/C)	41
1.3.3 Modo de Imagem	43
1.4 Sensores Químicos	44
1.5 Enzimas	45
1.5.1 Glicose Oxidase (GOx)	47
1.5.2 Peroxidase de raiz forte (HRP)	49
2 OBJETIVOS	52
2.1 Geral	52
2.2 Específicos	52
3 PARTE EXPERIMENTAL	53
3.1 Equipamentos e Materiais	53
3.2 Reagentes Utilizados	56
3.3 Procedimentos Analíticos	57
3.3.2 Formação dos filmes de HRP	57
3.3.4 Formação dos filmes de HRP Nanotubos de Carbono	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 Caracterização dos Microeletrodos	59
4.2 Aplicações da SECM na investigação da reatividade da enzima glicose oxidase	65
4.3 Aplicações da SECM na investigação da reatividade da enzima peroxidase de raiz forte sobre diferentes plataformas	72

4.3.1	Curvas de aproximação SECM sobre substrato isolante para HRP	74
4.3.2	Curvas de aproximação SECM sobre substrato isolante para HRP/Gr ...	77
4.3.3	Curvas de aproximação SECM sobre substrato isolante para HRP/CNTs	81
4.3.4	Curvas de aproximação SECM sobre substrato condutor para HRP/ CNTs	86
4.3.5	Estudos de Microscopia Eletroquímica de Varredura da HRP/ CNTs sobre substrato isolante e condutor usando o catecol como mediador redox.....	90
4.3.6	Estudos Voltamétricos e Cronoamperométricos em compostos isoméricos	95
REFERÊNCIAS.....		100

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o interesse no entendimento de processos superficiais e interfaciais tem suscitado uma intensa pesquisa na área de desenvolvimento de técnicas microscópicas aplicáveis aos mais variados tipos de superfícies. No início da década de 80 foram delineados os primeiros avanços relacionados ao desenvolvimento de técnicas microscópicas baseadas em varredura por sonda (*Scanning Probe Microscopy* - SPM). Tais técnicas foram projetadas para operar microeletrodos de prova cujas dimensões são próximas à escala atômica de forma que a mesma seja apta a atuar como sonda para o estudo de processos físicos e/ou químicos de superfícies e interfaces com elevada resolução (OPHUS et al., 2016; LIANG et al., 2016).

Os primeiros avanços em SPM vieram através do desenvolvimento da Microscopia de Varredura por Tunelamento (*Scanning Tunneling Microscopy* - STM), desenvolvida em 1981 nos Laboratórios da IBM em Zurique, como resultado do trabalho de Gerd Binnig e Heinrich Rohrer (BINNIG et al., 1982). Em 1985, usando o princípio da STM, Binnig e colaboradores desenvolveram o Microscópio de Força Atômica (*Atomic Force Microscope* - AFM) (BINNIG et al., 1986). Posteriormente, em 1986, os pesquisadores Royce C. Engstrom e Allen J. Bard realizaram, simultaneamente em seus grupos de pesquisa, experimentos que são considerados precursores no desenvolvimento da microscopia eletroquímica (WITTSTOCK et al., 2007).

Engstrom e colaboradores foram os primeiros a realizarem experimentos onde microeletrodos foram posicionados próximo à superfície de um macroeletrodo, possibilitando a investigação da atividade eletroquímica na camada de difusão deste último (ENGSTROM et al., 1986). Porém, o termo Microscopia Eletroquímica de Varredura (*Scanning Electrochemical Microscopy* - SECM) foi introduzido posteriormente por Kwak e Bard, em um artigo onde esses pesquisadores desenvolveram a teoria do modo operacional *Feedback* para SECM (KWAK; BARD, 1989).

No que diz respeito às técnicas de varredura por sonda (SPM), a Microscopia Eletroquímica de Varredura tem se destacado por ser uma poderosa técnica de análise qualitativa e quantitativa (BOTTOMLEY et al., 1998; LU et al., 2007; BARD;

MIRKIN, 2012). A SECM explora as características únicas dos microeletrodos aliadas a um sistema de posicionamento de forma a proporcionar informações que vão desde topográficas até aquelas relacionadas às atividades eletroquímicas de inúmeros sistemas (BARKER et al., 1999; MIRKIN, 1999; AMEMIYA et al., 2000).

De fato, a SECM pode fornecer informações sobre a topografia, propriedades elétricas e químicas de superfícies e interfaces dependendo da natureza e da condutividade dos substratos analisados (condutores, semicondutores e isolantes), à medida que um microeletrodo é movida próximo à superfície destes (BARD et al., 1989; KWAK; BARD, 1989).

Pode-se afirmar, portanto, que a SECM é uma excelente ferramenta no que se refere ao desenvolvimento de dispositivos bioanalíticos, pois a mesma permite mapear reações químicas locais e possibilita a extração de dados cinéticos de reações homogêneas e heterogêneas, em especial, às enzimáticas que ocorrem em interfaces sólidas/líquidas, como no caso das superfícies modificadas com enzimas peroxidases (BARD, 2012; GUADAGNINI et al., 2007). Além disso, a detecção das atividades enzimáticas podem ser realizadas usando o modo Gerador/Coletor (*Mode Gerador/Coletor - GC*) ou modo de *Feedback* (*Mode de Feedback - FB*) (DAVID et al., 1992; BURCHARDT; WITTSTOCK, 2008; PELLISSIER et al., 2008; CORNUT; HAPIOT; LEFROU, 2009).

Nesse âmbito, pode-se afirmar que a SECM tem se mostrado um método promissor na investigação de diversos processos e reações eletroquímicas que ocorrem em superfícies e interfaces, possibilitando o entendimento de processos envolvidos nas mais variadas áreas incluindo: nanotecnologia (MOLINA et al., 2011; JOSHI et al., 2012); ciência dos materiais (APARNA et al., 2013; FERNÁNDEZ et al., 2015); corrosão (IZQUIERDO et al., 2010; PÉREZ et al., 2014); eletrocatalise (ASSUMPÇÃO et al., 2011; REIS et al., 2014) e sensores químicos (ZIGAH et al., 2009; MATOS et al., 2010; JUSTINO et al., 2015).

No que compete à área de sensores químicos, os biosensores tem recebido grande destaque, em especial, os que usam como elemento de reconhecimento enzimas redox, uma vez que tais sistemas são capazes de catalisar reações de forma seletiva e com grande eficiência catalítica (DAVID et al., 1992; GUADAGNINI et al., 2007).

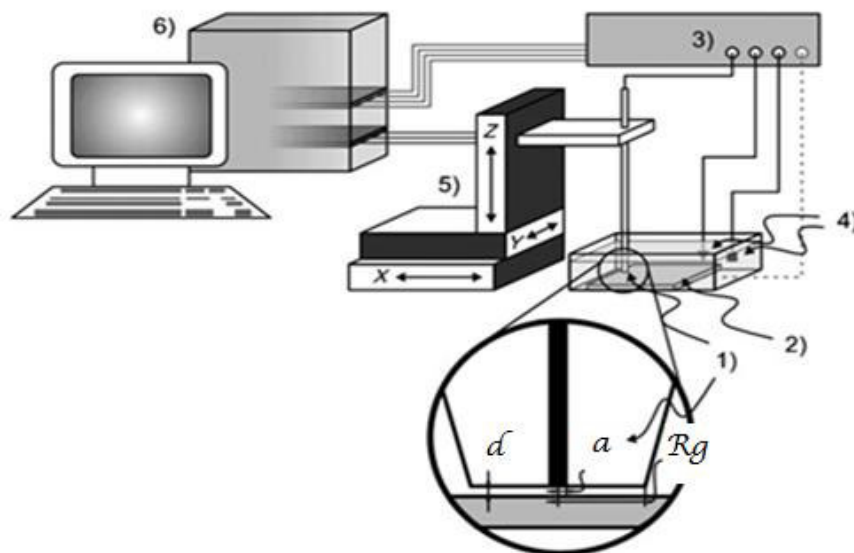
Neste contexto, o presente trabalho tem como propósito utilizar a SECM como ferramenta de entendimento de processos enzimáticos em superfícies bem como os efeitos de algumas plataformas a base materiais de carbono (exemplo: grafeno (Gr) e nanotubos de carbono (CNTs) na cinética enzimática). Nesse sentido, uma breve explanação sobre os princípios de funcionamento e aplicações da SECM são apresentadas a seguir.

1.1 Princípios da Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM)

A Microscopia Eletroquímica de Varredura consiste fundamentalmente de um sistema de posicionamento de alta resolução, um (bi)potenciostato, um microcomputador e uma célula eletroquímica. O sistema de posicionamento SECM inclui os elementos de posicionamento piezelétricos bem como um sistema de motores de passo com elevada resolução espacial. Esse sistema controla o deslocamento do microeletrodo nas coordenadas x, y e z, assim como, a velocidade de passo do microeletrodo sobre a superfície de interesse (BARKER et al., 1999; BARD; MIRKIN, 2001).

A aquisição de dados tem início com o uso de um (bi)potenciostato, que controla o potencial elétrico aplicado ao microeletrodo, e amplifica o seu sinal. Após a amplificação, o sinal é adquirido com um conversor analógico para digital e armazenado em um microcomputador. O software do computador é necessário para controlar o sistema de aquisição de dados e de posicionamento, bem como para apresentar e analisar os dados SECM (WITTSTOCK et al., 2007; BARD; MIRKIN, 2012). Uma ilustração do instrumento SECM é mostrada na Figura 1.

Figura 1 - Componentes do SECM. 1) microeletrodo, 2) substrato, 3) (bi)potenciostato, 4) eletrodos de referência e auxiliar, 5) sistema de posicionamento (x, y, z), 6) microcomputador.

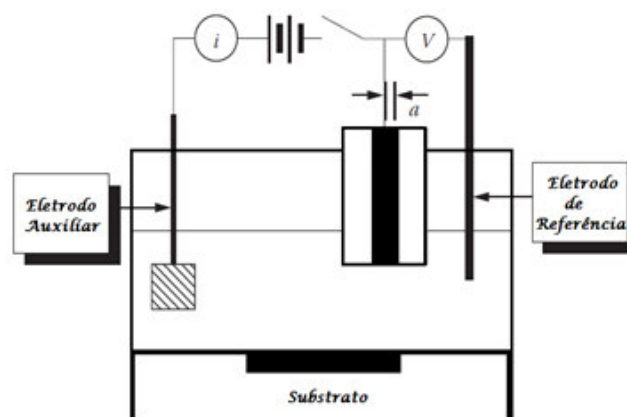


Fonte: WITTSTOCK et al., 2007

Nessa Figura, destaca-se o microeletrodo posicionado a uma distância (d) de um determinado substrato. O microeletrodo de raio (a) (parte condutora) está selado em um isolador de vidro. O registro do microeletrodo, ou seja, a razão entre o raio da parte isolante e o raio da parte condutora é definida como: $Rg = a_{vidro}/a$, onde a_{vidro} , representa o raio da parte isolante.

Na célula eletroquímica usada em SECM, os eletrodos são conectados a um (bi)potenciostato responsável pelo controle do potencial elétrico aplicado ao microeletrodo em relação eletrodo de referência (WITTSTOCK et al., 2007; BARD; MIRKIN, 2012). Na SECM, esta célula, pode conter três ou quatro eletrodos, sendo eles: eletrodo de referência, eletrodo auxiliar; o microeletrodo (como primeiro eletrodo de trabalho) e o substrato (como segundo eletrodo de trabalho), como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Diagrama esquemático de uma célula eletroquímica usada em SECM.



Fonte: Adaptado de BARD; MIRKIN, 2012

No que diz respeito aos microeletrodos, estes tem proporcionado um grande impacto na pesquisa eletroquímica fundamental e aplicada (STULÍK, K. et al., 2000; PLETCHER, 1991). A seguir são apresentadas algumas das principais características dos microeletrodos dada a relevância na pesquisa eletroquímica recente envolvendo a SECM.

1.2 Microeletrodos

No início da década de 1970, Wightman e Fleischmann, de forma independente, propuseram o conceito de microeletrodo. De acordo com estes, os microeletrodos são eletrodos que possuem uma de suas dimensões em tamanho micrométrico (PONCHON et al., 1979; WIGHTMAN, 1981; FLEISCHMANN; MULLER, 1985). Contudo, considerando que a escala de tempo na qual o experimento eletroquímico é realizado exerce profundas influências sobre as respostas características dos microeletrodos, uma definição moderna consiste que “microeletrodos são eletrodos que dentro de uma dada condição experimental, seja comparável ou menor que a camada de difusão” (PAIXÃO, 2009).

Dessa forma, os microeletrodos possuem algumas características eletroquímicas únicas frente aos macroeletrodos, tais como: permitem o monitoramento de processos eletroquímicos em microssegundos ou nanossegundos; possuem uma elevada razão entre a corrente faradaica e a

corrente capacitiva (I_f/I_c), queda ôhmica (iR) é desprezível por consequência dos baixos valores de correntes monitoradas. Além disso, o transporte de massa em microeletrodos é muito eficiente, o que possibilita aos mesmos operarem em estado estacionário ou pseudo-estacionário (FORSTER, 1994; PAIXÃO, 2009).

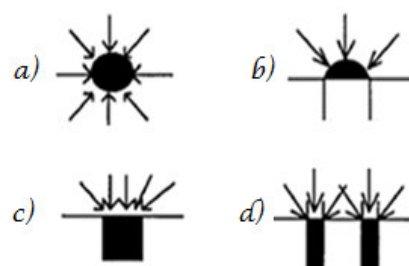
Pelo exposto, fica evidente que os microeletrodos ampliam as possibilidades de estudo na ciência, em especial à eletroanalítica, permitindo que novas áreas (células individuais, membranas porosas), diferentes escalas de tempo (estado estacionário, rápidas varreduras), variados ambientes (solventes não aquosos, eletrólitos não suportados), e aspectos metodológicos (cinética, estudo de moléculas individuais) possam ser investigados (ZOSKI, 2006).

De acordo com os tipos de experimentos a serem realizados, os microeletrodos podem ainda sofrer variações em seus formatos geométricos, raio e Rg .

1.2.1 Geometria em Microeletrodos

Os microeletrodos podem ser confeccionados com diversos formatos geométricos dependendo do tipo de análise a ser empregada (eletroanálise *in vivo* ou *in natura*, eletrodeposição de núcleos isolados), podendo ainda, ser encontrados isolados ou em forma de arranjos. As geometrias mais encontradas em microeletrodo são: microeletrodo esférico, microeletrodo hemisférico, microeletrodo de disco, microeletrodo de anel (CORREIA et al., 1995; ZOSKI, 2006). Na Figura 3, são apresentados os principais tipos de microeletrodos empregados atualmente.

Figura 3 - Representação esquemática das diferentes geometrias e padrões difusionais (representados pelas setas) para microeletrodos. a) microeletrodo esférico, b) microeletrodo hemisférico, c) microeletrodo de disco, d) microeletrodo de anel.



Fonte: CORREIA et al., 1995

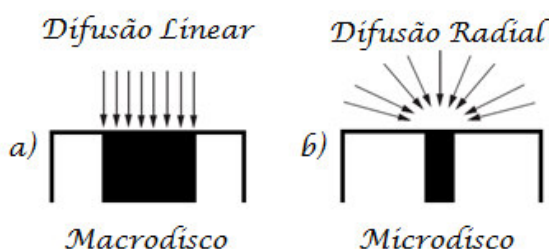
Microeletrodos de metais nobres como platina e ouro, assim como de fibra de carbono podem ser adquiridos comercialmente mas também podem ser confeccionados (CORREIA et al., 1995). Diferentes métodos estão disponíveis para a construção de microeletrodos nos mais variados formatos, porém, os microeletrodos em forma de microdisco são os mais fáceis de serem confeccionados mediante o encapsulamento de um microfio de metal em uma matriz de vidro ou de epóxi (CHING; DUDEK; TABET, 1994).

1.2.2 Padrão de Difusão em Eletrodos

O processo de difusão de espécies do seio da solução até a superfície de um eletrodo depende essencialmente da geometria e das dimensões utilizadas. Neste sentido, quando o potencial do (micro ou macro)eletrodo passa de uma condição onde não há reação para uma condição onde ocorre uma reação eletroquímica há a geração de um fluxo de espécies que estabelece um padrão de difusão (TICIANELLI; GONZALEZ, 2013).

Em macroeletrodos com geometria de disco, a difusão ocorre linearmente (BRETT; BRETT, 1993). Por outro lado, a transferência de massa por difusão no microeletrodo de disco ocorre de forma radial. (LEE; AMEMIYA; BARD, 2001). A Figura 4 mostra a regime diferenciado para microeletrodos.

Figura 4 - Representação esquemática das linhas de campo difusional para, a) macroeletrodos de disco, b) microeletrodos de disco.



Fonte: Elaborado pelo Autor

A difusão das espécies da solução para o microeletrodo em forma de disco ocorre radialmente fazendo com que o transporte de massa ocorra de forma tão

eficaz que numa pequena escala de tempo o sistema atinge o estado estacionário. Tal característica do transporte de massa em microeletrodo é denominado efeito de borda tendo em vista que é atribuído à curvatura das bordas da camada de difusão nas extremidades do microeletrodo.

1.2.3 Transporte de Massa em Eletrodos: efeitos sobre corrente e concentração

Com o propósito de expor a relação entre o padrão de transporte de massa e as características da corrente elétrica e perfil de concentração de espécies eletroativas na interface eletrodo-solução partiremos da seguinte reação eletroquímica global:



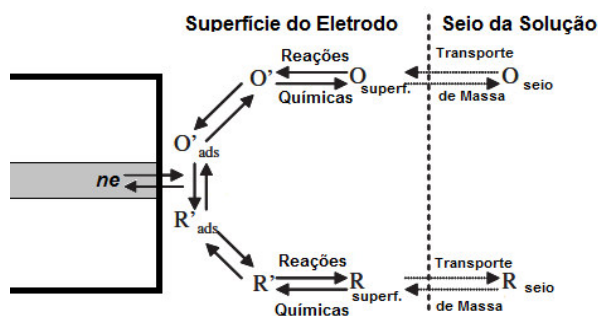
onde, **R** representa a espécie reduzida e **O** é a forma oxidada.

De forma geral, a corrente elétrica gerada por esse processo é regida por várias etapas tais como:

- Transferência de massa;
- Transferência eletrônica na superfície do eletrodo;
- Reações químicas anteriores ou posteriores à transferência de elétrons;
- Reações de superfície tais como adsorção, dessorção e cristalização.

Esses processos são mostrados de forma esquemática na Figura 5.

Figura 5 - Representação esquemática do transporte massa em eletrodos.



Fonte: adaptado de BARD; LARRY, 1980

O transporte de massa do seio da solução até a superfície de um eletrodo ocorre por três distintos processos, sendo estes: migração, difusão e convecção. A equação diferencial que modela esse fenômeno é a equação diferencial parcial de Nernst-Plank (BARD; LARRY, 1980). Considerando a atividade das espécies iguais a concentração $a_j \cong C_j$, para fins de simplificação, a equação pode ser escrita como:

$$J_j(x) = -D_j \left[\frac{\partial C_j(x)}{\partial x} \right] - \frac{z_j F}{RT} D_j C_j \left[\frac{\partial \varphi(x)}{\partial x} \right] + C_j v(x) \quad \text{Eq. 2}$$

onde, $J_j(x)$ é o fluxo ou densidade de corrente da espécie j ($\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$) a uma distância x da superfície do eletrodo, $\frac{\partial C_j(x)}{\partial x}$ é o gradiente de concentração na região interfacial, $\frac{\partial \varphi(x)}{\partial x}$ é o gradiente de potencial, z_j e D_j são a carga (adimensional) e o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), respectivamente. C_j é a concentração (mol cm^{-3}) e $v(x)$ é a velocidade (cm s^{-1}) com os quais um elemento de volume na solução se move ao longo do eixo (BARD; LARRY, 1980).

O primeiro termo do segundo membro da Equação (2) está relacionado com os processos de difusão, o segundo termo se relaciona com os processos de migração e o terceiro termo está relacionado com convecção das espécies j em solução.

Para fins de simplificação, a Equação (2) é apresentada e discutida no seu formato unidimensional, contudo tal aspecto não reduz a aplicabilidade da mesma aos casos tridimensionais reais (BARD; LARRY, 1980; BOCKRIS; REDDY; GAMBOA-ALDECO, 2000). Conforme pode ser observado, o primeiro termo do segundo membro da equação de Nernst-Plank coincide com a primeira lei de difusão de Fick (MIJNLIEFF; VREEDENBERG, 1966), escrita na Equação (3).

$$J_j(x) = -D_j \left[\frac{dC_j(x)}{dx} \right] \quad \text{Eq. 3}$$

Essa última equação diferencial mostra que $J_j(x)$ é proporcional ao gradiente de concentração das espécies eletroativas na ausência de efeitos do campo elétrico e convecção forçada. O sinal negativo indica que a concentração do analito diminui no sentido da difusão. Nesse sentido, considerando a Equação (1), pode-se afirmar que

a concentração da espécie na forma reduzida (**R**) decresce nas proximidades da superfície do eletrodo, enquanto que, ocorre um aumento na mesma proporção da espécie oxidada (**O**) (BARD; LARRY, 1980).

Outro importante aspecto associado com o transporte de massa controlado por difusão, reside no entendimento da variação da concentração das espécies eletroativas com o tempo e com a distância da superfície do eletrodo (BRETT; BRETT, 1993). A relação entre a concentração de espécies, o tempo e a distância pode ser avaliada mediante a solução da segunda lei de Fick aplicando-se as condições de contorno apropriadas (MIJNLIEFF; VREEDENBERG, 1966). A seguir é apresentada a segunda Lei de Fick da difusão como ponto de partida para obtenção das funções $I(t)$ e $C(x,t)$:

$$\frac{\partial C_j(x, t)}{\partial t} = D_j \left[\frac{\partial^2 C_j(x, t)}{\partial x^2} \right] \quad \text{Eq. 4}$$

Em se tratando em difusão linear, a resolução dessa equação é feita observando as seguintes condições de contorno:

$$C_j(x, 0) = C_j^* \quad \text{Eq. 5.1}$$

$$\lim_{x \rightarrow \infty} C_j(x, t) = C_j^* \quad \text{Eq. 5.2}$$

$$C_j(0, t) = 0, \quad (\text{para } t > 0) \quad \text{Eq. 5.3}$$

A condição inicial, Eq. 5.1 exprime a homogeneidade da solução antes da aplicação de potencial ao eletrodo de trabalho de forma a promover a oxidação das espécies reduzidas (**R**), ou seja, para $t = 0$, a concentração de **R** nas proximidades do eletrodo é igual a concentração da mesma no seio da solução, representado por C_j^* . Por outro lado, a Eq. 5.2, representa sistemas sob difusão semi-infinita considerando que as regiões distantes do eletrodo não interferem no experimento. A terceira condição, Eq. 5.3, exprime a condição de que, na superfície do eletrodo

após a variação do potencial a concentração de R é igual a zero, ou seja, $C_j^* = 0$ (BARD; LARRY, 1980).

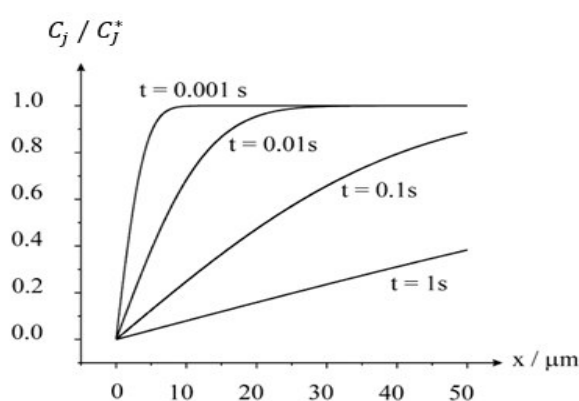
Aplicando a transformada de Laplace na Equação (4) e usando as condições de contorno das Equações (Eq. 5.1 - Eq. 5.3), encontra-se a equação de Cottrell:

$$I = \frac{nFA\sqrt{D_j}C_j^*}{\sqrt{\pi t}} \quad \text{Eq. 6}$$

onde, t é o tempo em segundos (s), A é a área do eletrodo dada em centímetros quadrado (cm^2), as demais variáveis têm seus significados definidos previamente nesta dissertação (COMPTON; BANKS, 2007).

Outro aspecto de grande importância em se tratando de difusão em eletrodos é a forma com que a concentração das espécies que sofreram eletrólise varia em função do tempo. Para averiguar esse fenômeno, é necessário examinar a região interfacial eletrodo-solução, mais especificamente, a camada de difusão. A Figura 6 mostra o perfil de concentração para diferentes intervalos de tempo quando se emprega um macroeletrodo.

Figura 6 - Variação do perfil de concentração em função da distância e do tempo de eletrólise de espécies solúveis para uma região controlada por difusão em macroeletrodo.



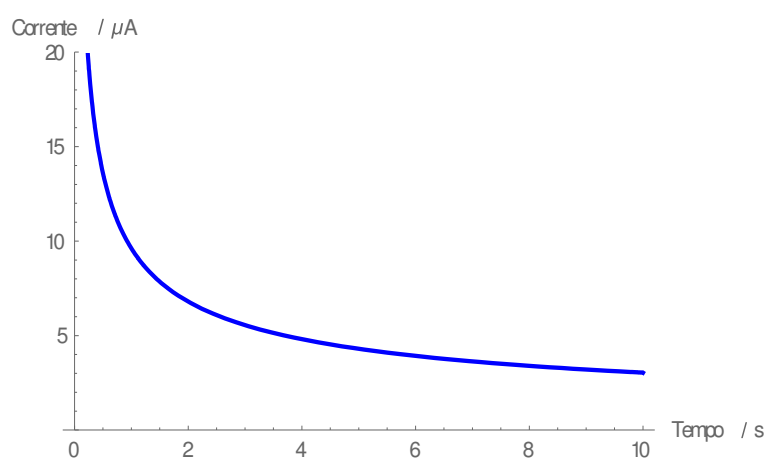
Fonte: COMPTON; BANKS, 2007

É possível observar, que o intervalo de tempo requerido para macroeletrodo alcançarem um estado estacionário é longo, e muitas vezes não é possível alcança-

lo experimentalmente devido aos processos convectivos naturais (CORREIA et al., 1995).

A corrente para macroeletrodo pode ser determinada experimentalmente por técnicas eletroquímicas como cronoamperometria. Nesses métodos, mede-se a corrente que flui através do eletrodo de trabalho em função do tempo. O perfil de uma curva cronoamperométrica para macroeletrodos pode ser observado na Figura 7.

Figura 7 - Perfil de uma curva cronoamperométrica teórica para macroeletrodos com geometria de disco.



Fonte: Elaborado pelo Autor

A curva representa a variação da corrente em função do tempo, ou seja, quando as espécies são oxidadas ou reduzidas, ocorre um aumento significativo da corrente, que diminui com o tempo segundo a equação de Cottrell (Eq.6). Tal comportamento observado para macroeletrodos está relacionado ao fato de que a espessura da camada de difusão é pequena em relação ao diâmetro do eletrodo de forma que a transferência de massa ocorre essencialmente perpendicular à superfície do eletrodo. O processo descrito previamente é conhecido como difusão linear “semi-infinita” (WALSH; LOVELOCK; LICENCE, 2010).

Microeletrodos por outro lado, com superfície ativa em forma de microdisco, o transporte de massa é regido pela equação diferencial parcial de difusão apresentada a seguir (TRINH; TOUZAIN, 2014):

$$\frac{\partial c_j}{\partial T} = D_j \left[\frac{\partial^2 c_j}{\partial Z^2} + \frac{\partial^2 c_j}{\partial R^2} + \frac{1}{R} \frac{\partial c_j}{\partial R} \right] \quad \text{Eq. 7}$$

onde, $R = r/a$ e $Z = z/a$ são parâmetros adimensionais em função de r e z respectivamente. As variáveis r e z representam as coordenadas nos sentidos radial e normal à superfície do microeletrodo, respectivamente. Similarmente, ainda pode-se fazer o tempo como variável adimensional de forma que $T = tD_j / a^2$, onde t é o tempo e D_j o coeficiente de difusão da espécie que está sendo oxidada ou reduzida, respectivamente (BARD et al., 1992; MIRKIN; RICHARDS; BARD, 1993; SHAO, MIRKIN, 1998).

No presente caso, as condições de contorno para o problema de estado estacionário, ou seja $\frac{\partial c_j}{\partial T} = 0$, são:

$$c_j = 0 \text{ para } R \leq 1, \quad e \quad Z = 0 \quad \text{Eq. 8.1}$$

$$\left(\frac{\partial c_j}{\partial R}\right) = 0 \text{ para } R = 0 \quad \text{Eq. 8.2}$$

$$\left(\frac{\partial c_j}{\partial Z}\right) = 0 \text{ para } R > 1, \quad e \quad Z = 0 \quad \text{Eq. 8.3}$$

Uma solução exata da Equação (7) para o problema de estado estacionário foi dada por Saito (SAITO, 1968) e Crank e Furzeland (CRANK; FURZELAND, 1977). Com base na solução analítica, o gradiente de concentração sobre a superfície do microeletrodo é então:

$$J = 2\pi \int_0^1 \frac{2}{\pi} \frac{1}{\sqrt{1-R^2}} R dR = 4 \quad \text{Eq. 9}$$

Com base nas considerações anteriores, a expressão para corrente de estado estacionário para o microeletrodo em forma de disco deduzida por Saito e colaboradores é dada por (TRINH; TOUZAIN, 2014):

$$i_{T,\infty} = 4nD_jFC_j^*a \quad \text{Eq. 10}$$

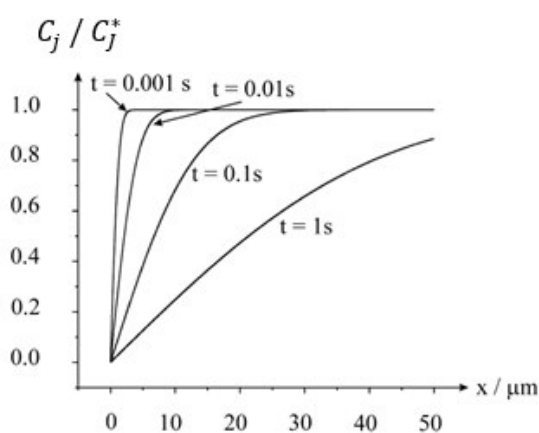
onde, C_j^* e n são respectivamente a concentração da espécie j no seio da solução e o número de elétrons envolvidos na reação, respectivamente. O parâmetro (a) é o

raio do microeletrodo e F é a constante de Faraday. O parâmetro $i_{T,\infty}$ representa a corrente de estado estacionário para uma separação “infinita” entre o microeletrodo e o substrato (BARD et al., 1989; BARD et al, 1992; DAVID et al, 1992).

Em contraste aos macroeletrodos, as correntes em microeletrodos não são diretamente proporcionais à área superficial do eletrodo nos processos controlados por difusão; em vez disso, a corrente é proporcional ao raio do disco eletroativo do microeletrodo. Assim, para microeletrodos, a densidade de corrente é maior quanto menor o seu diâmetro, enquanto que com macroeletrodos é geralmente independente da área de superfície (HEINZE, 1993).

Em intervalos de tempo pequenos (altas velocidades de varredura) a espessura da camada de difusão permanece pequena em comparação ao diâmetro do microeletrodo. Nesta situação, a corrente que se desenvolve no microeletrodo sofre influência significativa das características da camada de difusão. No entanto, em escala de tempo maiores, típicas de baixas velocidades de varredura, a espessura da camada de difusão torna-se grande em relação ao diâmetro do microeletrodo de forma que a difusão se desenvolve no padrão hemisférico, de forma que a corrente que se desenvolve no microeletrodo permanece em estado estacionário (WALSH; LOVELOCK; LICENCE, 2010). A Figura 8, representa o perfil da curva de concentração em função do tempo e da distância para microeletrodos.

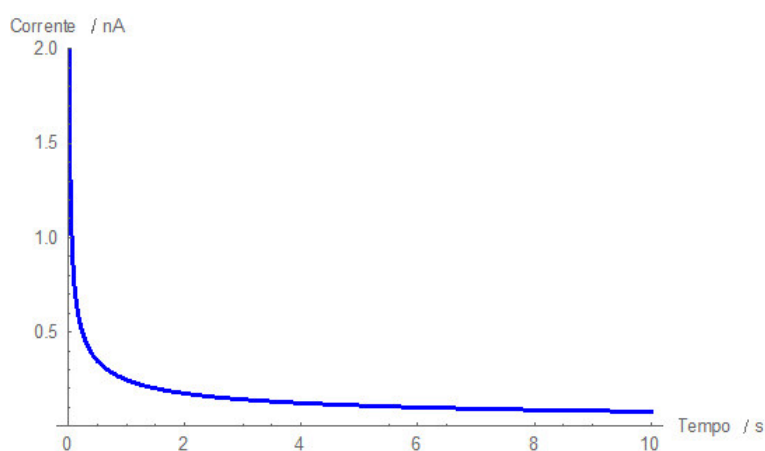
Figura 8 - Variação do perfil de concentração em função da distância e do tempo de eletrólise de espécies solúveis para uma região controlada por difusão em microeletrodo.



Fonte: COMPTON; BANKS, 2007

A partir das curvas apresentadas, pode-se verificar que a razão das concentrações (C_j / C_j^*) não varia significativamente com a escala de tempo do experimento para microeletrodos (AMATORE; DEAKIN; WIGHTMAN, 1986). De fato, no estado estacionário, as correntes que se desenvolvem nos microeletrodos são independentes do tempo e a velocidade de varredura do potencial não afeta a forma e o tamanho da onda voltamétrica. (WALSH; LOVELOCK; LICENCE, 2010). A Figura 9 apresenta o perfil da curva cronoamperométrica para microeletrodos.

Figura 9 - Perfil de uma curva cronoamperométrica teórica para microeletrodos com geometria de disco.



Fonte: Elaborado pelo Autor

Como pode ser observado, o perfil da curva cronoamperométrica para microeletrodos difere enormemente quando comparadas com as para macroeletrodo. As diferenças incluem o perfil voltamétrico sigmoidal nos microeletrodos como resultado da difusão radial, enquanto que os macroeletrodos apresentam voltamogramas que resultam picos devido a difusão linear nestes últimos sistemas. Adicionalmente, o perfil voltamétrico para microeletrodos independe da velocidade de varredura bem como pouco dependem da resistência da solução (WALSH; LOVELOCK; LICENCE, 2010).

A partir desta breve revisão sobre os microeletrodos é evidente que estes sejam candidatos ideais ao emprego como sonda para SECM na avaliação de superfícies e interfaces. Dessa forma, passar-se-á a apresentar os principais modos de operação da SECM.

1.3 Modos de Operação da SECM

A SECM é uma técnica de varredura por sonda (SPM) aplicável a uma plethora de sistemas incluindo estudos de interfaces sólido-líquido e líquido-líquido de forma a caracterizar-se como uma das microscopias de mais ampla aplicabilidade atualmente. Fundamentalmente, a SECM pode operar em diferentes modos operacionais, dependendo do tipo de análise a ser empregada. Os principais modos operacionais da SECM são: o modo de *Feedback* (FB) e o modo Gerador/Coletor (G/C) (BARD; MIRKIN, 2012; BARKER et al., 1999; KARNICKA et al., 2007; KWAK; BARD, 1989; MIRKIN; HORROCKS, 2000).

Neste sentido, com o objetivo de apresentar o funcionamento do microscópio eletroquímico de varredura são resumidos os fundamentos teóricos associados aos modos operacionais (FB) e (G/C) da SECM.

1.3.1 Modo de Feedback

Historicamente, o primeiro tratamento teórico para o modo de *Feedback* foi proposto por Kwak e Bard, para isso, usou-se o método dos elementos finitos para simular um processo de difusão (KWAK; BARD, 1989).

No modo de *Feedback*, o microeletrodo é usado como sonda ou ponta de prova em uma célula de três ou quatro eletrodos. Na SECM, o conjunto de eletrodos é exposto à solução eletrolítica contendo um mediador redox apropriadamente escolhido. O microeletrodo é polarizado em um potencial elétrico capaz de induzir uma reação de transferência de elétrons de forma que o processo eletroquímico seja sensível às características do substrato (isolante, semicondutor, condutor), quando o microeletrodo está nas proximidades do substrato (MIRKIN; HORROCKS, 2000).

Nesse modo, a corrente elétrica monitorada no microeletrodo é resultante de processos faradaicos, sendo uma função da composição da solução, da natureza do substrato e da distância do microeletrodo-substrato (KWAK; BARD, 1989; BURCHARDT; WITTSTOCK et al 2008).

Equações que descrevam o fenômeno da difusão das espécies na ponta do microeletrodo foi proposta na literatura pela primeira vez por Mirkin e colaboradores (MIRKIN; FAN; BARD, 1992; WEI; BARD; MIRKIN, 1995):

$$i_T^C = \frac{0.78377}{L} + 0.3315 \exp\left(-\frac{1.0672}{L}\right) + 0.68 \quad \text{Eq. 11}$$

$$i_T^{ins} = \frac{1}{0.15 + \frac{1.5358}{L} + 0.58 \exp\left(-\frac{1.14}{L}\right) + 0.0908 \exp\left(\frac{L-6.3}{1.017L}\right)} \quad \text{Eq. 12}$$

onde, i_T^C e i_T^{ins} , são as correntes normalizadas para substratos condutores e isolantes, respectivamente, e L representa a distância normalizada, ou seja, a razão entre a distância real entre a ponta de prova e o raio do microeletrodo ($L = d/a$). As Equações (11) e (12) modela o fenômeno de *Feedback* e são validas apenas para processos controlados por difusão sobre substratos totalmente condutores ou isolantes, além disso, são validas apenas para microeletrodo com geometria de disco e com um $Rg = 10$ (ZOSKI, MIRKIN, 2002).

As limitações nesse modelo levaram dois pesquisadores Amphlett e Denuault a propor novas equações com parâmetros que pudessem ser ajustados em função do Rg do microeletrodo. Para tanto, foram simuladas curvas variando o Rg e encontrou aproximações analíticas para as curvas de aproximação experimentais em função da distância normalizada microeletrodo-substrato para processos controlado por difusão (AMPHLETT; DENUAULT; 1998). As aproximações analíticas para os dois modos de *Feedback* são mostradas a seguir:

$$i_T^C = k_1 + \left(\frac{k_2}{L}\right) + k_3 \exp\left(\frac{k_4}{L}\right) \quad \text{Eq. 13}$$

$$i_T^{ins} = \frac{1}{\left[k_1' + \left(\frac{k_2'}{L}\right) + k_3' \exp\left(\frac{k_4'}{L}\right)\right]} \quad \text{Eq. 14}$$

onde, k_1, k_2, k_3, k_4 e k_1', k_2', k_3', k_4' são as constantes para substrato condutor e substrato isolante, respectivamente. Cabe ressaltar que as Equações (13) e (14) possuem uma dependência do Rg .

A Tabela (1) mostra a dependência dos coeficientes com os valores do R_g do microeletrodo com geometria de disco para *Feedback Positivo* e *Feedback Negativo* Equações 13 e 14, respectivamente.

Tabela 1 - Dependência dos coeficientes k_1 , k_2 , k_3 e k_4 , k'_1 , k'_2 , k'_3 , k'_4 , em função do R_g do microeletrodo em forma de disco para uma reação sob controle difusional para *Feedback Negativo* e *Feedback Positivo*.

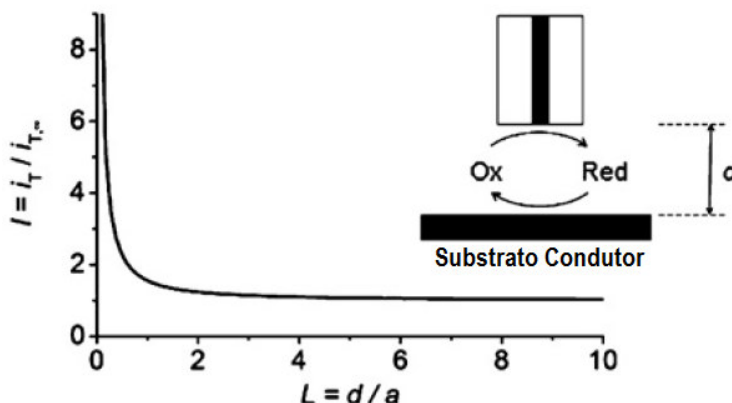
R_{glass}	k_1	k_2	k_3	k_4	% Erro	L
Feedback Positivo						
1002	0.7314	0.77957	0.26298	-1.29077	<0.2%	0.1-200
10.2	0.72627	0.76651	0.26015	-1.41332	<0.3%	0.1-200
5.1	0.72035	0.75128	0.26651	-1.62091	<0.5%	0.1-20
1.51	0.63349	0.67476	0.36509	-1.42897	<0.2%	0.1-200
10	0.68	0.78377	0.3315	-1.0672	<0.7%	0.05-20
R_{glass}	k'_1	k'_2	k'_3	k'_4	% Erro	L
Feedback Negativo						
1002	0.13219	3.37167	0.8218	-2.34719	<1%	0.3-20
100	0.27997	3.05419	0.68612	-2.7596	<1%	0.4-20
50.9	0.30512	2.6208	0.66724	-2.6698	<1%	0.4-20
20.1	0.35541	2.0259	0.62832	-2.55622	<1%	0.4-20
15.2	0.37377	1.85113	0.61385	-2.49554	<1%	0.4-20
10.2	0.40472	1.60185	0.58819	-2.37294	<1%	0.4-20
8.13	0.42676	1.46081	0.56874	-2.28548	<1%	0.4-20
5.09	0.48678	1.17706	0.51241	-2.07873	<1%	0.2-20
3.04	0.60478	0.86083	0.39569	-1.89455	<0.2%	0.2-20
2.03	0.76179	0.60983	0.23866	-2.03267	<0.15%	0.2-20
1.51	0.90404	0.42761	0.09743	-3.23064	<0.7%	0.2-20
1.11	-1.46539	0.27293	2.45648	8.995E-7	<1%	2-20
10	0.292	1.151	0.6553	-2.4035	<1.2%	0.05-20

Fonte: AMPHLETT; DENUAULT; 1998

1.3.1.1 Feedback Positivo

Ao posicionar o microeletrodo próximo do substrato (por exemplo, quando $(d \cong 2a)$), a corrente elétrica medida depende da natureza do substrato. Caso o substrato investigado seja condutor, o mesmo é capaz de regenerar espécies de forma a aumentar a corrente monitorada. Esse efeito é mostrado na Figura 10.

Figura 10 - Representação esquemática mostrando o fenômeno de *Feedback Positivo*.



Fonte: ZOSKI, 2006

Ainda mais, os inúmeros ciclos redox proporcionam um processo de retroalimentação que provoca um aumento na corrente medida no microeletrodo se comparado a corrente medidas para o microeletrodo em condições de difusão semi-infinita. Esse fenômeno é conhecido como *Feedback Positivo* (FAN; BARD, 1989; KWAK; BARD, 1989).

A equação diferencial não linear de Laplace que modela o fenômeno de *Feedback* em SECM apresenta independência temporal, ou seja, admite o estado estacionário. (BARD et al., 1992; KWAK; BARD, 1989; LEFROU, 2007; SHAO; MIRKIN, 1998; MIRKIN; RICHARDS; BARD, 1993; UNWIN; BARD, 1991):

$$\frac{\partial c_j}{\partial Z^2} + \frac{1}{R} \frac{\partial c_j}{\partial R} + \frac{\partial c_j}{\partial R^2} = 0 \quad \text{Eq. 15}$$

Em que, c_j é a razão entre a concentração da espécie que está sendo oxidada ou reduzida na solução próxima ao substrato e a concentração da mesma no seio da solução, Z , é a razão entre a distância perpendicular através do centro do disco até o substrato z e o raio do microeletrodo (a), o símbolo R , representa a razão entre distância radial a partir do eixo r e o raio do microeletrodo (CRANK, 1979). Esses parâmetros adimensionais são descritos da seguinte maneira:

$$Z = \frac{z}{a} \quad \text{Eq. 16(a)}$$

$$R = \frac{r}{a} \quad \text{Eq. 16(b)}$$

$$c_j = \frac{C_j}{C_j^*} \quad \text{Eq. 16(c)}$$

$$L = \frac{d}{a} \quad \text{Eq. 16(d)}$$

onde, L é a distância normalizada, ou seja, a razão entre a distância real microeletrodo-substrato e o raio do microeletrodo.

Para resolver a Equação (15) e encontrar aproximações analíticas para os modos de *Feedback*, tendo em vista, uma dependência tanto da distância normalizada L como do R_g , algumas condições de contorno devem ser consideradas tendo em observância o tipo de sistema a ser modelado (LEFROU, 2006).

Usualmente, as curvas de aproximação experimental mostram a variação da corrente normalizada com a distância normalizada microeletrodo-substrato. A corrente normalizada, I_N , é definida como a razão da corrente medida pelo microeletrodo ao passo que este se aproxima do substrato e a corrente à uma distância semi-infinita do substrato (UNWIN; BARD, 1991):

$$I_N = \frac{i_T}{i_{T,\infty}} \quad \text{Eq. 17}$$

onde, i_T é a corrente medida através da ponta do microeletrodo próximo ao substrato, enquanto que, $i_{T,\infty}$ é a corrente medida pelo microeletrodo no seio da solução.

A corrente normalizada, I_N , pode ainda ser formulada da seguinte maneira (ABERCROMBIE; DENUAULT, 2003):

$$I_N = \frac{\pi}{2} \int_0^1 \left(\frac{\partial c}{\partial Z} \right)_{Z=0} R dR \quad \text{Eq. 18}$$

Uma expressão analítica geral para a corrente normalizada foi proposta por Christine Lefrou para diferentes valores de L e R_g e com a vantagem de necessitar de poucos parâmetros ajustáveis, (LEFROU, 2006). Sendo assim, a corrente normalizada para *Feedback Positivo* pode ser escrita como:

$$IN_T^C = \alpha(R_g) + \frac{\pi}{4\beta(R_g)\arctan(L)} + \left[1 - \alpha(R_g) - \frac{1}{2\beta(R_g)}\right] \frac{2}{\pi} \arctan(L) \quad Eq. 19$$

onde, $\alpha(R_g)$, é dado por:

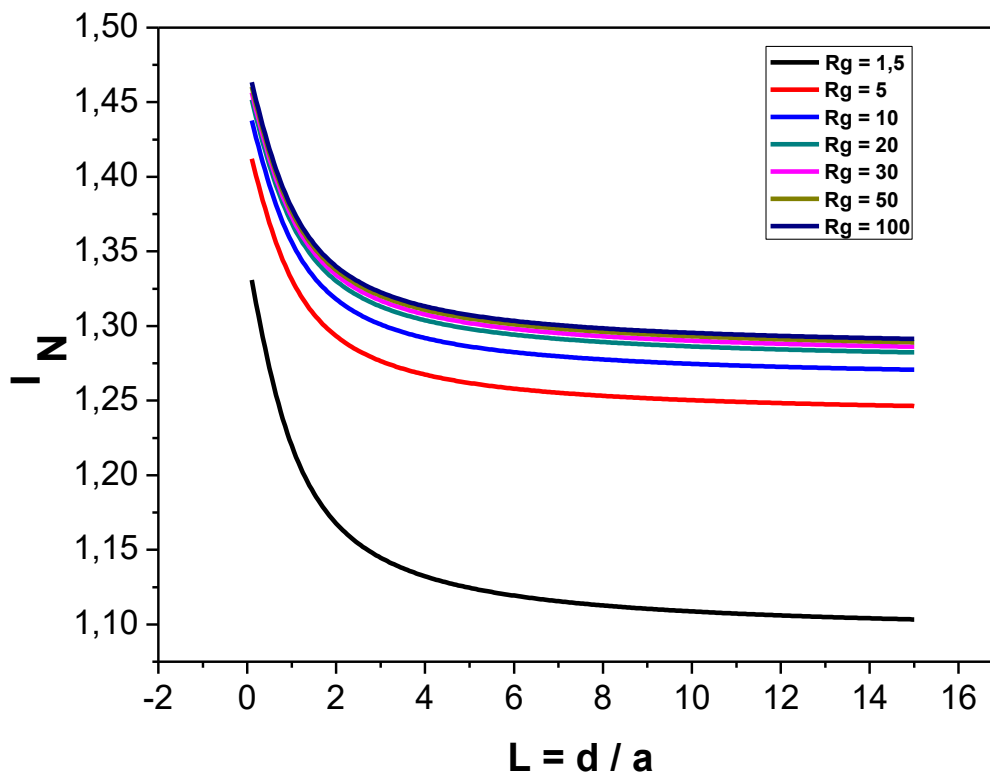
$$\alpha(R_g) = \ln(2) + \ln(2) \left[1 - \frac{2}{\pi} \arccos\left(\frac{1}{R_g}\right)\right] - \ln(2) \left\{1 - \left[\frac{2}{\pi} \arccos\left(\frac{1}{R_g}\right)\right]^2\right\} \quad Eq. 20$$

e $\beta(R_g)$:

$$\beta(R_g) = 1 + 0,639 \left[1 - \frac{2}{\pi} \arccos\left(\frac{1}{R_g}\right)\right] - 0,186 \left\{1 - \left[\frac{2}{\pi} \arccos\left(\frac{1}{R_g}\right)\right]^2\right\} \quad Eq. 21$$

A Figura 11, apresenta curvas de aproximação teóricas simuladas para o modo de *Feedback Positivo* usando as equações (19), (20) e (21), para diferentes valores de R_g , usando as equações contidas na referência (LEFROU, 2006).

Figura 11- Efeito do R_g sobre o perfil das curvas de aproximação teóricas para o modo de Feedback Positivo.



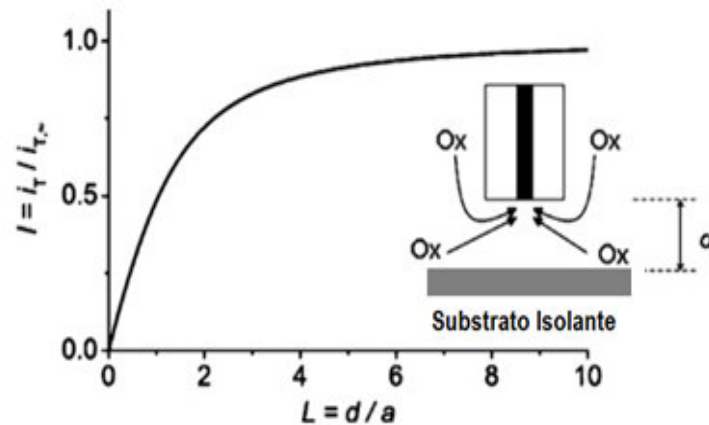
Fonte: Elaborado pelo Autor

Podemos observar o perfil das curvas de aproximação simuladas para substratos condutor não são influenciadas pelos valores de R_g acima de 10, pois o aumento da corrente não depende da chegada de mais material eletroativo até a superfície do eletrodo à medida que este se aproxima do substrato, e sim, do fenômeno de retroalimentação (BARD; MIRKIN, 2001).

1.2.3.2 Feedback Negativo

No caso de um substrato isolante a chegada de espécies eletroativas até a superfície do microeletrodo é limitada pelo substrato, e conseqüentemente, isso provoca uma diminuição na corrente medida. Tal fenômeno descrito anteriormente é conhecido como *Feedback Negativo* (FAN; BARD, 1989; WIPF; BARD, 1991). Esse fenômeno pode ser observado na Figura 12.

Figura 12 - Representação esquemática mostrando o fenômeno de Feedback Negativo.



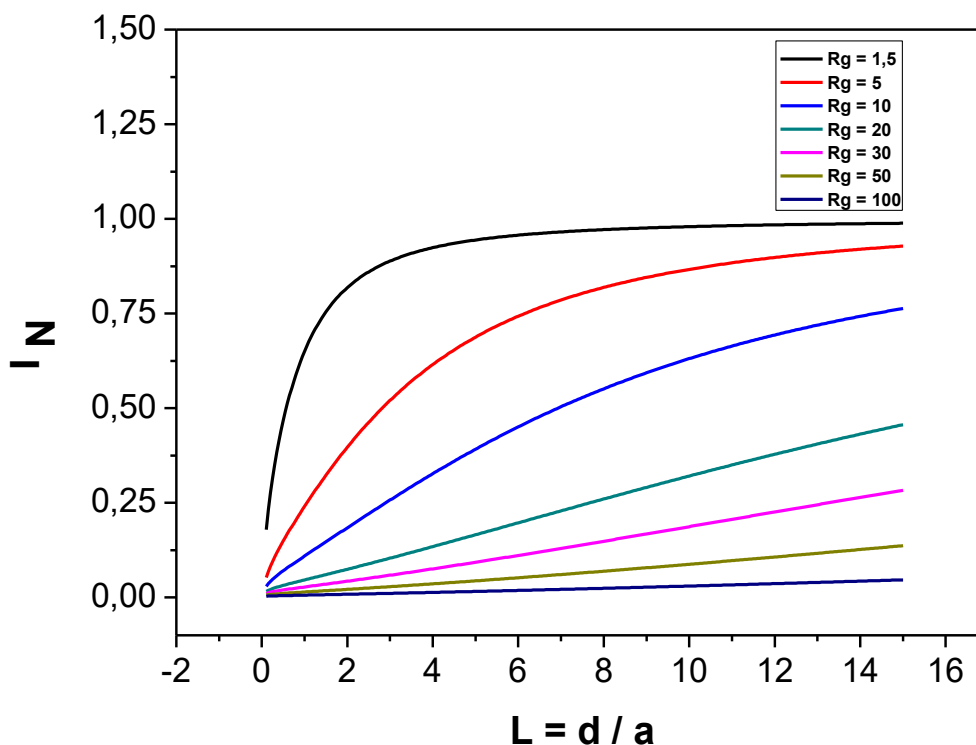
Fonte: ZOSKI, 2006

Uma equação geral que modela o fenômeno de *Feedback Negativo* com L e Rg como variáveis e seis parâmetros que podem ser facilmente ajustados para várias curvas de aproximação é proposta pela seguinte expressão (CORNUT; LEFROU, 2007):

$$IN_T^{ins} = \frac{\frac{2,08}{Rg^{0,358}} \left(L - \frac{0,145}{Rg} \right) + 1,585}{\frac{2,08}{Rg^{0,358}} (L + 0,0023Rg) + \frac{\ln(Rg)}{L} + \frac{2}{\pi Rg} \left[\ln \left(1 + \frac{\pi Rg}{2L} \right) \right] + 1,57} \quad Eq. 22$$

A Figura 13, apresenta curvas de aproximação simuladas para *Feedback Negativo* usando a Equação (22), para diferentes valores de Rg , usando a equação contida na referência (LEFROU, 2007).

Figura 13 - Efeito do R_g sobre o perfil das curvas de aproximação teóricas para o modo de Feedback Negativo.



Fonte: Elaborado pelo Autor

Pode-se observar que o perfil das curvas de aproximação teóricas realizadas sobre substratos isolante são altamente influenciadas pelo R_g , isso equivale a dizer que, quanto maior o R_g do microeletrodo mais dificultada é a chegada de material eletroativo até a superfície do eletrodo à medida que este se aproxima do substrato (BARD; MIRKIN, 2001).

Seguindo essa linha de pensamento, pode-se afirmar, que a corrente limitada por difusão em eletrodo de microdiscos com uma dependência do (R_g), tem a bem estabelecida expressão analítica, mostrada na seguinte equação (LEFROU; CORNUT, 2010).

$$i_{T,\infty} = \beta(R_g)4nD_jFC^*a \quad \text{Eq. 23}$$

1.3.2 Modo Amperométrico Gerador/Coletor (G/C)

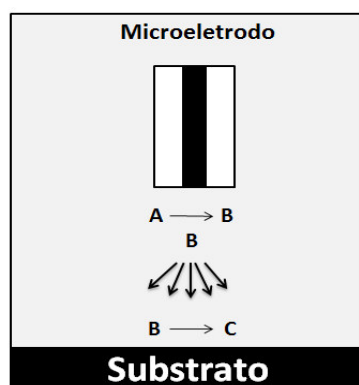
De forma geral, pode-se destacar duas possíveis abordagens para o modo gerador/coletor: (a) microeletrodo gerando e substrato coletando (TG-SC, *Tip Generation/Substrate Collection*) e (b) substrato gerando com microeletrodo coletando (SG-TC, *Substrate Generation/Tip Collection*). Atualmente estes modos são bastante utilizados na obtenção de informações sobre a cinética de transferência eletrônica, na determinação de coeficientes de difusão e outros (BERTONCELLO et al., 2006; ALPUCHE-AVILES; BAUR; WIPF, 2008; MCKAY; LESUER, 2008; TENENT; WIPF, 2009).

Nesse modo, Gerador/Coletor não há necessidade de adição de um mediador redox na solução utilizada como eletrólito de suporte. O mediador redox pode ser gerado no decorrer do experimento pelo substrato ou pelo microeletrodo (LU; WANG et al., 2007).

1.3.2.1 Modo “TG-SC”

No modo TG-SC o mediador redox é gerado pelo microeletrodo e se difunde radialmente até o substrato, este opera como coletor. Este modo de operação fornece informações sobre processos químicos acoplados a reações eletródicas, pois o fator de coleta depende da distância entre o microeletrodo e o substrato e também da cinética da reação (DEMAILLE; UNWIN; BARD, 1996). Esse processo pode visualizado na Figura 14.

Figura 14 - Esquema do modo Microeletrodo Gera/ Substrato Coleta.

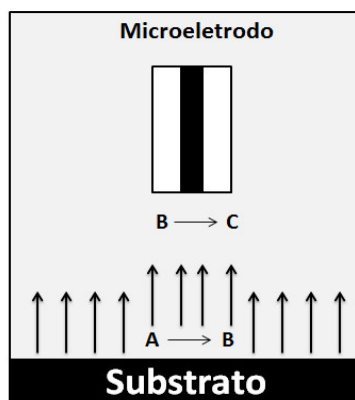


Fonte: Elaborado pelo Autor

1.3.2.2 Modo “SG-TC”

No modo SG-TC ocorre o contrário, o microeletrodo opera como coletor e o mediador redox é gerado pelo substrato. Neste modo os dados obtidos fornecem informação sobre a concentração de espécies geradas, ou sobre as zonas reativas na superfície do substrato (BALTES; HEINZE, 2009). A Figura 15 mostra esse processo.

Figura 15 - Esquema do modo Substrato Gera/ Microeletrodo Coleta.



Fonte: Elaborado pelo Autor

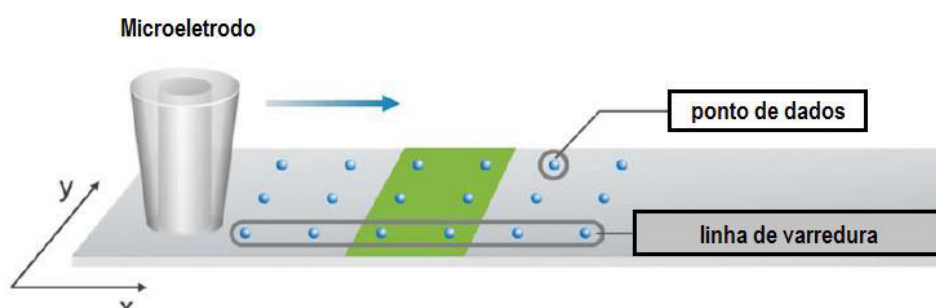
As curvas de aproximação obtida nos experimentos de SECM, para diferentes valores de potencial aplicado ao substrato condutor, pode ser usada mediante tratamento adequado de dados, conforme descrito na literatura, para fornecer informações sobre parâmetros cinéticos (LI et al., 2008).

O modo Gerador/Coletor e o modo de Feedback podem ainda ser empregado em associação com a varredura lateral do microeletrodo sobre a superfície do substrato de forma que um mapeamento superficial das características do substrato possa ser conduzido gerando uma imagem dos processos eletroquímicos de superfície.

1.3.3 Modo de Imagem

O modo de imagem em SECM consiste no monitoramento da corrente faradaica (i_T) captada pelo microeletrodo em função da distância (d) microeletrodo-substrato. Nesse modo de operação, o mapeamento é realizado à distância constante e, consiste em aproximar o microeletrodo até o substrato no eixo de coordenadas z e fazer o mesmo variar nos eixos x - y (WIPF; BARD, 1992). A Figura 16 mostra um esquema do modo de imagem.

Figura 16 - Esquema do modo de imagem em SECM.



Fonte: Adaptado de Sensolytcs, 2015

O modo de imagem pode fornecer informações sobre o perfil de concentração local, a reatividade da superfície (PELLISSIER et al., 2008; SANTOS et al., 2008; YOGESWARAN; THIAGARAJAN; CHEN, 2007).

Nesse sentido, será investigada a atividade catalítica das enzimas GOx e HRP sobre diferentes substratos à base de carbono visando o desenvolvimento de um biossensor.

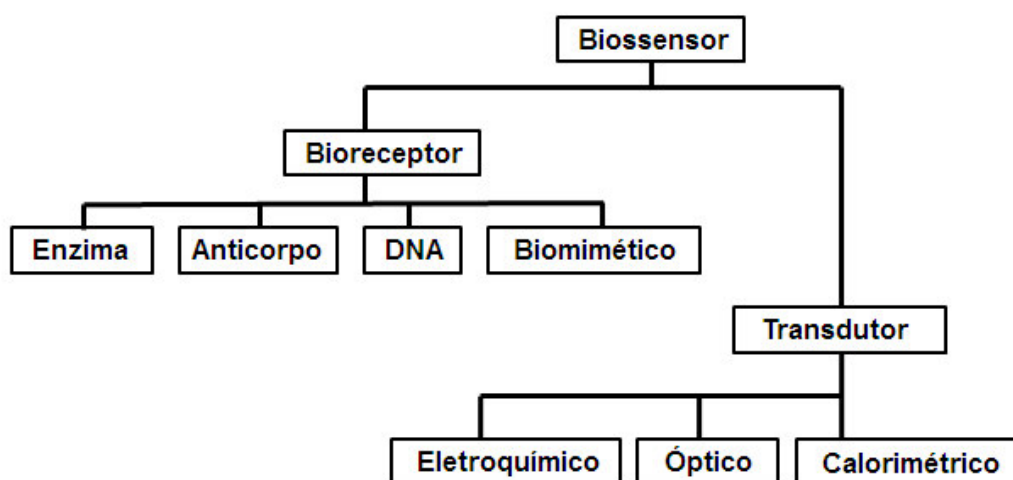
1.4 Sensores Químicos

Define-se sensor químico como sendo o dispositivo capaz de converter interações moleculares em variações físicas e/ou químicas mensuráveis. Um sensor químico transforma as informações químicas recebidas como disposição estereoquímica, variação de concentração ou polaridade, por exemplo, em um sinal elétrico, como condutividade elétrica, sensibilidade, diferença de potencial ou de frequência de ressonância (GREENSHIELDS, 2011).

Importante destacar que, se o receptor for um ente biológico (Enzima, DNA, Anticorpo, etc.), o sensor químico pode ser nomeado biossensor. De acordo com a IUPAC, um biossensor é um dispositivo integrado e independente constituído de um transdutor e um receptor, o qual é capaz de fornecer informação analítica quantitativa ou semi-quantitativa seletiva utilizando um elemento de reconhecimento biológico (THEVENOT et al., 1999).

Os biossensores podem ser classificados pelo tipo de mecanismo de sinalização biológica que utilizam ou pelo tipo de transdução de sinal que empregam (PERUMAL; HASHIM, 2014). As principais categorias de biossensores são apresentadas na Figura 17.

Figura 17 - Diferentes Categorias de biossensores e formas de transdução do sinal.



Fonte: Adaptado de PERUMAL; HASHIM, 2014

Os primeiros biossensores a serem desenvolvidos, foram os baseados em enzimas, introduzido por Clark e Lyons, em 1962, e se tratavam de um biossensor amperométrico para detectar glicose, no qual se utilizou um eletrodo modificado com uma enzima (SHANTILATHA et al., 2003).

A busca por métodos que sejam de baixo custo, sensíveis, seletivos e robustos, é de grande importância para o desenvolvimento de novas tecnologias. Nesse sentido, os biossensores são candidatos excelentes, pois além de preencher todos os requisitos, as aplicações dos mesmos podem ser encontradas em diferentes áreas do conhecimento (FURTADO et al., 2008). Estudos recentes têm demonstrado que os biossensores enzimáticos podem ser usados para detecção das mais variadas espécies de interesse clínico, biológico e ambiental (AMINE et al., 2006; ZHANG et al., 2008; YOGESWARAN et al., 2011; NOMNGONGO et al., 2012).

Neste contexto, um dos aspectos mais promissores no que tange a potencialidade dos biossensores enzimáticos, é a gama de enzimas conhecidas e potencialmente úteis como material de reconhecimento biológico. Diferentes enzimas têm sido utilizadas para o desenvolvimento de biossensores, incluindo oxidases, desidrogenases, peroxidases, entre outras. Dentre estas, em especial a enzima glicose oxidase (GOx) e peroxidase de raiz forte (HRP) são as enzimas mais largamente utilizados para desenvolvimento de biossensores relatados na literatura devido aos seus importantes papéis biológico, amplo espectro de atividade, preço relativamente baixo, bem como ótima estabilidade, e suas participações em vários processos fisiológicos (CHEN et al., 2013; SILVA et al., 2012).

Neste sentido, são apresentados alguns estudos referentes ao emprego da SECM no desenvolvimento e investigação do efeito de diferentes suportes nas características de biossensores enzimáticos explorando as enzimas HRP e GOx como modelo de reconhecimento. Para isso, far-se-á um estudo dos aspectos químicos e estruturais dessas enzimas.

1.5 Enzimas

Enzimas são grupos de moléculas orgânicas, geralmente proteínas, pois, existem também um pequeno grupo de enzimas constituídas por moléculas de RNA,

que foram denominadas “ribozimas” (PEEBLES et al., 1986). As enzimas atuam como catalisadores biológicos através do abaixamento da energia de ativação de forma a aumentar a velocidade de determinadas reações. (COX; LEHNINGER, 2006).

Algumas enzimas não necessitam de outros grupos químicos além dos seus próprios resíduos de aminoácidos e outras necessitam de um componente químico adicional denominado cofator (Ex.: íons inorgânicos como Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} ou uma molécula orgânica ou metalorgânica complexa, denominada coenzima). As coenzimas agem como carreadores transitórios de grupos funcionais específicos. A Tabela 2 apresenta algumas coenzimas.

Tabela 2 - Algumas coenzimas que servem como carregadores transitórios de átomos ou grupos funcionais específicos.

Coenzima	Exemplo de grupo químico transferido	Precursor presente na dieta de mamíferos
Biocina	CO_2	Biotina
Coenzima A	Grupos acil	Ácido pantotênico e outros compostos
5'-Desoxiadenosilcobalamina (coenzima B_{12})	Átomos de H e grupos alquil	Vitamina B_{12}
Flavina-adenina-dinucleotídeo	Elétrons	Riboflavina (vitamina B_2)
Lipoato	Elétrons e grupos acil	Não é necessário na dieta
Nicotinamida-adeninadinucleotídeo	Íon hidrido ($:H^-$)	Ácido nicotínico (niacina)
Piridoxal-fosfato	Grupos amino	Piridoxina (vitamina B_6)
Tetra-hidrofolato	Grupos de um carbono	Folato
Tiamina-pirofosfato	Aldeídos	Tiamina (vitamina B_1)

Fonte: COX; LEHNINGER, 2006

Algumas enzimas necessitam tanto de uma coenzima quanto de um ou mais íons metálicos para terem atividade. Uma coenzima ou um íon metálico que se ligue muito firmemente, ou mesmo covalentemente, a uma enzima é denominado grupo prostético. Uma enzima completa, cataliticamente ativa junto com a sua coenzima e/ou íons metálicos, é denominada holoenzima. A parte proteica de uma dessas enzimas é denominada apoenzima ou apoproteína (COX; LEHNINGER, 2006). Alguns desses íons são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Alguns íons inorgânicos que servem de cofatores para enzimas.

Íons	Enzimas
Cu^{2+}	Citocromo-oxidase
Fe^{2+} ou Fe^{3+}	Citocromo-oxidase, catalase, peroxidase
K^{+}	Piruvato-cinase
Mg^{2+}	Hexocinase, glicose-6-fosfatase, piruvato-cinase
Mn^{2+}	Arginase, ribonucleotídeo-redutase
Mo	Dinitrogenase
Ni^{2+}	Urease
Zn^{2+}	Anidrase carbônica, álcool-desidrogenase, carboxipeptidases A e B

Fonte: COX; LEHNINGER, 2006

Dentre as enzimas que possuem um metal como cofator, destacam-se as peroxidases, por serem grupos de enzimas oxirredutases que contêm um grupo heme em sua estrutura e oxidam uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, sendo alguns desses xenobióticos. Para esse fim, essas enzimas usam o peróxido de hidrogênio como aceitador de elétrons (LEISINGER, 1983; HÄGGBLUM, 1992; VEITCH, 2004).

As peroxidases podem ser divididas quanto à presença de um grupo heme, ou seja, podem ser classificadas como hêmicas ou não-hêmicas. As peroxidases hêmicas catalisam a peroxidação de substratos usando o íon de ferro presente no grupo heme. As peroxidases não-hêmicas, também conhecidas como peroxirredoxinas, usam cisteínas no seu centro catalítico para desempenharem a atividade redox (MARAÑÓN; VAN HUYSTEE, 1994).

1.5.1 Glicose Oxidase (GOx)

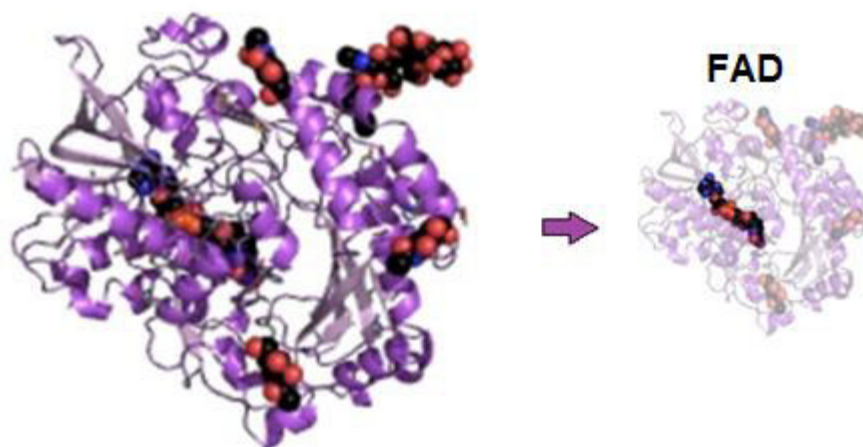
A glicose oxidase (GOx) (β -D-glicose: oxigênio1-óxido-redutase, EC 1.1.3.4) é uma flavoenzima que catalisa a oxidação da β -D-glicose por intermédio do oxigênio molecular (O_2) para formação do glucono- δ -lactone, que espontaneamente se hidrolisa em ácido glucônico, e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essa enzima é

encontrada no fungo *Aspergillus niger* e tem peso molecular em torno de 160 Quilodalton (kD) (GIBSON, SWOBODA; MASSEY, 1964; WOHLFAHRT, 2004).

a) Estrutura

A GOx é uma glicoproteína dimérica, composta por duas subunidades idênticas (WILSON; TURNER, 1992); cada subunidade carrega uma molécula de Dinucleótido de Flavina e Ademina (FAD) fortemente ligada à coenzima, que atua como um veículo redox no processo de catálise (WOHLFAHRT et al., 1999). A Figura 18 mostra a GOx e a molécula FAD em destaque ligada à sua estrutura.

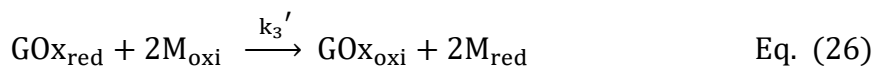
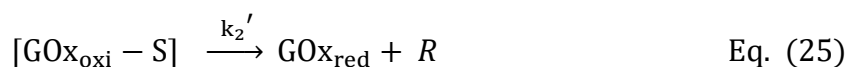
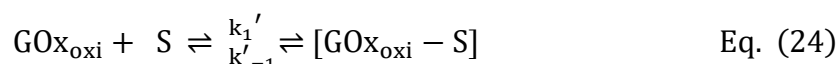
Figura 18 - Representação tridimensional da estrutura quaternária da glicose oxidase com o cofator FAD em destaque.



Fonte: www.ebi.ac.uk

b) Reatividade

O mecanismo Michaelis-Menten simplificado é o mais utilizado em estudos usando SECM, para analisar a reação enzimática da glicose oxidase GOx com um substrato (S) para formação do produto R. Para isso, usa-se um mediador redox que seja um forte agente redutor. O ciclo reativo de oxidação de um substrato (S) pode ser representado pela sequência de Equações (24) - (26) (CORNUT; HAPIOT; LEFROU, 2009).



onde k_1' , é a constante de velocidade de formação do complexo $[\text{GOx}_{\text{oxi}} - \text{S}]$, k'_{-1} a constante de velocidade da dissociação do complexo, k_2' a constante de velocidade da dissociação do complexo formando o produto R (FURICO JUNIOR, 2001).

Nesse mecanismo, a glicose oxidase em sua forma *in natura* GOx_{oxi} se combina com o substrato (S) em um processo rápido e reversível, formando o complexo enzima-substrato $[\text{GOx}_{\text{oxi}} - \text{S}]$. Numa segunda etapa, mais lenta, o complexo formado enzima-substrato se quebra liberando o produto reacional R e a enzima livre na forma reduzida GOx_{red} .

1.5.2 Peroxidase de raiz forte (HRP)

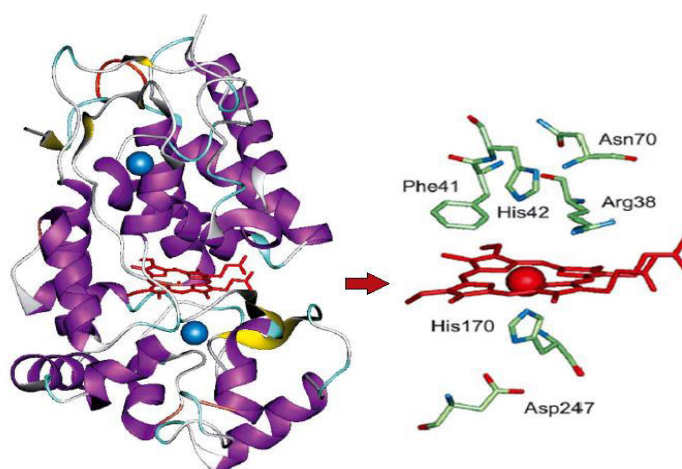
A peroxidase de raiz forte é uma glicoproteína hêmica obtida a partir de uma erva perene, raiz forte (*Armoracia rusticana* P.Gaertn., B.Mey. & Scherb.; *Cruciferae*). Esta planta é uma rica fonte de peroxidases, isoenzimas que contém um grupo prostético em sua cadeia polipeptídica e utiliza peróxido de hidrogênio para oxidar uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Essas enzimas apresentam massa molecular entre 40 - 45 kD, com cadeia polipeptídica que corresponde a 33.890 gmol^{-1} e a porção de carboidratos constituindo de 18 a 22% do total da massa molar enzimática (SILVA; RIBEIRO; PETRI, 2007; VEITCH, 2004).

a) Estrutura

A enzima HRP (isoenzima C) contém dois tipos diferentes de centro metálico, ambos são essenciais para a integridade estrutural e funcional da enzima, o grupo heme prostético ou ferro (III) protoporfirina (IX), e dois átomos de cálcio. O grupo

heme está ligado à enzima por um resíduo de histidina proximal (His170) e por uma ligação coordenada entre a histidina na cadeia lateral e o átomo de ferro do grupo heme. O segundo sítio de coordenação axial está desocupado na enzima *in natura*. A His170, a histidina do resíduo proximal, é coordenado com o átomo do grupo heme, enquanto que o sítio de coordenação distal acima do plano do grupo heme está vago. Pequenas moléculas, como monóxido de carbono, cianeto, flúor e azida ligam-se ao grupo heme no lado distal correspondente ao sexto sítio de coordenação. Algumas moléculas ligam-se apenas em suas formas protonadas da enzima, que são estabilizados por meio de interações de hidrogênio ligados com o grupo heme amino distal de cadeias laterais de ácido Arg38 (arginina distal) e seus His42 (a histidina distal) (VEITCH, 2004).

Figura 19 - Representação tridimensional da estrutura quaternária da peroxidase de raiz forte (isoenzima C) com o grupo Heme em destaque feita por cristalografia de raios-X.

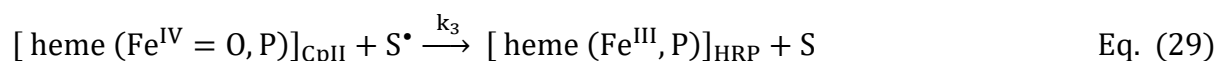
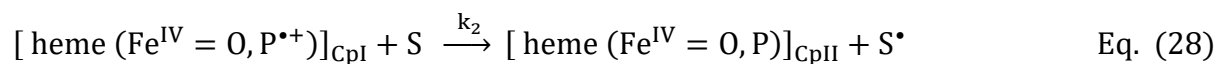
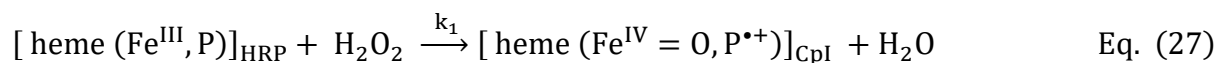


Fonte: VEITCH, 2004

As características estruturais da HRP determinam o tipo de ligação que a enzima faz como substrato no processo catalítico, o que contribui para a diversidade funcional observada dentro da superfamília de peroxidase (SMITH; VEITCH, 1998). Estes aspectos influenciam diretamente na compreensão dos processos mecanísticos e cinéticos dessa enzima.

b) Reatividade

A HRP é uma enzima oxirredutase que utiliza, o peróxido de hidrogênio como aceitador natural de elétrons. O ciclo catalítico da HRP para oxidação de compostos fenólicos pode ser bem representado pela sequência de reações mostradas nas Equações (27) - (30). Isto aplica-se à maioria, mas não todas, as reações catalisadas pela enzima, independentemente da isoenzima específica envolvida (CHANCE, 1952; GORTON et al., 1999; RUZGAS et al., 1996; VEITCH; SMITH, 2000).



Onde, HRP, CpI são respectivamente, a enzima *in natura*, o composto intermediário formado pela oxidação da enzima por um agente oxidante forte como peróxido de hidrogênio. Numa segunda etapa, o composto intermediário (CpI) sofre uma redução pela transferência de um elétron do doador S, formando o composto intermediário (CpII). Por fim, o composto (CpII) recebe mais um elétron provindo do íon S[•] fechando o ciclo catalítico, então, a enzima HRP retorna ao estado natural (RUZGAS et al., 1996; DAMOS et al., 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho tem como objetivo geral a aplicação da Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM) na investigação de processos interfaciais visando o desenvolvimento de sensores químicos explorando as enzimas GOx e HRP como modelo de reconhecimento.

2.2 Específicos

- I. Empregar microeletrodos para o monitoramento de processos enzimáticos envolvendo a GOx (monitoramento de peróxido de hidrogênio, oxigênio, etc...);
- II. Confeccionar e caracterizar eletroquimicamente filmes a base de materiais de carbono (nanotubos de carbono e grafeno) como suporte para imobilização da enzima HRP;
- III. Aplicar o modo de gerador/coletor na investigação da reatividade dos filmes contendo enzimas imobilizadas;
- IV. Aplicar a SECM em sistemas enzimáticos para a determinação seletiva de compostos isômeros: catecol e hidroquinona.

3 PARTE EXPERIMENTAL

Os estudos desenvolvidos nesse trabalho foram todos realizados na Universidade Federal do Maranhão, mais especificamente no Laboratório de Sensores, Dispositivos e Métodos Analíticos-LabS.

3.1 Equipamentos e Materiais

Para realizar as análises, o laboratório dispõe dos seguintes equipamentos:

As medidas de microscopia eletroquímica foram realizadas utilizando um (Bi)Potenciostato-Galvanostato AUTOLAB 128N da Metrohm-Pensalab com módulo de impedância e de baixas correntes integrado a um microcomputador que possui uma interface contendo um software para controle dos parâmetros na realização dos experimentos bem como para a aquisição de dados. A Figura 20 mostra o (Bi)Potenciostato-Galvanostato.

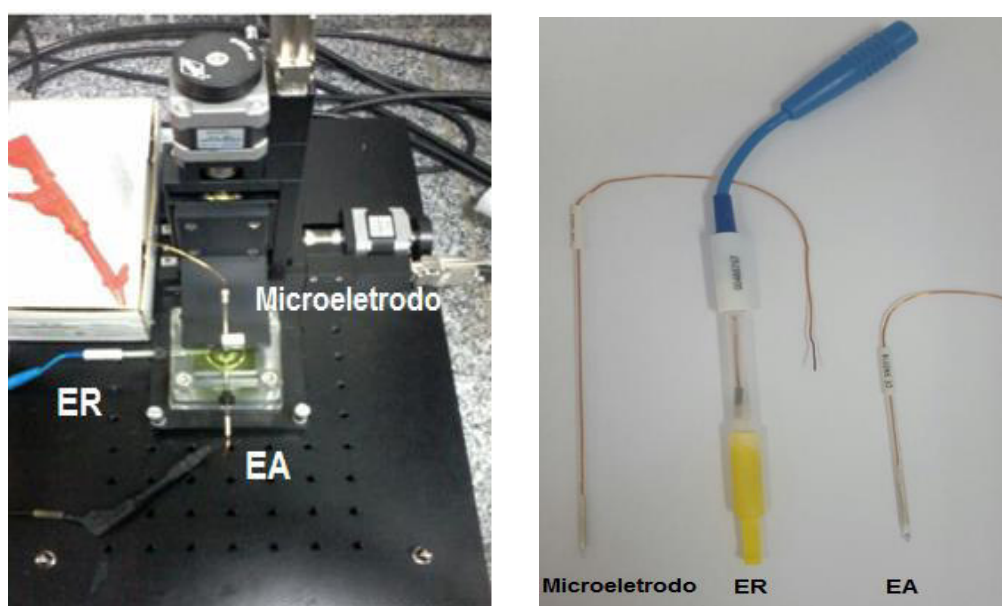
Figura 20 - (Bi)Potenciostato-Galvanostato AUTOLAB 128N da Metrohm-Pensalab.



Fonte: Elaborado pelo Autor

Os experimentos SECM foram realizadas usando Microscópio Eletroquímico de Varredura da Sensolytics, usando um sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho (microeletrodo de platina), eletrodo de referência ($\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{KCl sat.}}$) e eletrodo auxilia (fio de platina) adquiridos da Sensolytics. A Figura 21 mostra o Microscópio Eletroquímico de Varredura.

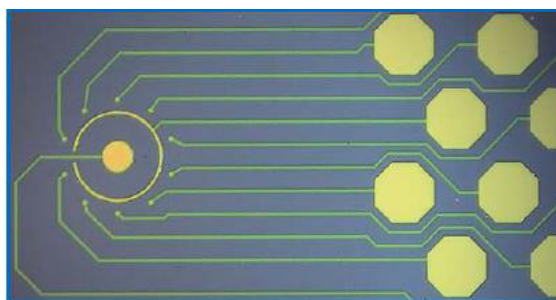
Figura 21 - Microscópio Eletroquímico de Varredura.



Fonte: Elaborado pelo Autor

A caracterização dos microeletrodos foi realizada sobre um substrato de referência contendo partes condutoras e isolantes adquiridos da Sensolytics. A Figura 22 mostra uma representação esquemática desse substrato.

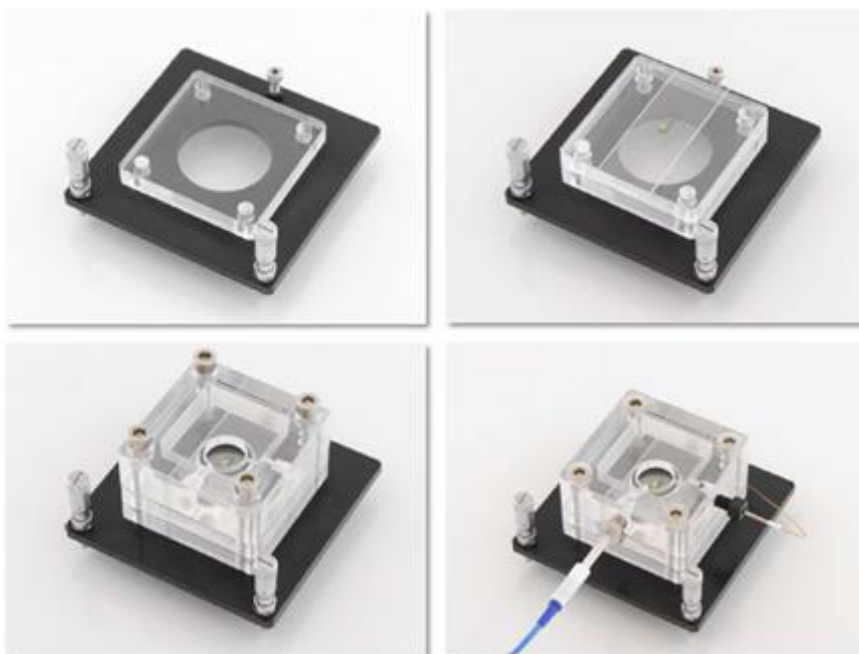
Figura 22 - Representação esquemática do substrato de referência.



Fonte: Adaptado de Sensolytics, 2015

As placas de vidro ou acrílico contendo os filmes de GOx, HRP, HRP/Gr e HRP/CNTs foram montadas na célula do SECM conforme a Figura 23, para a realização dos experimentos eletroquímicos. A célula em acrílico adquirida da Sensolytics tem capacidade para 20 mL.

Figura 23 - Célula usada em Microscopia Eletroquímica de Varredura.



Fonte: Adaptado de Sensolytics, 2015

3.2 Reagentes Utilizados

- Fosfato monobásico de potássio (KCl/KH₂PO₄) (Synth);
- Hidróxido de potássio (KOH), ácido clorídrico (HCl), cloreto de potássio (KCl) e peróxido de hidrogênio (30% em volume) (H₂O₂) (Vetec);
- Ferricianeto de potássio K₃[Fe(CN)₆] (Sigma-Aldrich);
- Glutaraldeído (Sigma-Aldrich);
- Hidroquinona (Sigma-Aldrich);
- Catecol (Sigma-Aldrich);
- Grafeno (Sintetizado conforme (FERREIRA et al. 2013));
- Nanotubos de Carbono ((Sigma-Aldrich);
- Peroxidase de raiz forte (1.11.1.7) (Sigma-Aldrich);
- Glicose oxidase (1.1.3.4) (GOx) (Sigma-Aldrich);

3.3 Procedimentos Analíticos

3.3.1 Formação dos filmes de GOx

A formação dos filmes da enzima GOx foi realizada em substrato isolante, para tanto, utilizou-se uma placa comercial de vidro ou acrílico. A princípio, foram pesados 2 miligramas (mg) de GOx e dissolvido em 250 microlitro (μL) de tampão fosfato (PBS) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH= 7,0), obtendo uma solução estoque (1) de concentração 8 mg.mL^{-1} . Em seguida, preparou-se $100 \mu\text{L}$ de glutaraldeído (GLU) 5% em PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH= 7,0), solução estoque (2). Da solução estoque (1) foram retirados $25 \mu\text{L}$ e da solução estoque (2) $10 \mu\text{L}$, as duas soluções foram transferidas para um portador de amostras (Eppendorf Safe-Lock Tubes - $1,5 \text{ mL}$), obtendo uma nova concentração para GOx de $5,71 \text{ mg.mL}^{-1}$ e 1, 43% GLU. Dessa mistura (GOx + GLU) foi retirada uma alíquota de $10 \mu\text{L}$ para modificar o substrato (placa de vidro ou acrílico). Feito isso, a placa foi deixada em repouso a uma temperatura de aproximadamente 5°C por duas horas.

3.3.2 Formação dos filmes de HRP

A formação dos filmes da enzima HRP foi realizada em substrato isolante, para tanto, utilizou-se uma placa comercial de vidro ou acrílico. A princípio, foram pesados 2 mg de HRP e dissolvido em $250 \mu\text{L}$ de tampão fosfato (PBS) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH= 7,0), obtendo uma solução estoque (1) de concentração 8 mg.mL^{-1} . Em seguida, preparou-se $100 \mu\text{L}$ de glutaraldeído (GLU) 5% em PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH= 7,0), solução estoque (2). Da solução estoque (1) foram retirados $25 \mu\text{L}$ e da solução estoque (2) $10 \mu\text{L}$, as duas soluções foram transferidas para um portador de amostras (Eppendorf Safe-Lock Tubes - $1,5 \text{ mL}$), obtendo uma nova concentração para HRP de $5,71 \text{ mg.mL}^{-1}$ e 1, 43% GLU. Dessa mistura (HRP + GLU) foi retirada uma alíquota de $10 \mu\text{L}$ para modificar o substrato (placa de vidro ou acrílico). Feito isso, a placa contendo o filme foi deixada em repouso a uma temperatura de aproximadamente 5°C por duas horas.

3.3.3 Formação dos filmes de HRP com Grafeno

Ao eppendorf contendo 35 μL de HRP com concentração 5,71 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 1, 43% GLU foi misturado uma quantidade de 1 mg de grafeno (Gr). Dessa suspensão (HRP + Gr + GLU) foi retirada uma alíquota de 10 μL para modificar o substrato. Feito isso, a placa contendo o filme foi deixada em repouso a uma temperatura de aproximadamente 5° C duas horas.

3.3.4 Formação dos filmes de HRP Nanotubos de Carbono

Ao eppendorf contendo 35 μL de HRP com concentração 5,71 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 1, 43% GLU foi misturado uma quantidade de 1 mg de nanotubos de carbono (CNTs). Dessa suspensão (HRP + CNTs + GLU) foi retirada uma alíquota de 10 μL para modificar o substrato. Feito isso, a placa contendo o filme foi deixada em repouso a uma temperatura de aproximadamente 5° C por duas horas.

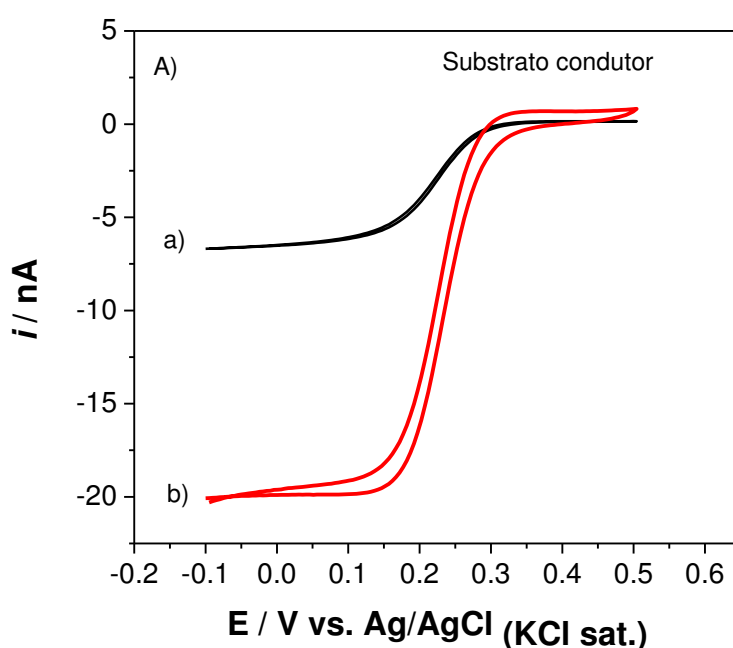
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

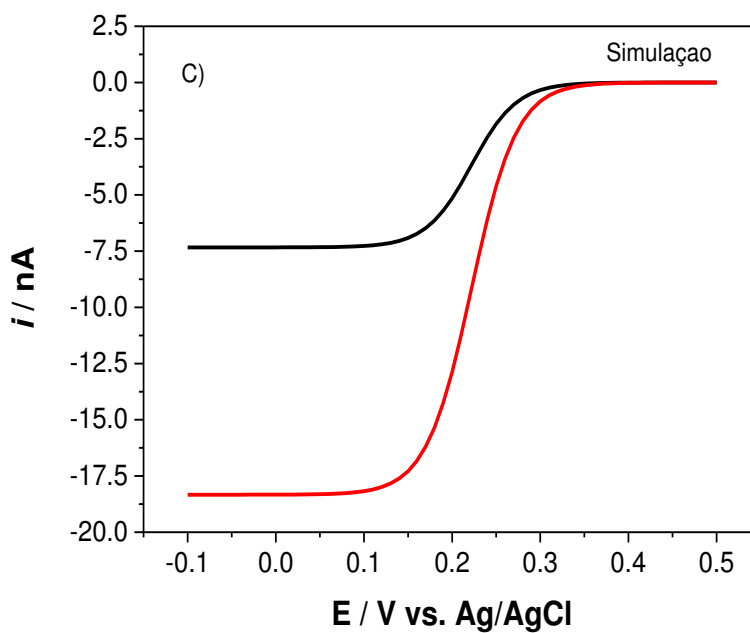
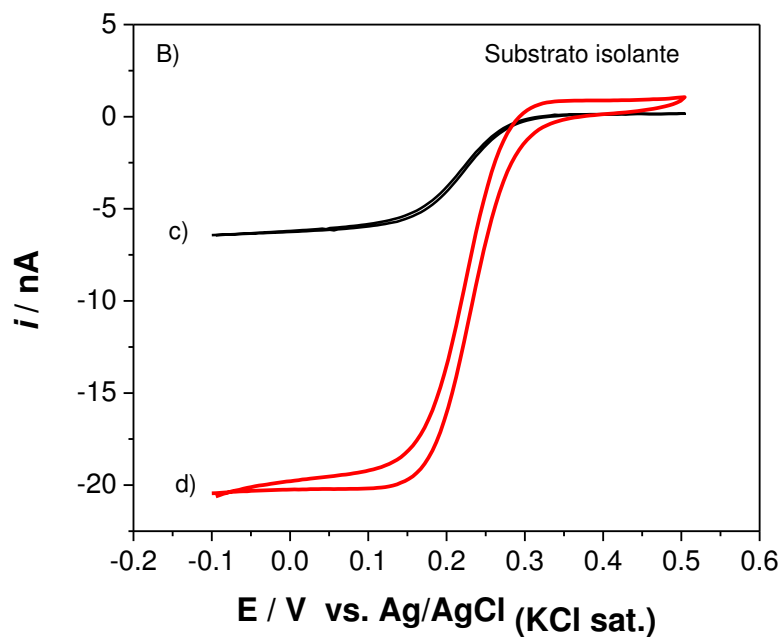
4.1 Caracterização dos Microeletrodos

Dentre as técnicas de caracterização eletroquímica de microeletrodos destacam-se a voltametria cíclica (VC) e a Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM) (ZOSKI, 2006). O perfil voltamétrico obtido por VC pode ser empregado na avaliação do tipo de comportamento que o microeletrodo manifesta no que diz respeito à sua resposta eletroquímica em relação ao tempo. Por outro lado, a SECM fornece informações importantes sobre as características geométricas dos microeletrodos (raio e Rg).

Com o objetivo de caracterizar os microeletrodos por VC, foram obtidos voltamogramas cíclicos em solução de ferricianeto de potássio a uma concentração de 5 mmol.L^{-1} . Os perfis voltamétricos dos microeletrodos empregados neste trabalho são apresentados na Figura 24.

Figura 24 - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de ferricianeto de potássio 5 mmol.L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ utilizando microeletrodos de platina. (a) e (c) microeletrodo com raio nominal de $5 \mu\text{m}$. (b) e (d) microeletrodo de raio nominal $12,5 \mu\text{m}$. Velocidade de varredura de 100 mV.s^{-1} . O voltamograma em (A) foi realizado sobre substrato condutor e em (B) sobre substrato isolante. Os voltamogramas em (C) foram simulados nas mesmas condições dos voltamogramas experimentais.





Fonte: Elaborado pelo Autor

Os voltamogramas apresentam um perfil sigmoidal com baixa histerese para ambos os eletrodos, o que não é típico em voltamogramas obtidos empregando-se eletrodos convencionais com dimensões superiores à espessura da camada de difusão. Tais perfis voltamétricos em microeletrodos são típicos de sistemas

eletroquímicos cujas correntes elétricas são limitadas por difusão tendo em vista a elevada velocidade de transferência eletrônica heterogênea (WALSH; LOVELOCK; LICENCE, 2010). Ainda mais, pode-se observar na Figura 24A e 24B, que os perfis dos voltamogramas a uma distância “semi-infinita” entre o microeletrodo e o substrato ($d > 200 \mu\text{m}$), não mudam quando são feitos sobre substrato condutor ou isolante.

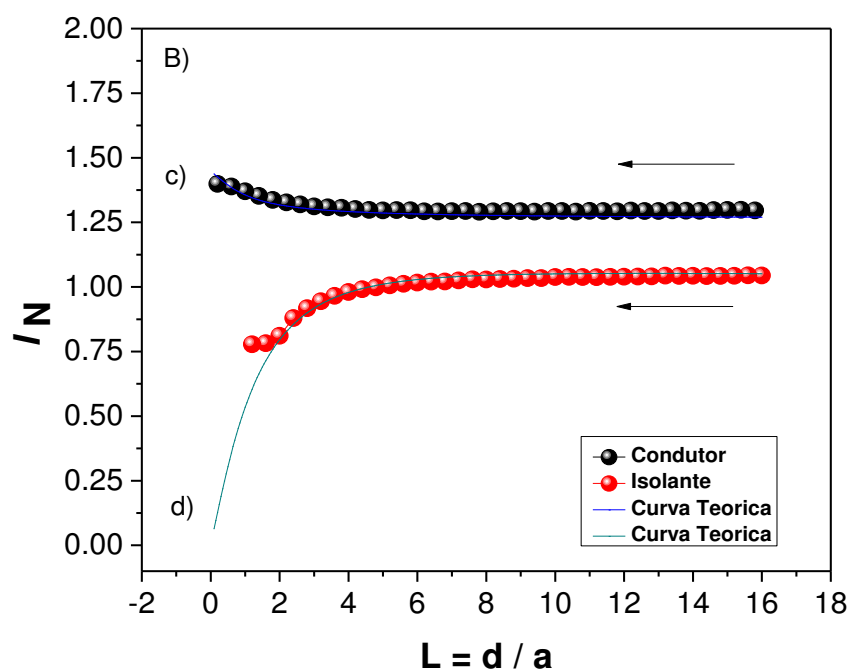
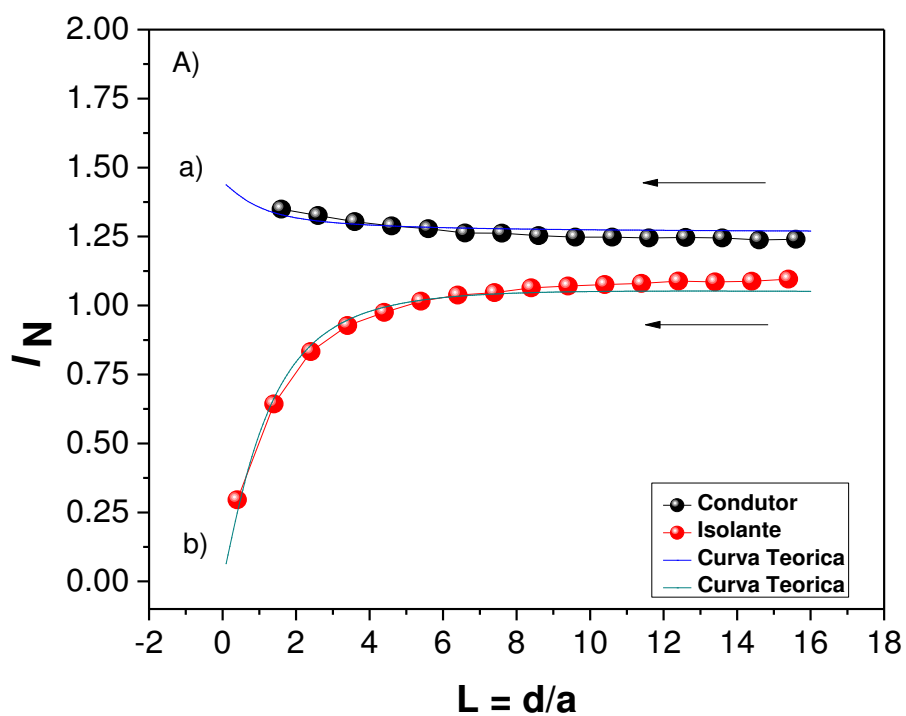
As correntes limites de redução apresentadas nessas figuras são consistentes com as correntes teóricas simuladas, para difusão “semi-infinita” empregando os microeletrodos. As correntes limite observadas foram -7,5 nA e -21 nA para o microeletrodo de raio de 5 μm e 12,5 μm , respectivamente. As correntes teóricas previstas para o microeletrodo de raio de 5 μm e 12,5 μm são -7,33 nA e -18,3 nA, valores que estão em concordância com os obtidos neste trabalho. Os voltamogramas teóricos foram obtidos usando a seguinte equação (BOND; OLDHAM; ZOSKI, 1988).

$$i = \frac{i_{T,\infty}}{1 + \frac{D_O}{D_R} e^{\left[\frac{nF(E-E_0)}{RT}\right]}} \quad \text{Eq. (30)}$$

onde, $i_{T,\infty}$ é a corrente do microeletrodo limitada por difusão no seio da solução, D_O e D_R são os coeficientes de difusão das espécies que estão sendo oxidada e reduzida, respectivamente, E_0 , é o potencial padrão dado em volt (V), E é o potencial aplicado (V), R é a constante dos gases ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), e F é a constante de Faraday ($\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$), C ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$) representa a concentração da espécie oxidada, T é a temperatura (K), e n é o número de elétrons transferidos .

Adicionalmente com o propósito de caracterizar os microeletrodos por SECM, foram realizadas curvas de aproximação em solução de ferricianeto de potássio a uma concentração de 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. A caracterização por SECM foi empregada com o objetivo de verificar o Rg dos microeletrodos empregados. A Figura 25 apresenta as curvas de aproximação obtidas empregando-se os microeletrodos de raios de 5 μm e 12,5 μm frente a um substrato de referência contendo parte isolantes e condutoras.

Figura 25 - Curvas de aproximação SECM no modo de *Feedback* de corrente normalizada vs. distância normalizada utilizando microeletrodo A) 5 μm B) 12,5 μm em superfícies a) e c) condutora, b) e d) isolante em solução de ferricianeto de potássio 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em KCl 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.). Velocidade aproximação de 10 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.



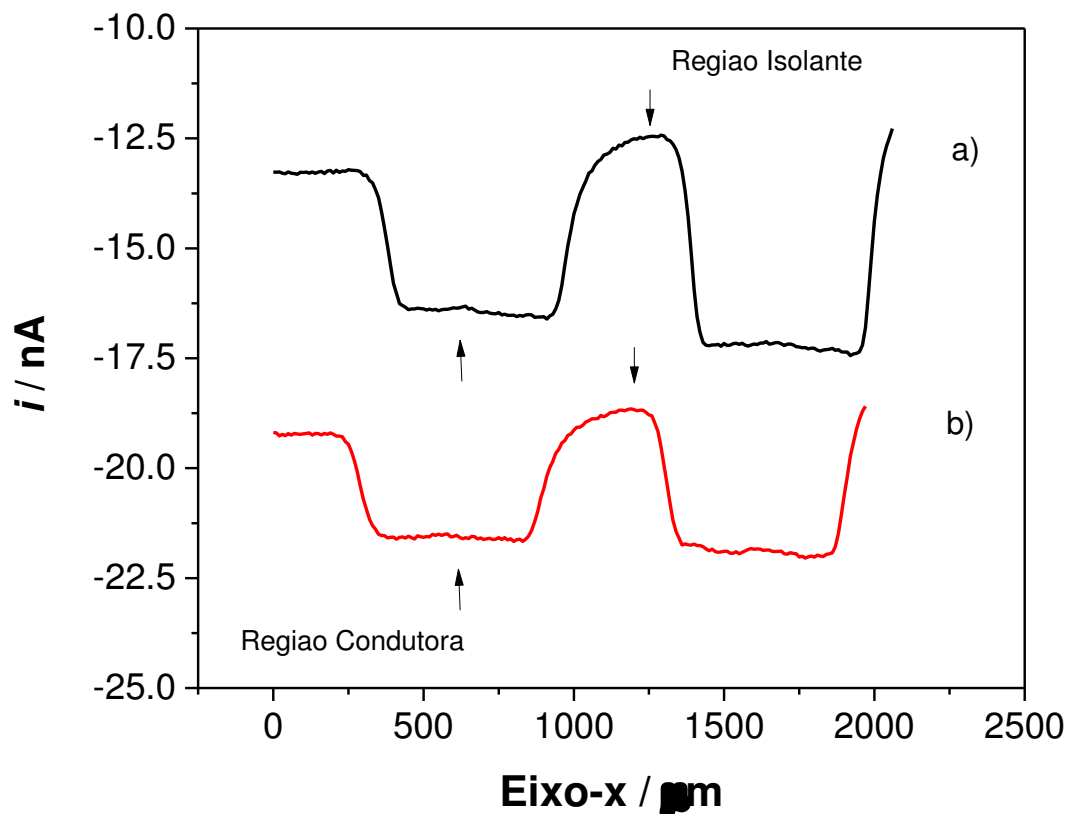
Fonte: Elaborado pelo Autor

As curvas (a) e (c) apresentadas na Figura 25 referem-se à aproximação dos microeletrodos de raios de 5 μm e 12,5 μm , respectivamente, a regiões condutoras do substrato de referência. Conforme pode ser observado, ambas as curvas apresentam incremento em seus valores de corrente normalizada à medida que a distância microelétrodo-substrato diminui, mostrando o evento que caracteriza o *Feedback Positivo*. Por outro lado, as curvas (b) e (d) são referentes à aproximação dos microeletrodos de raios 5 μm e 12,5 μm , respectivamente, sobre regiões isolantes do substrato. As curvas sobre substrato isolante, em contraste com as realizadas sobre substrato condutor, apresentam decréscimo em seus valores de corrente normalizada à medida que a distância microelétrodo-substrato diminui, mostrando a ocorrência que caracteriza o fenômeno *Feedback Negativo*.

As linhas contínuas apresentadas nessas figuras representam curvas simuladas para microeletrodo sobre substrato condutor e isolante. Essas curvas de aproximação teóricas são referentes à processos sob controle difusional, as mesmas foram realizadas usando as Equações (19 - 22). Nas simulações foram encontrados valores de Rg próximos a dez para esses microeletrodos.

Com o propósito de avaliar a capacidade dos microeletrodos no monitoramento lateral e espacial dos processos de retroalimentação e bloqueio das espécies, foram realizadas varreduras laterais no modo de *Feedback* sobre um substrato padrão com características condutoras e isolante em regiões distintas de sua superfície. A Figura 26, mostra uma varredura lateral sobre o substrato de referência contendo partes isolantes assim como condutoras em diferentes regiões, utilizando (a) e (b) microeletrodos de raios 5 μm e 12,5 μm , respectivamente.

Figura 26 - Varredura lateral no eixo x usando o modo operacional de *Feedback* obtidas em solução de ferricianeto de potássio 5 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹ utilizando microeletrodos de platina a) microeletrodo de raio 5 μm , b) microeletrodo de raio 12,5 μm . O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.). Velocidade lateral de 10 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.



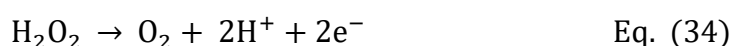
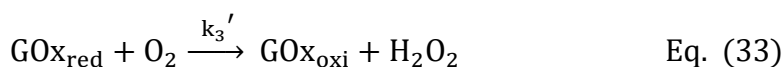
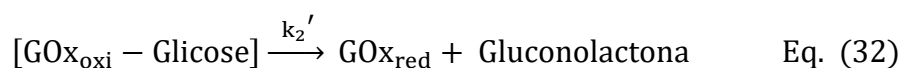
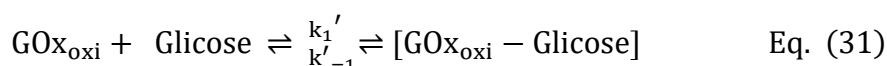
Fonte: Elaborado pelo Autor

Foi realizada uma aproximação microeletrodo-substrato no eixo (z), fixando as coordenadas (x) e (y). Da curva de aproximação obtida, foi calculada a distância real do microeletrodo-substrato em aproximadamente 50 μm . Posteriormente, fixou-se o microeletrodo nas coordenadas (y) e (z) e foi feita uma varredura lateral movendo o microeletrodo no eixo (x) (no sentido positivo) em 2000 μm a uma velocidade de 10 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Como pode ser observado, a corrente de redução varia à medida que o microeletrodo sai de uma região isolante para uma região condutora, ou seja, em regiões onde ocorre o processo de retroalimentação, é verificado um aumento significativo da corrente faradaica para valores mais negativos, enquanto que nas regiões com características isolantes, o bloqueio das espécies implica numa diminuição dessa corrente.

Do exposto, fica evidente que os microeletrodos aqui empregados podem ser utilizados como sonda para SECM na investigação da reatividade de reações químicas catalisadas por enzimas.

4.2 Aplicações da SECM na investigação da reatividade da enzima glicose oxidase

A reação geral catalisada pela GOx envolve o consumo de moléculas de glicose e de oxigênio para produzir ácido glucônico. Esta reação consome oxigênio, uma característica que permite GOx para ser usada como um captador de oxigênio molecular (WONG; WONG; CHEN, 2008) conforme descrito nas reações a seguir:

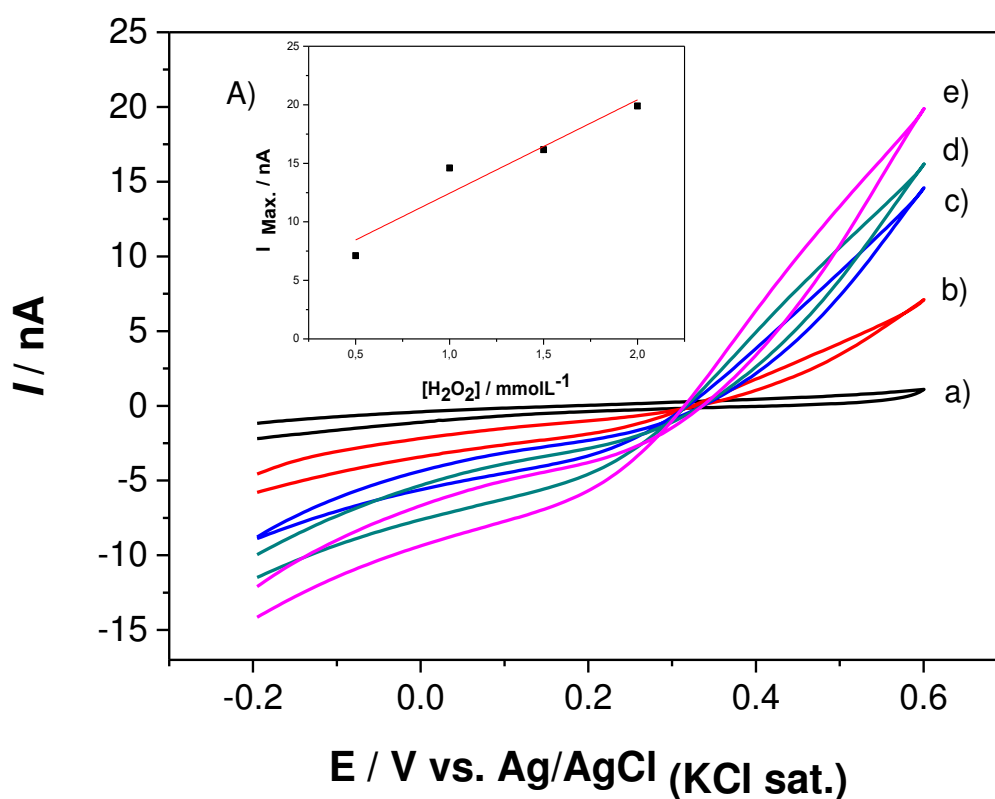


A constante k_1' , está associada à velocidade de formação do complexo $[\text{GOx}_{\text{oxi}} - \text{Glicose}]$, enquanto que a constante k'_{-1} está relacionado com a velocidade da dissociação desse complexo. A constante k_2' está associada à velocidade da dissociação do complexo para a formação do ácido glucônico (FURICO JUNIOR, 2001).

Nesse mecanismo, a glicose oxidase em sua forma nativa (GOx_{oxi}) se combina com o substrato enzimático em um processo rápido e reversível formando o complexo enzima-substrato $[\text{GOx}_{\text{oxi}} - \text{Glicose}]$. Numa segunda etapa, mais lenta, o complexo formado enzima-substrato se rompe liberando a gluconolactona e a enzima livre na forma reduzida (GOx_{red}). Em seguida, a GOx_{red} reage com o oxigênio molecular O_2 formando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que pode ser oxidado eletroquimicamente no microeletrodo (Eq. 34) via dois elétrons e dois prótons, reciclando a enzima glicose oxidase à sua forma nativa (GIBSON; SWOBODA; MASSEY, 1964).

Para verificar a efetiva oxidação do peróxido de hidrogênio no microeletrodo de platina, foram realizados voltamogramas cíclicos e verificado a corrente máxima à medida que a concentração do H_2O_2 é aumentada de (0,5 até 2) mmol.L^{-1} . Esses voltamogramas podem ser observados na Figura 27.

Figura 27 - Voltamogramas cíclicos realizados em PBS 0,1 mol.L^{-1} (pH=7,0) em microeletrodo de platina (Pt) raio 12,5 μm variando a concentração de H_2O_2 em a) PBS, b) 0,5 mmol.L^{-1} , c) 1,0 mmol.L^{-1} , d) 1,5 mmol.L^{-1} , e) 2,0 mmol.L^{-1} .



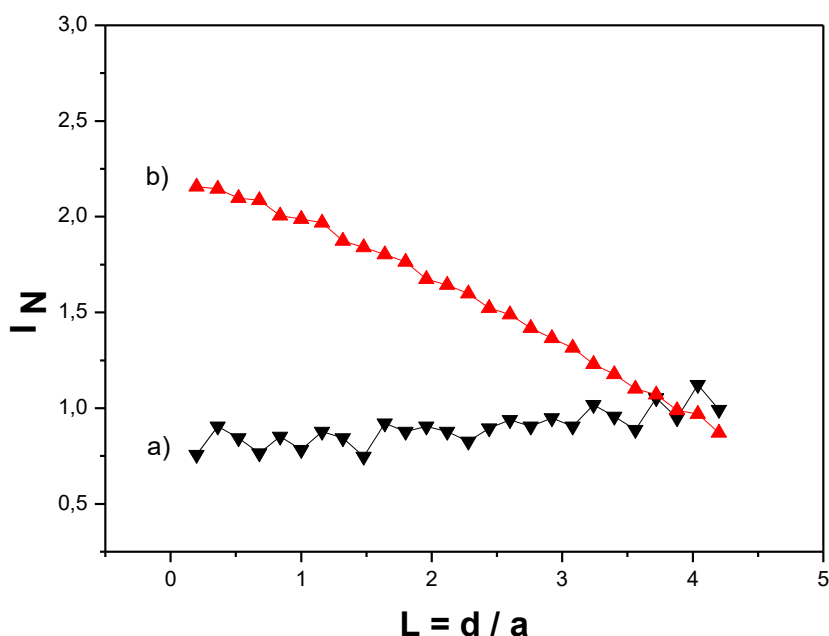
Fonte: Elaborado pelo Autor

À medida que a concentração de H_2O_2 é aumentada de (0,5 – 2,0 mmol.L^{-1}) ocorre um aumento da corrente máxima para o potencial de +600 mV, essa correlação possibilita compreender o processo catalítico da enzima GOx a partir da oxidação do H_2O_2 na ponta do microeletrodo para esse potencial.

Com propósito de avaliar os processos reacionais dos filmes contendo a enzima glicose oxidase, um substrato de natureza isolante (placa de vidro ou placa de acrílico) foi modificado com a enzima GOx e, em seguida foram realizadas curvas de aproximação SECM, na ausência e na presença de GOx (Figura 28). Neste

modo, foi escolhido o potencial de +600 mV para avaliar o perfil das curvas de aproximação.

Figura 28 - Curvas de aproximação do microeletrodo frente ao substrato isolante modificado com a enzima glicose oxidase obtidas por SECM (corrente normalizada vs. distância normalizada). As curvas de aproximação foram obtidas a) na ausência de GOx e b) na presença de GOx em 5 mmol.L⁻¹ de glicose. Todas as medidas foram obtidas na presença de oxigênio molecular (ar em equilíbrio). O potencial aplicado ao microeletrodo foi +600 mV vs. Ag/AgCl (KCl sat.). Velocidade de aproximação de 2,5 μm.s⁻¹.



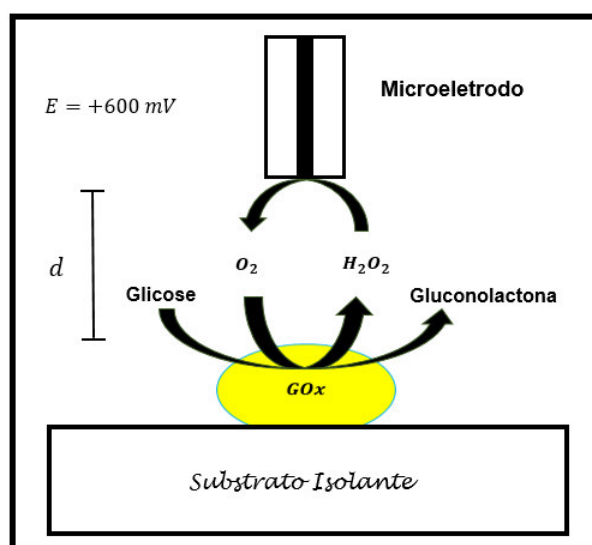
Fonte: Elaborado pelo Autor

Na Figura 28(b), pode-se observar um aumento significativo (em torno de 2,2) da corrente normalizada em função da distância normalizada, mostrando que a oxidação da glicose pela enzima GOx está se acentuando a medida que o microeletrodo se aproxima do substrato, pois ocorre um aumento significativo da corrente obtida a partir da oxidação eletroquímica do H₂O₂ no microeletrodo (MORKVENAITE-VILKONCIENE, RAMANAVICIENE; RAMANAVICIUS, 2014). Pode-se verificar que na presença de GOx ocorre o fenômeno de *Feedback Positivo*. Por outro lado, a curva em preto Figura 28(a) foi realizada na ausência da enzima

GOx, mostrando uma diminuição da corrente normalizada (em torno de 0,25 (I_N)) à medida que o microeletrodo se aproxima do substrato (*Feedback Negativo*).

Tendo em vista as reações representadas nas Equações (31-34) e a efetiva oxidação do H_2O_2 no potencial de +600 mV, o seguinte esquema apresentado na Figura 25, ilustra um diagrama esquemático do possível mecanismo reacional que se desenvolve nas medidas de SECM para o substrato modificado GOx.

Figura 29 - Diagrama esquemático do mecanismo reacional da GOx empregando a glicose como substrato e o par O_2/H_2O_2 para as medidas de SECM.



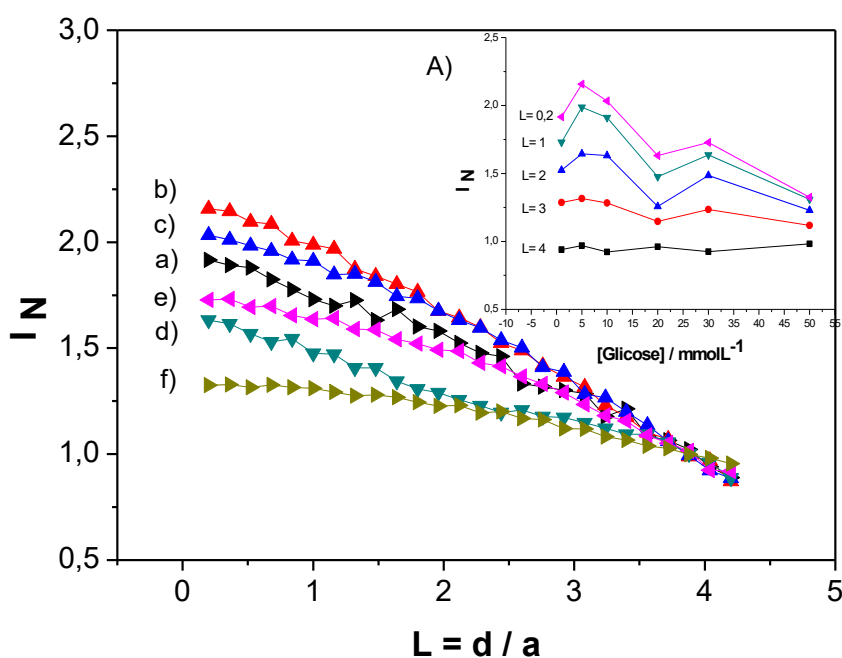
Fonte: Elaborado pelo Autor

De acordo com esse esquema reacional, o processo tem início com a reação entre a enzima glicose oxidase e a glicose na presença de oxigênio molecular, com a formação do peróxido de hidrogênio e da gluconolactona, que de forma espontânea se hidrolisa em ácido glucônico. Nesse esquema reacional, a oxidação da glicose por GOx na presença de O_2 , é verificada de forma indireta pela oxidação do H_2O_2 no microeletrodo (WONG; WONG; CHEN, 2008).

Para comprovar a validade do mecanismo, foram realizadas curvas de aproximação no modo de operação em que o substrato gera a espécie que será oxidada no microeletrodo (SG/TC). Neste modo, foi aplicado um potencial de +600 mV ao microeletrodo, e feito a aproximação do microeletrodo-substrato a uma velocidade de $2,5 \mu\text{ms}^{-1}$ com o objetivo de avaliar o efeito da concentração de glicose no perfil das curvas de aproximação. Para isso, imobilizou-se a enzima GOx

em substrato isolante e variou-se a concentração de glicose de (1,0 - 50 mmol.L⁻¹). A Figura 30 apresenta as curvas para diferentes concentrações de glicose.

Figura 30 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,00) em superfície isolante com GOx imobilizada variando a concentração de glicose a) 1,0 mmol.L⁻¹, b) 5,0 mmol.L⁻¹, c) 10 mmol.L⁻¹, d) 20 mmol.L⁻¹, e) 30 mmol.L⁻¹ e f) 50 mmol.L⁻¹ (usando como mediador redox o oxigênio molecular). O potencial aplicado ao microeletrodo foi de +600 mV vs. Ag/AgCl (KCl sat.). Velocidade de aproximação de 2,5 μm.s⁻¹.



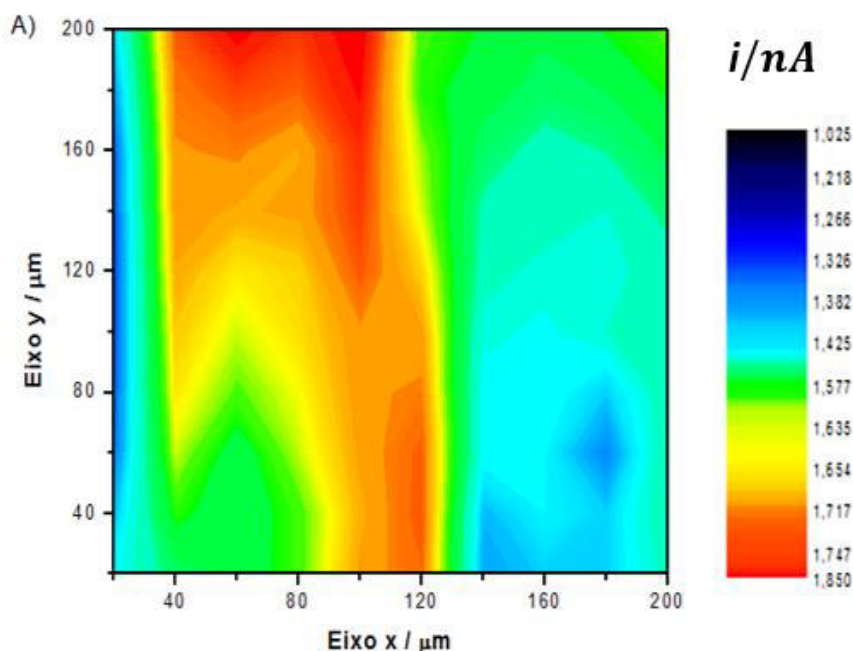
Fonte: Elaborado pelo Autor

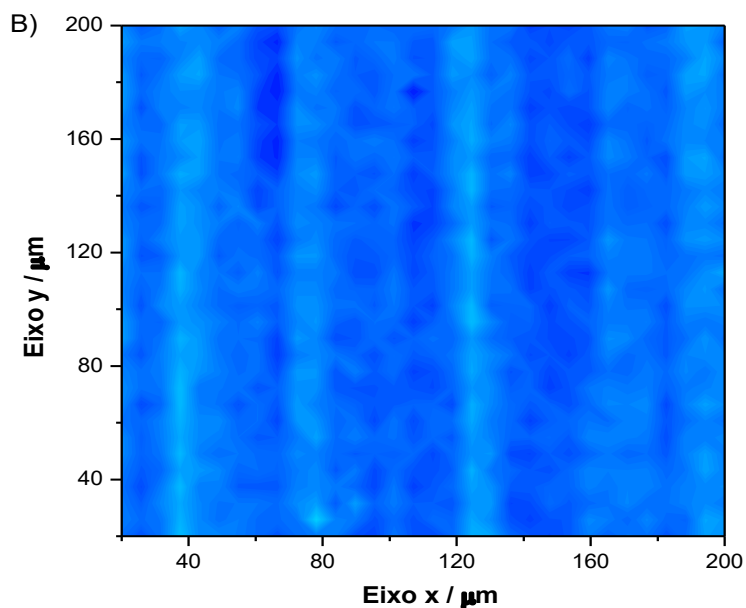
As curvas de aproximação para diversas concentrações de glicose, usando um microeletrodo de raio 12,5 μm. A enzima GOx catalisa de forma eficiente a oxidação da glicose para gluconolactona e peróxido de hidrogênio na presença de oxigênio molecular. À medida que a concentração de glicose é aumentada pode-se verificar que a concentração de peróxido de hidrogênio é maior e, posteriormente, o H₂O₂ formado é oxidado eletroquimicamente na superfície microeletrodo, sendo verificado um aumento na corrente normalizada. A variação da corrente normalizada tem seu máximo (curva em vermelho mostra uma variação da corrente normalizada em 2,23 nA) para a concentração de 5 mmol.L⁻¹ de glicose. Entretanto, quando a concentração de glicose é maior 5 mmol.L⁻¹ ocorre uma saturação da enzima e por consequência a diminuição da corrente da corrente normalizada. A Figura 30(A),

inserida na Figura 30, foi retirada das curvas de aproximação, plotando as correntes normalizadas em diferentes distâncias normalizadas, ou seja, $L = (4, 3, 2, 1 \text{ e } 0,2)$, respectivamente.

Além disso, a atividade eletroquímica local da GOx foi verificada com a aquisição de uma imagem SECM. Para isso, imobilizou-se a enzima sobre um substrato isolante e, feito uma curva de aproximação no eixo de coordenada z , distância em torno de $50 \mu\text{m}$ microeletrodo-substrato, essa distância foi mantida durante todo o experimento. Para fazer a imagem, foi fixada a concentração de glicose de 30 mmol.L^{-1} e aplicando um potencial de $+600 \text{ mV}$ ao microeletrodo e, em seguida, realizada a movimentação do mesmo nos eixos x - y ($200\mu\text{m} - 200\mu\text{m}$) com a finalidade de monitorar a corrente em diferentes regiões. A Figura 31 mostra as imagens obtidas.

Figura 31 - Imagens SECM obtidas em PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ($\text{pH}=7,00$) com uma concentração de glicose de 30 mmol.L^{-1} e microeletrodo polarizado em $+600 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat.})}$. Na Figura 27(A) na presença de GOx e 27(B) na ausência de GOx. Velocidade de aquisição da imagem $25 \mu\text{m.s}^{-1}$ em uma região de ($200 \mu\text{m} - 200 \mu\text{m}$) nos eixos x - y , respectivamente.



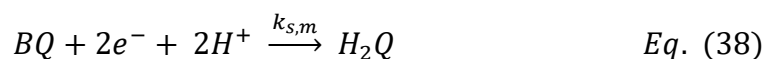
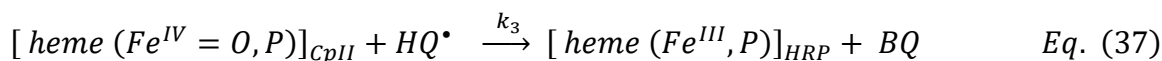
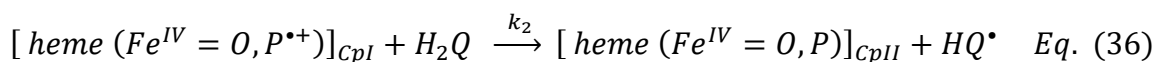
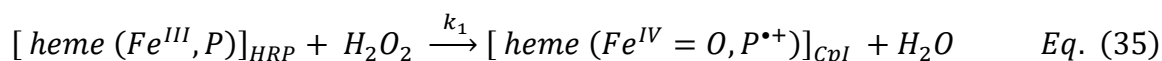


Fonte: Elaborado pelo Autor

A variação na coloração da Figura 31(A) mostra a atividade enzimática da GOx. Pois, nas regiões com a coloração (verde, amarela e vermelha), a corrente se torna gradativamente maior, obtida a partir da oxidação eletroquímica do peróxido de hidrogênio no microeletrodo, ao passo, que nas regiões azuladas verifica-se a diminuição significativa da corrente e por consequência uma menor atividade enzimática local na formação do H_2O_2 . Por outro lado, a Figura 31(B) detalha uma região onde não há enzima GOx, mostrando assim, que nessa região não está ocorrendo à oxidação da glicose e por consequência não há formação do H_2O_2 que é monitorado no microeletrodo.

4.3 Aplicações da SECM na investigação da reatividade da enzima peroxidase de raiz forte sobre diferentes plataformas

O ciclo catalítico da HRP pode ser expresso de forma similar a uma catálise homogênea. Um caso especial é o da oxidação da hidroquinona pela HRP, considerando o mecanismo em três etapas que pode ser bem representado pelas seguintes Equações (35)-(37) (GORTON et al., 1999).



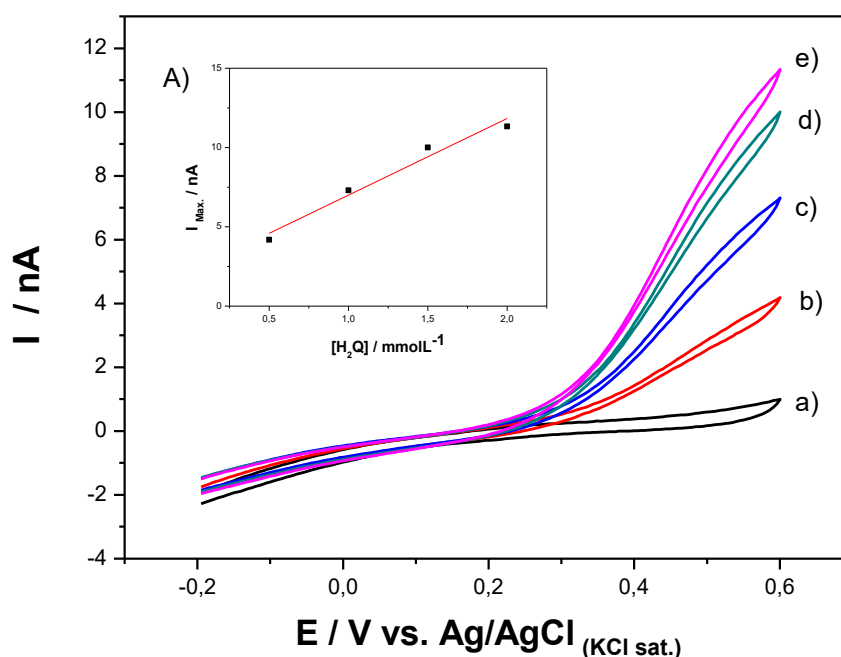
A Equação 34 envolve a oxidação do grupo prostético heme (Fe^{III} , P) da HRP pelo peróxido de hidrogênio via dois elétrons, e a formação de um composto intermediário, no estado (Fe^{IV} , CpI), consistindo do ferro oxiferril ($\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}$, $\text{P}^{\bullet+}$) e do cátion radical π porfirínico. Na Equação 35, o composto intermediário CpI formado sofre uma reação de redução química pela transferência de um elétron da H_2Q , formando composto intermediário ($\text{O}=\text{Fe}^{\text{IV}}$, P) ou CpII e o íon íon monofenolato (HQ^{\bullet}). Em uma terceira etapa um elétron adicional pode ser transferido, proveniente desse íon HQ^{\bullet} (Equação 36), de forma que a enzima retorne a forma nativa [$\text{heme}(\text{Fe}^{\text{III}}, \text{P})]_{\text{HRP}}$ e uma molécula de Benzoquinona (BQ) DAMOS et al., 2003).

As constantes k_1 , k_2 , k_3 devem ser consideradas para todos os ciclos de três etapas de HRP: formação de compostos I (CpI) seguido de sua redução em duas etapas e, as três etapas são normalmente irreversíveis. A constantes cinética k_1 está associada à velocidade de formação do composto I (CpI), enquanto que a constante k_2 está relacionado com a velocidade da formação do composto II (CpII), e k_3 relacionado com a regeneração da enzima para sua forma nativa (GORTON et al., 1999).

Para verificar a efetiva oxidação da H_2Q no microeletrodo, foram realizados voltamogramas cíclicos e verificado a corrente máxima no potencial de +600 mV, à

medida que sua concentração é aumentada. Esses voltamogramas podem ser observados na Figura 32.

Figura 32 - Voltamogramas cíclicos realizados em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) em microeletrodo de platina (Pt) raio 12,5 μm variando a concentração de H₂Q em a) PBS, b) 0,5 mmol.L⁻¹, c) 1 mmol.L⁻¹, d) 1,5 mmol.L⁻¹, e) 2,0 mmol.L⁻¹. Velocidade de varredura 100 mV.s⁻¹.

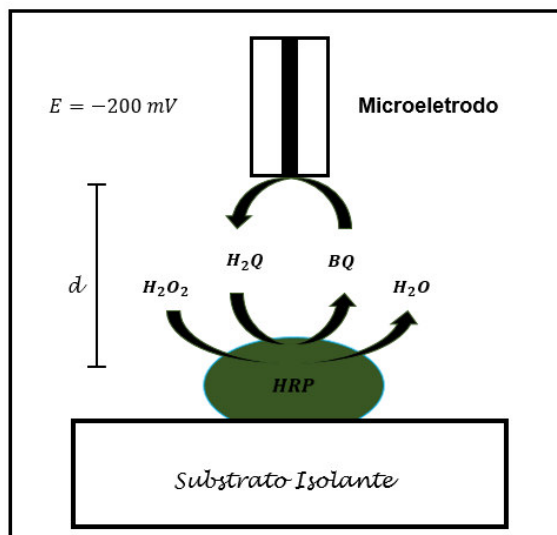


Fonte: Elaborado pelo Autor

Pode-se verificar que à medida que a concentração de hidroquinona é aumentada de (a) para (e) ocorre um aumento da corrente máxima para o potencial de +600 mV, essa correlação possibilita assim, compreender o processo catalítico a partir da oxidação do H₂Q no microeletrodo.

Tendo em vista a oxidação da H₂Q, foi proposto um possível mecanismo reacional do processo electrocatalítico por transferência eletrônica mediada. Esse esquema em três etapas simplificadas pode ser verificado na Figura 33.

Figura 33 - Diagrama esquemático do mecanismo electrocatalítico de reação da HRP usando o par redox H_2Q/BQ e peróxido de hidrogênio no modo de *SG/TC* SECM.



Fonte: Elaborado pelo Autor

Nesse mecanismo reacional, o peróxido de hidrogênio é reduzido pela enzima HRP formando água e um composto intermediário (Cpl), esse composto intermediário oxida uma molécula de hidroquinona (H_2Q), e por consequência forma um segundo composto intermediário (CpII) e o íon monofenolato (HQ^*). Em uma terceira etapa, o composto (CpII) oxida o íon HQ^* formando a BQ e retorna a enzima HRP retorna à sua forma nativa. Sendo assim, as moléculas de H_2Q que passaram para forma de BQ são reduzidos à medida que o microeletrodo se aproxima da enzima.

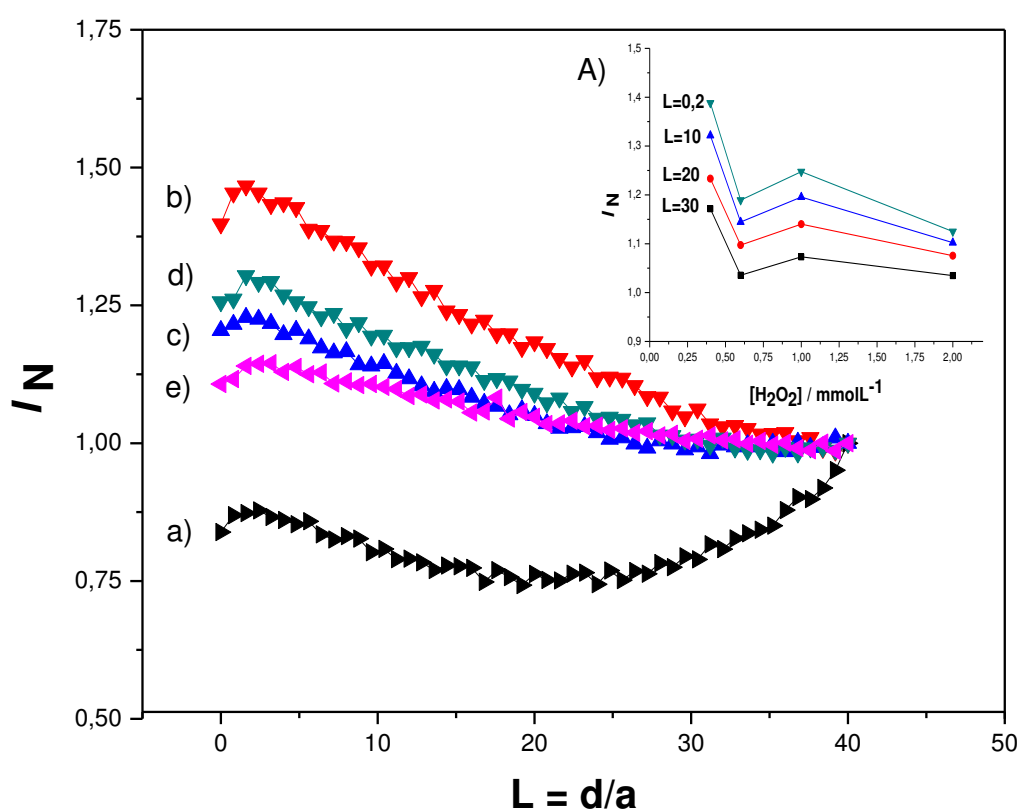
Para verificar a validade desse mecanismo reacional, foram realizadas curvas de aproximação no modo de *Gerador/Coletor* com a enzima HRP imobilizada sobre substrato isolante.

4.3.1 Curvas de aproximação SECM sobre substrato isolante para HRP

Com o objetivo de entender o mecanismo reacional da enzima HRP, foram realizadas curvas de aproximação no modo de operação *SG/TC* SECM. Neste modo, foi aplicando um potencial de -200 mV ao microeletrodo e raio 12,5 μm , e feito à aproximação lentamente microeletrodo-substrato com a enzima imobilizada. Para

isso, fixou-se a concentração de H_2Q em $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ e variou-se a concentração de H_2O_2 de ($0,2 - 2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$) para observar o perfil das curvas de aproximação. Esses perfis são mostrados na Figura 34.

Figura 34 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP imobilizada em PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ($\text{pH}=7,0$) na presença de $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de H_2Q e variando a concentração de H_2O_2 em a) $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$, b) $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$, c) $0,6 \text{ mmol.L}^{-1}$; d) $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, e) $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de $-200 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat.})}$. Velocidade de aproximação de $10 \mu\text{m.s}^{-1}$.



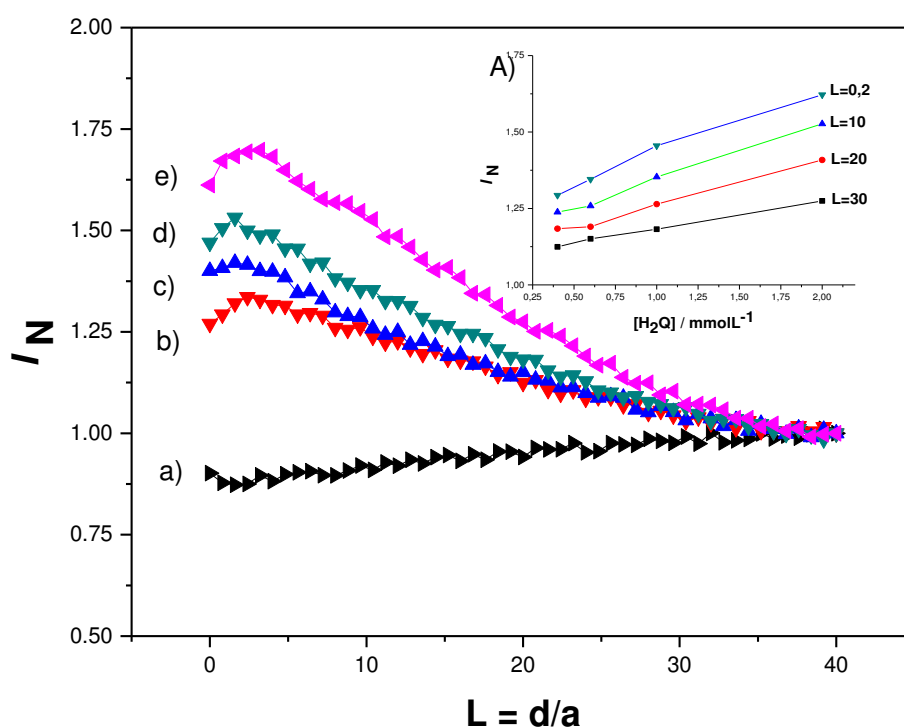
Fonte: Elaborado pelo Autor

Como pode ser observado, a enzima HRP catalisa a oxidação da molécula de H_2Q para BQ. A BQ gerada irá difundir a partir do substrato para a ponta do microeletrodo, e sua concentração é uma função da distância microeletrodo-substrato. Assim, a concentração de BQ gerada nas proximidades da superfície do substrato modificado é elevada. Nesse sentido, é verificado um aumento da corrente normalizada (I_N) em função da distância normalizada (L). A Figura 34(A), inserida na Figura 34, foi retirada das curvas de aproximação, plotando as correntes normalizadas em diferentes distâncias normalizadas, ou seja, $L = (30, 20, 10 \text{ e } 0,2)$,

respectivamente. Nessa Figura, pode-se observar que à medida que a concentração de H_2O_2 é aumentada gradativamente de 0,4 para 2,0 mmol.L^{-1} , ocorre um decréscimo da corrente normalizada, tendo seu máximo ($I_N = 1,5$) para a concentração de 0,4 mmol.L^{-1} de H_2O_2 , Figura 34(b). As maiores correntes foram observadas para valores pequenos da distância normalizada, ou seja, ($L = 0,2$), mostrando que a corrente monitorada é uma função da distância microeletrodo-substrato.

Outra forma de reproduzir esse experimento foi mudando a forma de variar os parâmetros. Sob tal enfoque, variou-se concentração de H_2Q (0,2 – 2,0 mmol.L^{-1}) mantendo a concentração do H_2O_2 em 1,0 mmol.L^{-1}) para avaliar diferenças no perfil das curvas de aproximação. A Figura 35 apresenta essas curvas de aproximação.

Figura 35 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP immobilizada em PBS 0,1 mol.L^{-1} (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L^{-1} de H_2O_2 e variando a concentração de H_2Q em a) 0,2 mmol.L^{-1} , b) 0,4 mmol.L^{-1} , c) 0,6 mmol.L^{-1} ; d) 1,0 mmol.L^{-1} , e) 2,0 mmol.L^{-1} . O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat.})}$. Velocidade de aproximação de 10 $\mu\text{m.s}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pelo Autor

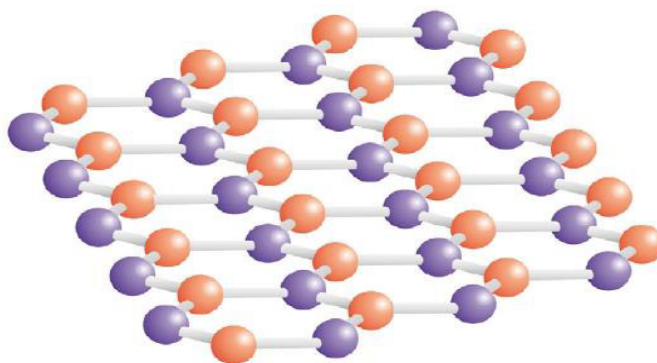
Conforme pode ser visualizado, ocorre um aumento da corrente normalizada em função da distância normalizada (perfis das curvas de (a) para (e)), esse aspecto está bem representado na Figura 35(A). A Figura 35(A), foi retirada das curvas de aproximação, plotando as correntes normalizadas em diferentes distâncias normalizadas, ou seja, $L = (30, 20, 10 \text{ e } 0,2)$. À medida que a concentração de H_2O foi variada de 0,2 para 2,0 mmol.L^{-1} , ocorre um aumento da corrente normalizada nas proximidades da enzima, tendo seu máximo em ($I_N=1,75$) para a concentração de 2 mmol.L^{-1} de H_2Q . As maiores correntes foram verificadas para valores pequenos da distância normalizada, ou seja, ($L = 0,2$), mostrando que a corrente monitorada é uma função da distância microeletrodo-substrato.

4.3.2 Curvas de aproximação SECM sobre substrato isolante para HRP/Gr

Outro estudo foi realizado com o propósito de entender o mecanismo reacional da enzima HRP sobre a plataforma de grafeno, tendo em vista as suas excelentes propriedades mecânicas, elétricas, térmicas. Essas propriedades possibilitam ao grafeno uma alta mobilidade de carga (KATSNELSON, 2007).

Grafeno é um hidrocarboneto policíclico aromático, com anéis de seis carbonos exclusivamente, que se estendem alternada e infinitamente em um plano bidimensional (NUNES, 2013). Esse nanomaterial é uma das formas alotrópicas do carbono constituída por um sistema bidimensional formado por átomos de carbono sp^2 organizados de forma hexagonal (IVANOVSKII, 2014). A Figura 36, mostra de maneira esquemática a representação bidimensional de uma folha de grafeno.

Figura 36 - Representação esquemática da estrutura cristalográfica do grafeno.

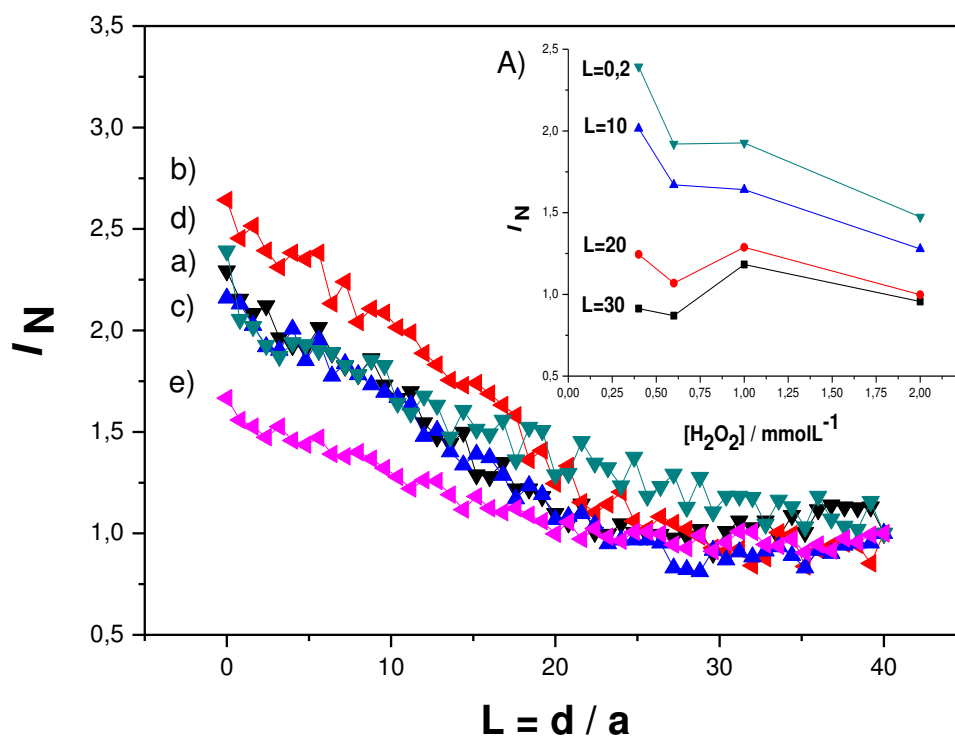


Fonte: KATSNELSON, 2007

Na atualidade o grafeno é considerado um dos mais promissores nanomateriais em estudo no mundo, devido às suas excelentes propriedades. As propriedades do grafeno são únicas e, podem ser aplicados nas mais diferentes formas de tecnologias (DE JESUS, FREIRE, GUIMARÃES, 2012).

Nesse sentido, foram realizadas curvas de aproximação no modo de operação *Feedback* SECM com a enzima com a HRP. Neste modo, foi aplicado um potencial de -200 mV ao microeletrodo de raio 12,5 μm , e feito à aproximação lentamente microeletrodo-substrato com a enzima imobilizada sobre plataforma de grafeno (HRP/Gr). Para isso, fixou-se a concentração de H₂Q em 1,0 mmol.L⁻¹ e variou-se a concentração de H₂O₂ de (0,2 – 2,0 mmol.L⁻¹) para observar o perfil das curvas de aproximação. A Figura 37 mostra os perfis das curvas de aproximação.

Figura 37 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP/Gr imobilizada em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂Q e variando a concentração de H₂O₂ em a) 0,2 mmol.L⁻¹, b) 0,4 mmol.L⁻¹, c) 0,6 mmol.L⁻¹; d) 1,0 mmol.L⁻¹, e) 2,0 mmol.L⁻¹. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.). Velocidade de aproximação de 10 $\mu\text{m}.\text{s}^{-1}$.

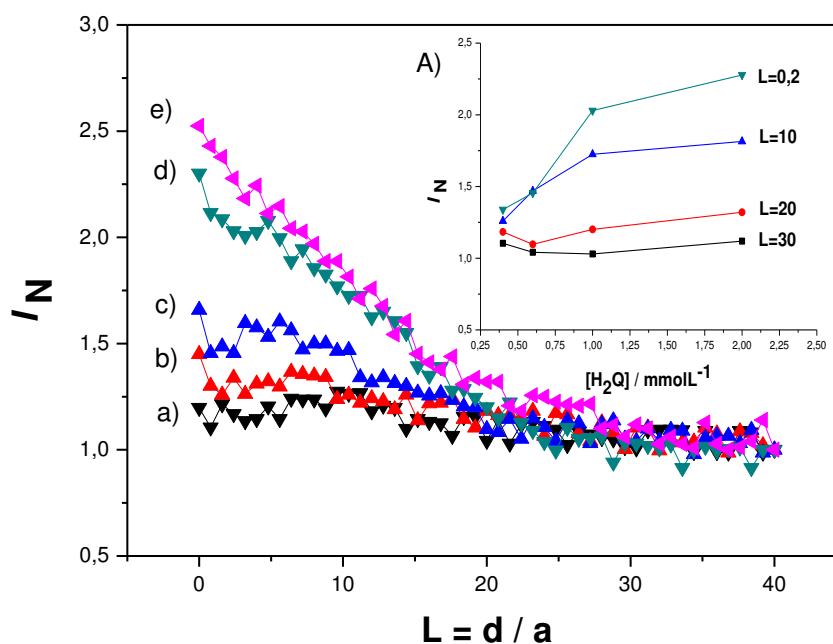


Fonte: Elaborado pelo Autor

Conforme pode ser visto, ocorre um aumento da corrente normalizada em função da distância normalizada (perfis das curvas de (a) para (e)), esse aspecto está bem representado na Figura 37(A). Essa figura foi retirada das curvas de aproximação, plotando as correntes normalizadas em diferentes distâncias normalizadas, ou seja, $L = (30, 20, 10 \text{ e } 0,2)$. Pode-se observar que à medida que a concentração de H_2O_2 é diminuída gradativamente de 0,4 para 2,0 mmol.L^{-1} , ocorre um decréscimo da corrente normalizada. Entretanto, a corrente normalizada aumentou em torno de ($n = 0,8$) (para concentração de 0,4 mmol.L^{-1} de H_2O_2) em comparação com as curvas realizadas sem a presença do grafeno (Figura 34(b) sem grafeno, Figura 37(b) com grafeno). As maiores correntes foram verificadas para valores pequenos da distância normalizada, ou seja, ($L = 0,2$), mostrando que a corrente monitorada é uma função da distância microeletrodo-substrato.

Foi realizado também, um experimento mudando a forma de variar os parâmetros. Nesse sentido, variou-se concentração de H_2Q (0,2 – 2,0 mmol.L^{-1}) mantendo a concentração do H_2O_2 em 1,0 mmol.L^{-1} para avaliar a diferença no perfil das curvas de aproximação. Na Figura 38 são apresentadas as curvas de aproximação para HRP/Gr.

Figura 38 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP/Gr immobilizada em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e variando a concentração de H₂Q em a) 0,2 mmol.L⁻¹, b) 0,4 mmol.L⁻¹, c) 0,6 mmol.L⁻¹; d) 1,0 mmol.L⁻¹, e) 2,0 mmol.L⁻¹. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl(KCl sat.). Velocidade de aproximação de 10 μm.s⁻¹.



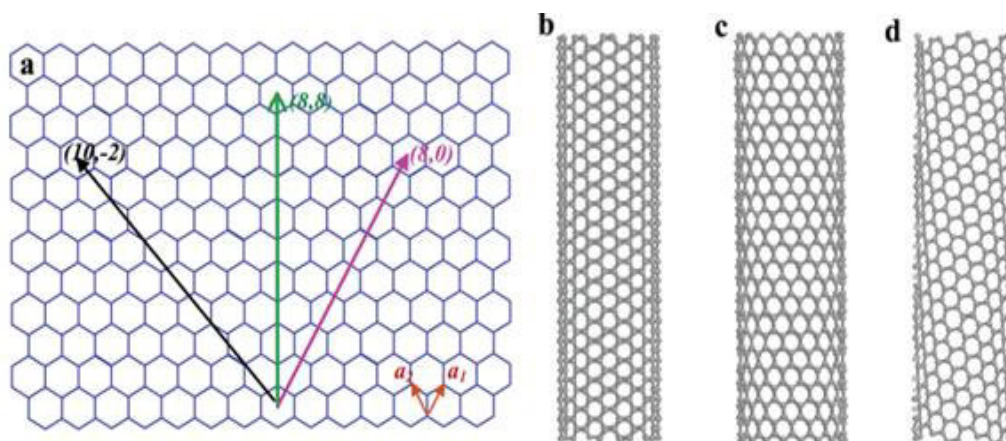
Fonte: Elaborado pelo Autor

Conforme pode ser visualizado, ocorre um aumento da corrente normalizada em função da distância normalizada (perfis das curvas de (a) para (e)), esse aspecto está bem representado na Figura 38(A). A Figura 38(A), foi retirada das curvas de aproximação, plotando as correntes normalizadas em diferentes distâncias normalizadas, ou seja, $L = (30, 20, 10 \text{ e } 0,2)$. Pode-se observar que à medida que a concentração de H₂O₂ é aumentada gradativamente de 0,4 para 2,0 mmol.L⁻¹, ocorre um decrescimento da corrente normalizada. Pode-se verificar ainda que sobre a plataforma de grafeno a corrente normalizada (I_N) aumentou em 0,75 (para concentração de 2,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂), em comparação com as curvas realizadas sem o grafeno (Figura 35(e) sem grafeno, Figura 38(e) com grafeno). As maiores correntes foram verificadas para valores pequenos da distância normalizada, ou seja, ($L = 0,2$), mostrando que a corrente monitorada é uma função da distância microeletrodo-substrato.

4.3.3 Curvas de aproximação SECM sobre substrato isolante para HRP/CNTs

Desde a descoberta dos nanotubos de carbono (CNTs) por Iijima em 1991 (IJIMA, 1991), estes tem atraído grande interesse devido às suas propriedades únicas e excepcionais, incluindo as propriedades elétricas, excelentes força mecânicas e químicas. Sua área de superfície elevada e geometria oca, combinado com a condutividade eletrônico e propriedades mecânicas, sugerem que os nanotubos de carbono têm a capacidade de promover reações de transferência de carga, quando utilizado como um material de eletrodo para reações eletroquímicas. Estas propriedades notáveis de Nanotubos de carbono tornaram-se um atrativo para muitas aplicações, em particular para o fabrico de sensores e biossensores, melhorar a sua sensibilidade e seletividade e, agindo como catalisadores para com o processo de muitas substâncias (DA SILVA, 2013). A Figura 39 mostra a estrutura dos nanotubos de carbono.

Figura 39 - Estrutura helicoidal esquemático de uma folha de grafeno e as diferentes formas de formação dos nanotubos de carbono (CNTs).



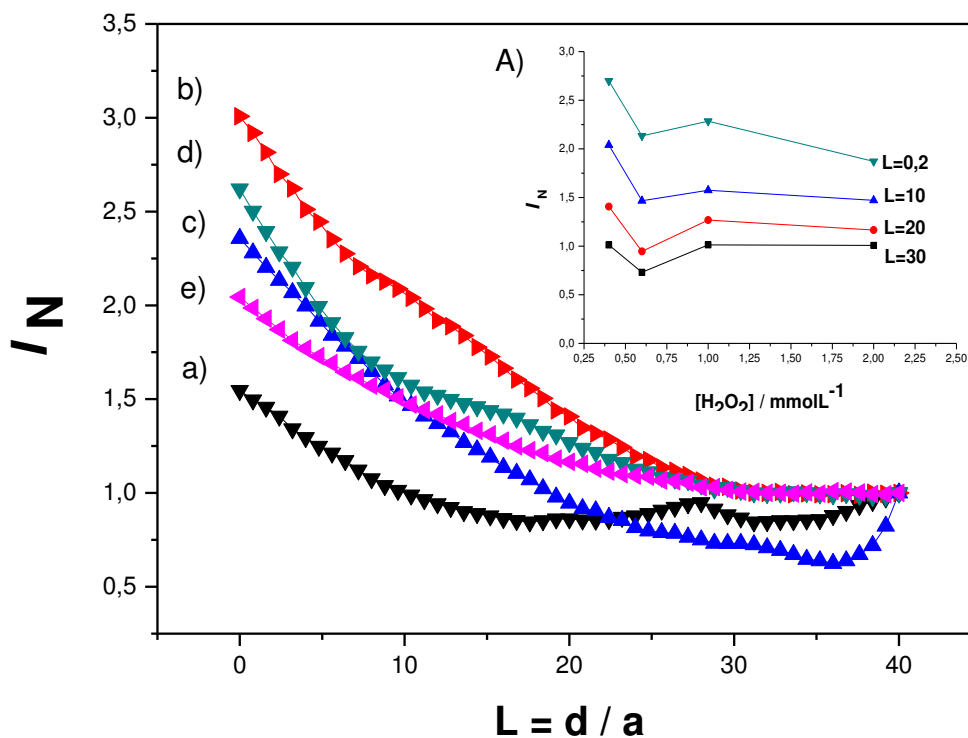
Fonte: DAI, 2002

Nesse sentido, foi realizado um estudo da enzima HRP sobre a plataforma de nanotubos de carbono (CNTs), com o propósito de entender o mecanismo reacional e traçar um paralelo entre a atividade enzimática sobre essas duas plataformas HRP/ CNTs e HRP/Gr.

Passa-se, então, a realizar as curvas de aproximação no modo de operação *Feedback* SECM. Neste modo, foi aplicando um potencial de -200 mV ao

microeletrodo de raio 12,5 μm , e feito à aproximação lentamente microeletrodo-substrato com a enzima imobilizada (HRP/CNTs). Para isso, fixou-se a concentração de H_2Q em 1,0 mmol.L^{-1} e variou-se a concentração de H_2O_2 de (0,2 – 2,0 mmol.L^{-1}) para observar o perfil das curvas de aproximação. Esses perfis são mostrados na Figura 40.

Figura 40 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP/CNTs imobilizada em PBS 0,1 mol.L^{-1} (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L^{-1} de H_2Q e variando a concentração de H_2O_2 em a) 0,2 mmol.L^{-1} , b) 0,4 mmol.L^{-1} , c) 0,6 mmol.L^{-1} ; d) 1,0 mmol.L^{-1} , e) 2,0 mmol.L^{-1} . O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat.})}$. Velocidade de aproximação de 10 $\mu\text{m.s}^{-1}$.



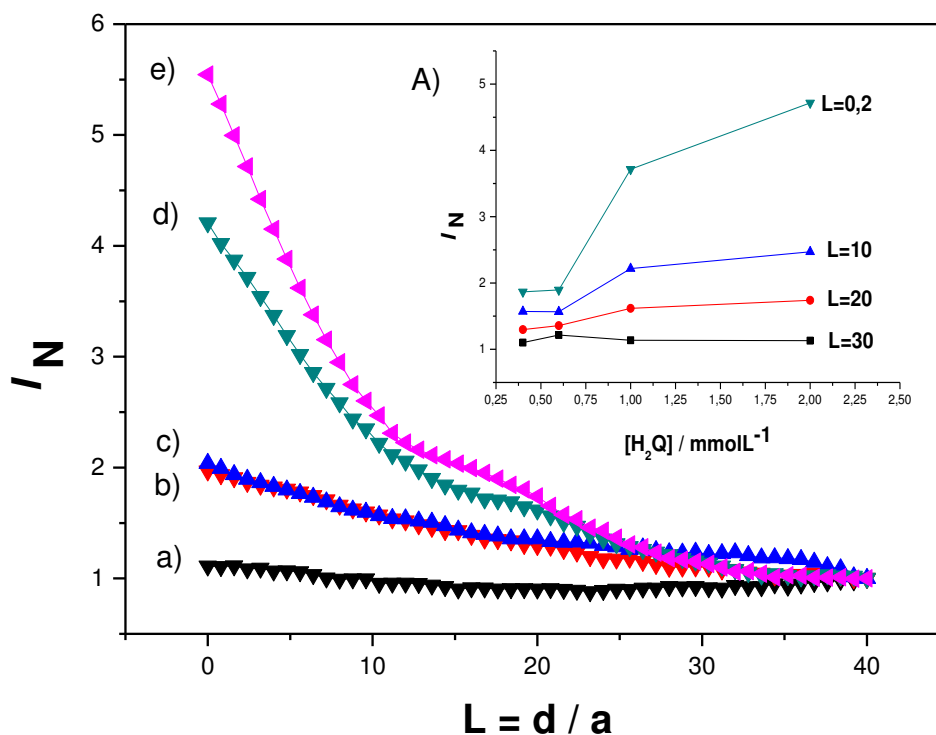
Fonte: Elaborado pelo Autor

Conforme pode ser observado, ocorre um aumento da corrente normalizada em função da distância normalizada (perfis das curvas de (a) para (e)), esse aspecto está bem representado na Figura 40(A). Essa figura foi retirada das curvas de aproximação, plotando as correntes normalizadas em diferentes distâncias normalizadas, ou seja, $L = (30, 20, 10 \text{ e } 0,2)$. Pode-se observar que à medida que a concentração de H_2O_2 é diminuída gradativamente de 0,4 para 2,0 mmol.L^{-1} , ocorre

um decréscimo da corrente normalizada. Entretanto, a corrente normalizada (I_N) aumentou em torno de 1,25 (para concentração de $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ de H_2O_2) em comparação com as curvas realizadas sem o nanotubos de carbono (Figura 34(b) sem CNTs, Figura 40(b) com CNTs). As maiores correntes foram verificadas para valores pequenos da distância normalizada, ou seja, ($L = 0,2$), mostrando que a corrente monitorada é uma função da distância microeletrodo-substrato.

Foi realizado também, um experimento mudando a forma de variar os parâmetros. Nesse sentido, variou-se concentração de H_2Q ($0,2 - 2 \text{ mmol.L}^{-1}$) mantendo a concentração do H_2O_2 em 1 mmol.L^{-1} para avaliar a diferença no perfil das curvas de aproximação. A Figura 41 mostra as curvas de aproximação para HRP/CNTs.

Figura 41 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP/CNTs immobilizada em PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ($\text{pH}=7,0$) na presença de $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de H_2O_2 e variando a concentração de H_2Q em a) $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$, b) $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$, c) $0,6 \text{ mmol.L}^{-1}$; d) $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, e) $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de $-200 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat.})}$. Velocidade de aproximação de $10 \mu\text{m.s}^{-1}$.

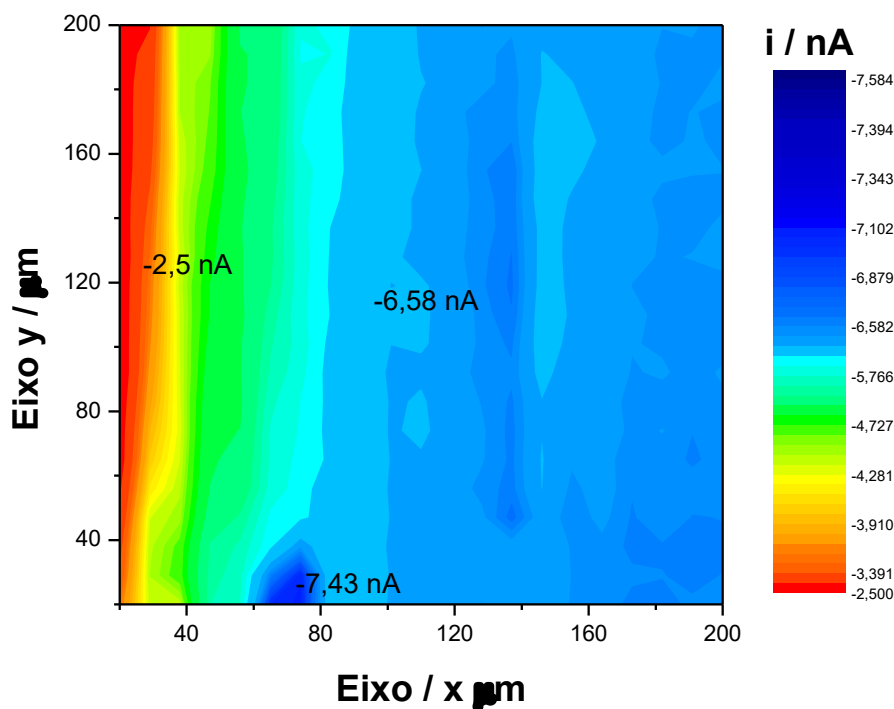


Fonte: Elaborado pelo Autor

Conforme pode ser observado, ocorre um aumento da corrente normalizada em função da distância normalizada (perfis das curvas de (a) para (e)), esse aspecto está bem representado na Figura 41(A). Essa figura, foi retirada das curvas de aproximação, plotando as correntes normalizadas em diferentes distâncias normalizadas, ou seja, $L = (30, 20, 10 \text{ e } 0,2)$. Pode-se observar que à medida que a concentração de H_2Q foi variada de 0,2 para 2 mmol.L^{-1} , ocorre um aumento gradativo da corrente normalizada nas proximidades da enzima. Pode-se verificar ainda, que sobre a plataforma de nanotubos de carbono a corrente normalizada (I_N) aumentou em 3,75 (para concentração de 2 mmol.L^{-1} de H_2O_2), em comparação com as curvas realizadas sem os nanotubos de carbono (Figura 35(e) sem CNTs, Figura 41(e) com CNTs). As maiores correntes foram verificadas para valores pequenos da distância normalizada, ou seja, ($L = 0,2$), mostrando que a corrente monitorada é uma função da distância microeletrodo-substrato.

Ademais, a atividade eletroquímica local da HRP sobre plataforma de nanotubos de carbono (HRP/ CNTs) foi investigada com a aquisição de uma imagem SECM. Para isso, imobilizou-se a HRP/CNTs sobre um substrato isolante e, feito uma curva de aproximação no eixo de coordenada z, obtendo uma distância próxima de 50 μm microeletrodo-substrato, essa distância foi mantida durante todo o experimento. Para fazer a imagem, foi fixada a concentração de H_2Q em 1 mmol.L^{-1} e H_2O_2 em 1 mmol.L^{-1} e aplicado um potencial de -200 mV ao microeletrodo e, em seguida, realizada a movimentação do mesmo nos eixos x e y (200 μm - 200 μm) com a finalidade de monitorar a corrente em diferentes regiões. A Figura 42 mostra a imagem obtida.

Figura 42 - Imagens SECM obtidas em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) com uma concentração de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂Q e 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e microeletrodo polarizado em -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.) com a enzima HRP/ CNTs imobilizada. Velocidade de aquisição da imagem 25 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.



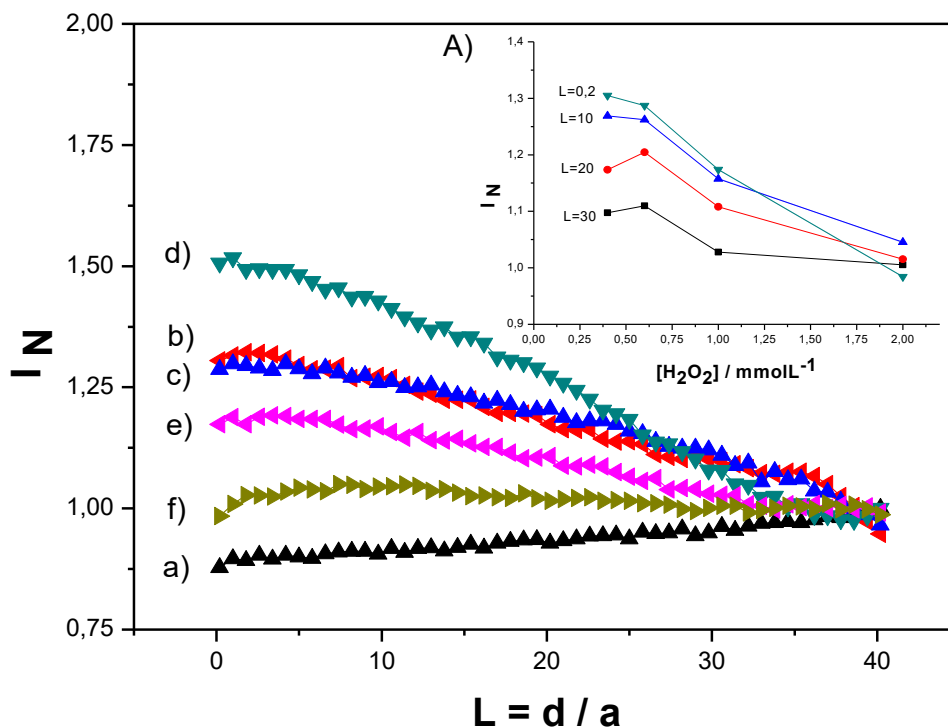
Fonte: Elaborado pelo Autor

A Figura 42 mostra a atividade enzimática da HRP sobre a plataforma de nanotubos de carbono HRP/ CNTs, podendo ser observado a partir da variação na coloração da imagem. Como pode ser observado, foi possível realizar distinções entre regiões com maior concentração de enzima sobre a plataforma de CNTs, pois à medida que o microeletrodo varria regiões com menor concentração de enzima imobilizada a corrente monitorada apresenta baixos valores (-2,5 nA) (regiões de coloração vermelha e amarela) por consequência uma menor atividade enzimática local. Quando o microeletrodo varria regiões com maior concentração de enzima, regiões com coloração (verde, azul celeste, azul), a corrente monitorada se torna gradativamente maior e tendo seu máximo na coloração azul (-7,43 nA), mostrando uma maior atividade enzimática local.

4.3.4 Curvas de aproximação SECM sobre substrato condutor para HRP/ CNTs

A atividade catalítica da HRP/ CNTs foi investigada sobre superfície condutora (eletrodo de ouro), com o objetivo de entender os processos reacionais da enzima sobre esse substrato, e fazer possíveis correlações com a HRP/CNTs imobilizada sobre substrato isolante. No modo *SG/TC* SECM, foram realizadas curvas de aproximação aplicando um potencial de -200 mV ao microeletrodo e raio 12,5 μm . Para isso, fixou-se a concentração de H_2Q em 1,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e variou-se a concentração de H_2O_2 de (0,2 - 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) para observar o perfil das curvas de aproximação. Os perfis dessas curvas são mostrados na Figura 43.

Figura 43 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície condutora com HRP/CNTs imobilizada em PBS 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH=7,0) na presença de 1,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de H_2Q e variando a concentração de H_2O_2 em a) 0,2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, b) 0,4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, c) 0,6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, d) 0,8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, e) 1,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e f) 2,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl (KCl sat.). Velocidade de aproximação de 10 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

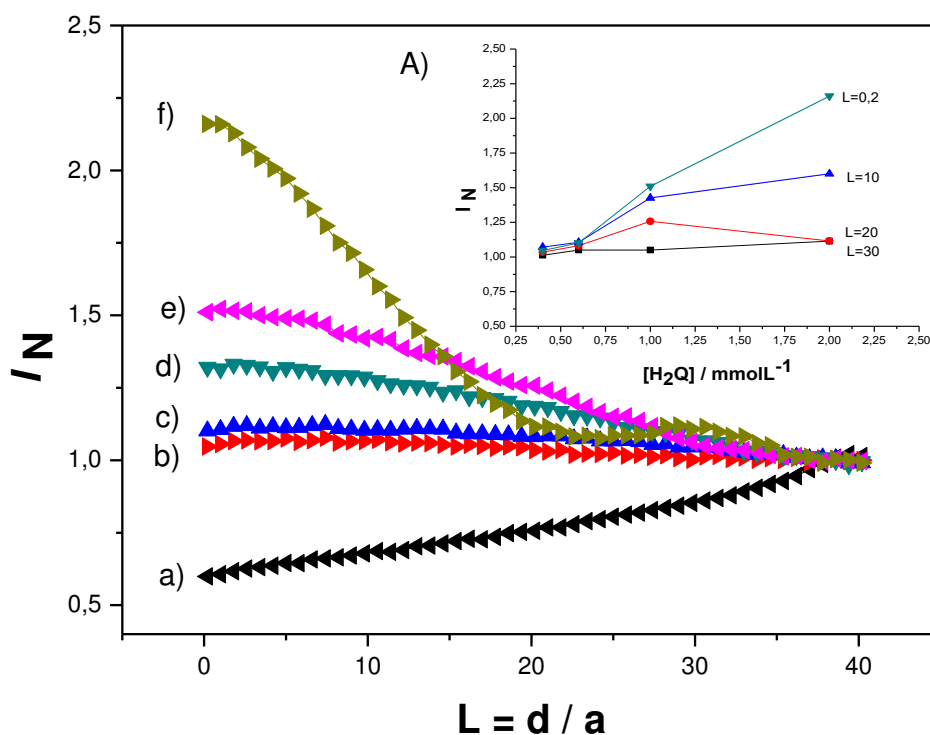


Fonte: Elaborado pelo Autor

Conforme pode ser observado, ocorre um aumento da corrente normalizada em função da distância normalizada (perfis das curvas de (a) para (e)), esse aspecto está bem representado na Figura 43(A). A Figura 43, foi retirada das curvas de aproximação, plotando as correntes normalizadas em diferentes distâncias normalizadas, ou seja, $L = (30, 20, 10 \text{ e } 0,2)$. Nessa Figura, pode-se observar que à medida que a concentração de H_2O_2 é aumentada gradativamente de 0,4 para 2,0 mmol.L^{-1} , ocorre um decréscimo da corrente normalizada, tendo seu máximo ($I_N = 1,5$) para a concentração de 0,8 mmol.L^{-1} de H_2O_2 , Figura 34(b). As maiores correntes foram observadas para valores pequenos da distância normalizada, ou seja, ($L = 0,2$), mostrando que a corrente monitorada é uma função da distância microeletrodo-substrato.

Similarmente, foi realizado outro experimento mudando a forma de variar os parâmetros. Para isso, variou-se concentração de H_2Q (0,2 - 2 mmol.L^{-1}) mantendo a concentração do H_2O_2 em 1 mmol.L^{-1} para observar a diferença no perfil das curvas de aproximação. Na Figura 44 são apresentadas as curvas de aproximação com HRP/ CNTs imobilizados sobre superfície condutora.

Figura 44 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície condutora com HRP/CNTs imobilizada em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e variando a concentração de H₂Q em a) 0,2 mmol.L⁻¹, b) 0,4 mmol.L⁻¹, c) 0,6 mmol.L⁻¹, d) 0,8 mmol.L⁻¹, e) 1,0 mmol.L⁻¹ e f) 2,0 mmol.L⁻¹. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl (KCl sat.). Velocidade de aproximação de 10 μm.s⁻¹.

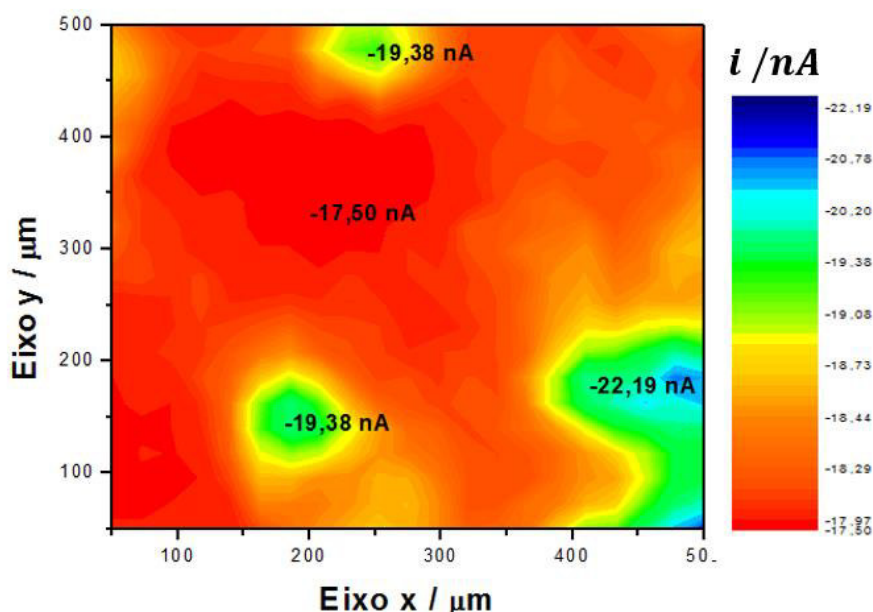


Fonte: Elaborado pelo Autor

Conforme pode ser visto, ocorre um aumento da corrente normalizada em função da distância normalizada (perfis das curvas de (a) para (e)), esse aspecto está bem representado na Figura 44(A). A Figura 44, foi retirada das curvas de aproximação, plotando as correntes normalizadas em diferentes distâncias normalizadas, ou seja, $L = (30, 20, 10 \text{ e } 0,2)$. Nessa Figura, pode-se observar que à medida que a concentração de H₂O₂ é aumentada gradativamente de 0,4 para 2,0 mmol.L⁻¹, ocorre um aumento da corrente normalizada, tendo seu máximo ($I/N = 2,25$) para a concentração de 2,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂, Figura 34(b). As maiores correntes foram observadas para valores pequenos da distância normalizada, ou seja, ($L = 0,2$), mostrando que a corrente monitorada é uma função da distância microeletrodo-substrato.

A atividade eletroquímica local da (HRP/ CNTs) foi investigada sobre substrato condutor com a aquisição de uma imagem SECM. Para isso, a HRP/CNTs foi imobilizada sobre um eletrodo de ouro (substrato condutor) e, em seguida realizada uma curva de aproximação no eixo de coordenada z, obtendo uma distância próxima de 75 μm microeletrodo-substrato que foi mantida durante todo o experimento. A imagem foi realizada em solução de ferricianeto de potássio 5 mmol.L^{-1} em KCl 0,1 mol.L^{-1} e o microeletrodo foi polarizado em -200 mV, em seguida, realizada a movimentação do mesmo nos eixos x e y (500 μm - 500 μm) com a finalidade de monitorar a corrente de redução em diferentes regiões. A Figura 45 mostra a imagem obtida.

Figura 45 - Imagens SECM obtidas em ferricianeto de potássio 5 mmol.L^{-1} em KCl 0,1 mol.L^{-1} e microeletrodo polarizado em -200 mV vs. Ag/AgCl (KCl sat.) com a enzima HRP/CNTs imobilizada sobre eletrodo de ouro. Velocidade de aquisição da imagem 75 $\mu\text{m.s}^{-1}$ em uma região de (500 μm - 500 μm) nos eixos x e y, respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo Autor

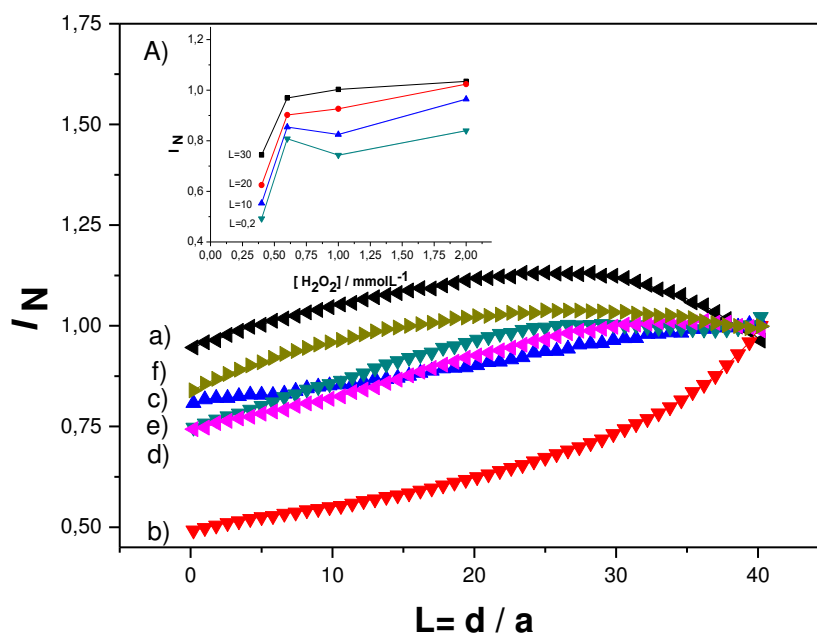
A atividade enzimática da HRP/ CNTs sobre substrato condutor foi investigada, podendo ser observada a partir da variação na coloração da imagem. Como pode ser observado, foi possível realizar distinções entre regiões com maior concentração de enzima sobre a plataforma de CNTs, pois à medida que o microeletrodo varria regiões com maior concentração de enzima, regiões com coloração (verde, azul celeste, azul), a corrente monitorada se torna gradativamente maior, tendo seu

máximo na região em azul (-22,19 nA) mostrando assim, uma maior atividade enzimática local.

4.3.5 Estudos de Microscopia Eletroquímica de Varredura da HRP/ CNTs sobre substrato isolante e condutor usando o catecol como mediador redox

A atividade catalítica da HRP/ CNTs foi investigada sobre superfície isolante (placa de vidro) e condutora (eletrodo de ouro), com o objetivo de entender os processos reacionais da enzima sobre esses substratos, utilizando o catecol (CC) como mediador redox. No modo *SG/TC*, foram realizadas curvas de aproximação aplicando um potencial de -200 mV ao microeletrodo de raio 12,5 μm . Para isso, fixou-se a concentração de CC em 1,0 mmol.L^{-1} e variou-se a concentração de H_2O_2 de (0,2 – 2,0 mmol.L^{-1}) para observar o perfil das curvas de aproximação sobre superfície isolante. Os perfis dessas curvas são mostrados na Figura 46.

Figura 46 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP/CNTs imobilizada em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de CC e variando a concentração de H₂O₂ em a) 0,2 mmol.L⁻¹, b) 0,4 mmol.L⁻¹, c) 0,6 mmol.L⁻¹, d) 0,8 mmol.L⁻¹, e) 1,0 mmol.L⁻¹ e f) 2,0 mmol.L⁻¹. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.). Velocidade de aproximação de 10 μm.s⁻¹.

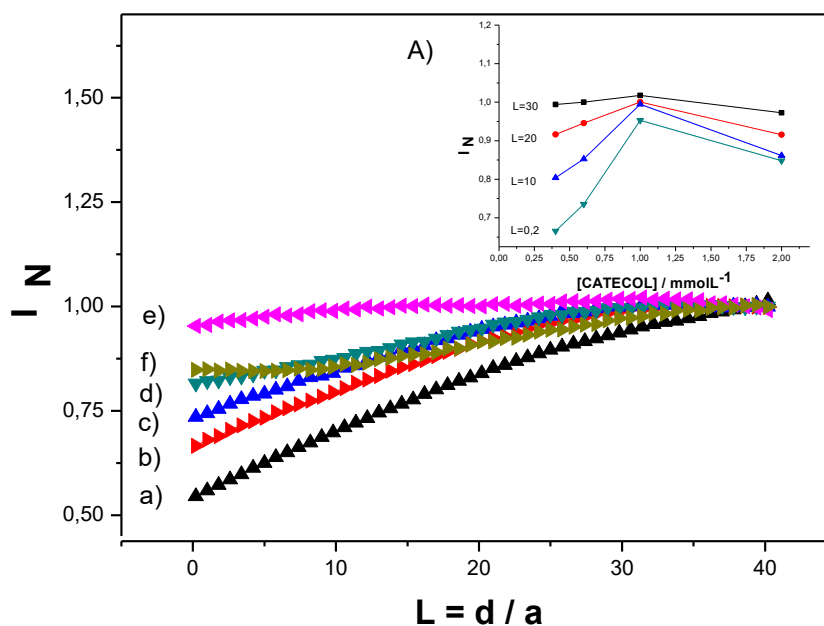


Fonte: Elaborado pelo Autor

Conforme pode ser observado, ocorre uma diminuição da corrente normalizada em função da distância normalizada (perfis das curvas de (a) para (e)), esse aspecto está bem representado na Figura 46(A). A Figura 46, foi retirada das curvas de aproximação, plotando as correntes normalizadas em diferentes distâncias normalizadas, ou seja, $L = (30, 20, 10 \text{ e } 0,2)$. Nessa Figura, pode-se observar que à medida que a concentração de H_2O_2 é aumentada gradativamente de 0,4 para 2,0 mmol.L⁻¹, ocorre um decrescimento da corrente normalizada, tendo seu máximo ($I_N = 1,0$) para a concentração de 0,2 mmol.L⁻¹ de H_2O_2 , Figura 46(f). As maiores correntes foram observadas para grandes valores da distância normalizada, ou seja, ($L = 30$).

Com o propósito de observar o efeito da concentração de CC no perfil das curvas de aproximação variou-se a concentração de CC (0,2 – 2,0 mmol.L⁻¹) mantendo a concentração do H_2O_2 em 1,0 mmol.L⁻¹. Na Figura 47 são apresentadas as curvas de aproximação obtidas com HRP/CNTs.

Figura 47 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP/CNTs immobilizada em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e variando a concentração de CC em a) 0,2 mmol.L⁻¹, b) 0,4 mmol.L⁻¹, c) 0,6 mmol.L⁻¹, d) 0,8 mmol.L⁻¹, e) 1,0 mmol.L⁻¹ e f) 2,0 mmol.L⁻¹. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.). Velocidade de aproximação de 10 μm.s⁻¹.



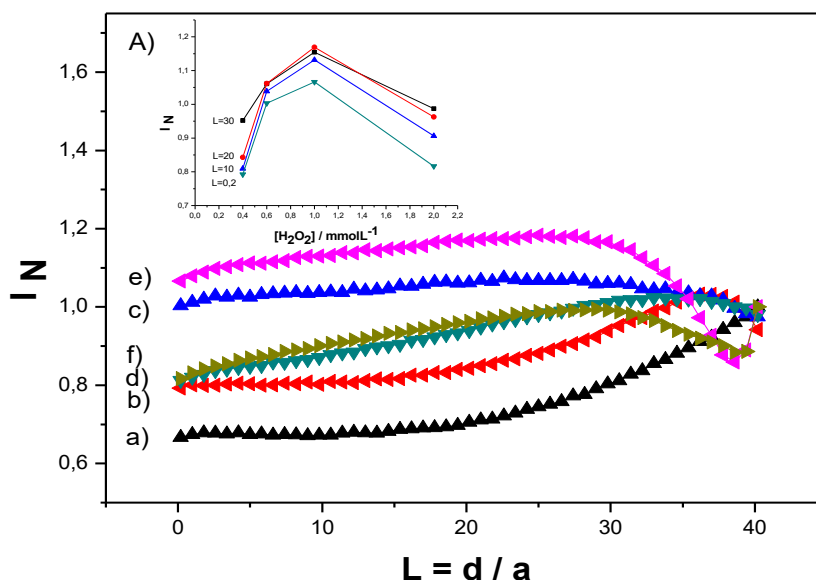
Fonte: Elaborado pelo Autor

Conforme pode ser observado, ocorre uma diminuição da corrente normalizada em função da distância normalizada (perfis das curvas de (a) para (e)), esse aspecto está bem representado na Figura 47(A). A Figura 47, foi retirada das curvas de aproximação, plotando as correntes normalizadas em diferentes distâncias normalizadas, ou seja, $L = (30, 20, 10 \text{ e } 0,2)$. Nessa Figura, pode-se observar que à medida que a concentração de catecol é aumentada gradativamente de 0,4 para 2,0 mmol.L⁻¹, ocorre um decrescimento da corrente normalizada, tendo seu máximo ($i_N = 1,0$) para a concentração de 1,0 mmol.L⁻¹ de catecol, Figura 47(b). As maiores correntes foram observadas para grandes valores da distância normalizada, ou seja, ($L = 30$).

A atividade catalítica da HRP/CNTs foi investigada sobre superfície condutora (eletrodo de ouro), com o objetivo de entender os processos reacionais da enzima sobre esse substrato usando o catecol como mediador redox, para fazer possíveis correlações com a HRP/CNTs immobilizada sobre substrato isolante. No modo de

SG/TC SECM, foram realizadas curvas de aproximação aplicando um potencial de -200 mV ao microeletrodo e raio 12,5 μm . Para isso, fixou-se a concentração de CC em 1 mmol.L^{-1} e variou-se a concentração de H_2O_2 de (0,2 - 2 mmol.L^{-1}) para observar o perfil das curvas de aproximação. Os perfis dessas curvas são mostrados na Figura 48.

Figura 48 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície condutora com HRP/CNTs imobilizada em PBS 0,1 mol.L^{-1} (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L^{-1} de CC e variando a concentração de H_2O_2 em a) 0,2 mmol.L^{-1} , b) 0,4 mmol.L^{-1} , c) 0,6 mmol.L^{-1} , d) 0,8 mmol.L^{-1} , e) 1,0 mmol.L^{-1} e f) 2,0 mmol.L^{-1} . O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat.). Velocidade de aproximação de 10 $\mu\text{m.s}^{-1}$.



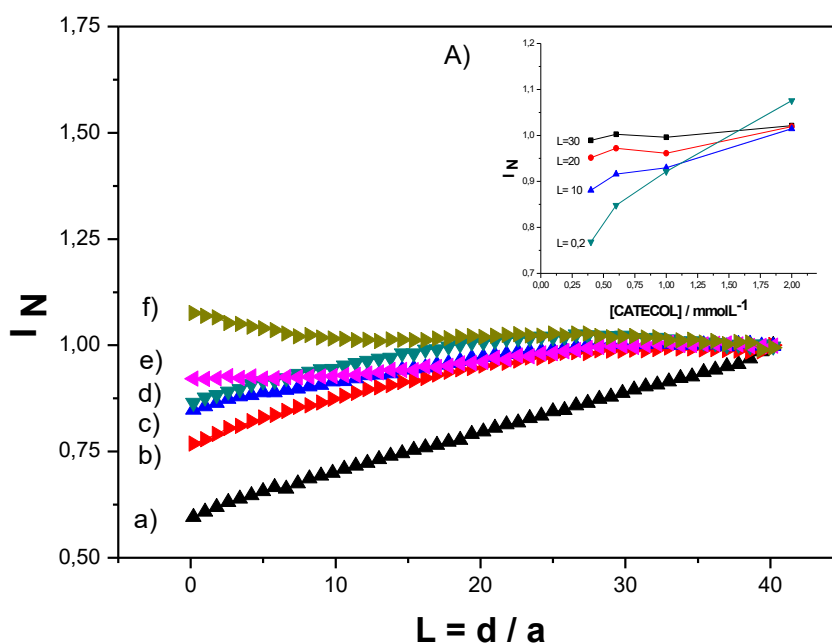
Fonte: Elaborado pelo Autor

Conforme pode ser visto, ocorre uma diminuição da corrente normalizada em função da distância normalizada (perfis das curvas de (a) para (e)), esse aspecto está bem representado na Figura 48(A). A Figura 48, foi retirada das curvas de aproximação, plotando as correntes normalizadas em diferentes distâncias normalizadas, ou seja, $L = (30, 20, 10$ e $0,2)$. Nessa Figura, pode-se observar que à medida que a concentração de catecol é aumentada gradativamente de 0,4 para 2,0 mmol.L^{-1} , ocorre um decréscimo da corrente normalizada, tendo seu máximo ($I_N = 1,0$) para a concentração de 0,4 mmol.L^{-1} de catecol, Figura 48(b). As maiores

correntes foram observadas para grandes valores da distância normalizada, ou seja, ($L = 20$).

De forma similar, foi realizado um experimento mudando a forma de variar os parâmetros. Para isso, variou-se concentração de CC ($0,2 - 2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$) mantendo a concentração do H_2O_2 em 1 mmol.L^{-1} para observar a diferença no perfil das curvas de aproximação. Na Figura 49 são apresentadas as curvas de aproximação com HRP/CNTs imobilizados sobre superfície condutora.

Figura 49 - Curvas de aproximação SECM de corrente normalizada vs. distância normalizada em superfície isolante com HRP/CNTs imobilizada em PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ($\text{pH}=7,0$) na presença de $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de H_2O_2 e variando a concentração de CC em a) $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$, b) $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$, c) $0,6 \text{ mmol.L}^{-1}$, d) $0,8 \text{ mmol.L}^{-1}$, e) $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ e f) $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$. O potencial aplicado ao microeletrodo foi de $-200 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat.})}$. Velocidade de aproximação de $10 \mu\text{m.s}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pelo Autor

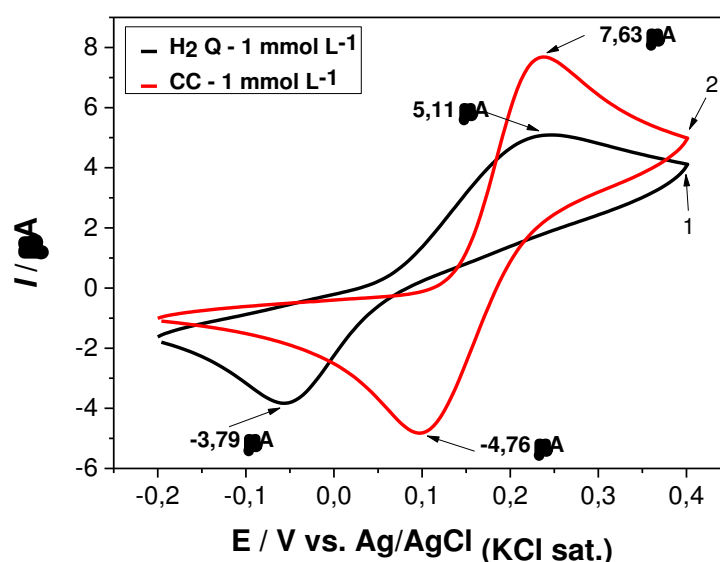
Conforme pode ser visto, ocorre uma diminuição da corrente normalizada em função da distância normalizada (perfis das curvas de (a) para (e)), esse aspecto está bem representado na Figura 49(A). A Figura 49, foi retirada das curvas de aproximação, plotando as correntes normalizadas em diferentes distâncias normalizadas, ou seja, $L = (30, 20, 10 \text{ e } 0,2)$. Nessa Figura, pode-se observar que à medida que a

concentração de catecol é aumentada gradativamente de 0,4 para 2,0 mmol.L⁻¹, ocorre um decréscimo da corrente normalizada, tendo seu máximo ($n = 1,15$) para a concentração de 2,0 mmol.L⁻¹ de catecol, Figura 49(f). As maiores correntes foram observadas para grandes valores da distância normalizada, ou seja, ($L = 20$).

4.3.6 Estudos Voltamétricos e Cronoamperométricos em compostos isoméricos

Com o objetivo de avaliar o processo de oxidação e redução de dois compostos isômeros (hidroquinona, catecol), voltamogramas cíclicos foram obtidos na presença de 1 mmol.L⁻¹ de hidroquinona (H₂Q) e 1 mmol.L⁻¹ de catecol (CC) para o eletrodo de ouro (Figura 50). Os voltamogramas foram obtidos no intervalo de potencial de -200 a 400 mV vs. Ag/AgCl em solução 0,1 mol.L⁻¹ de tampão fosfato (pH = 7,0).

Figura 50 - Voltamogramas cíclicos referentes ao eletrodo de ouro, (curva 1) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ H₂Q e (curva 2) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ CC. Os voltamogramas foram obtidos no intervalo de potencial de -200 a 400 mV vs. Ag/AgCl em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH = 7,0). Velocidade de varredura 100 mV.s⁻¹.



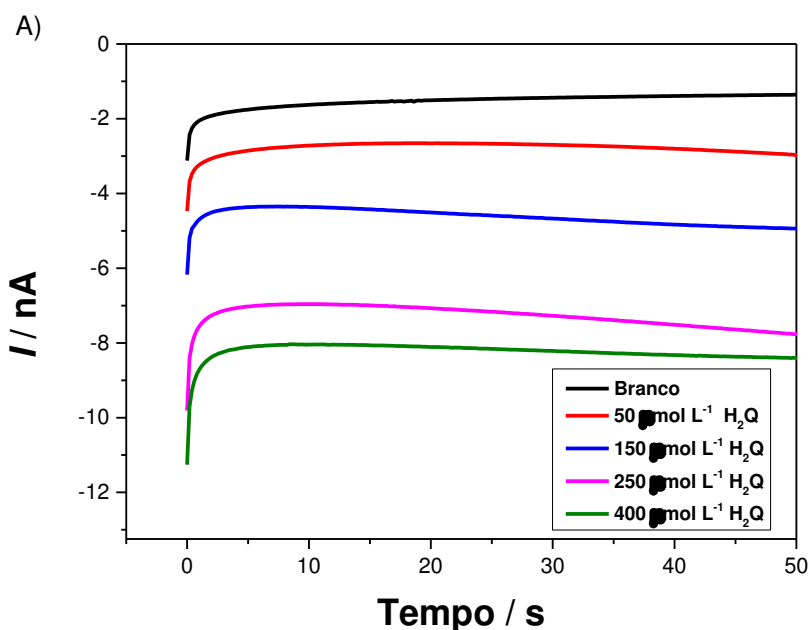
Fonte: Elaborado pelo Autor

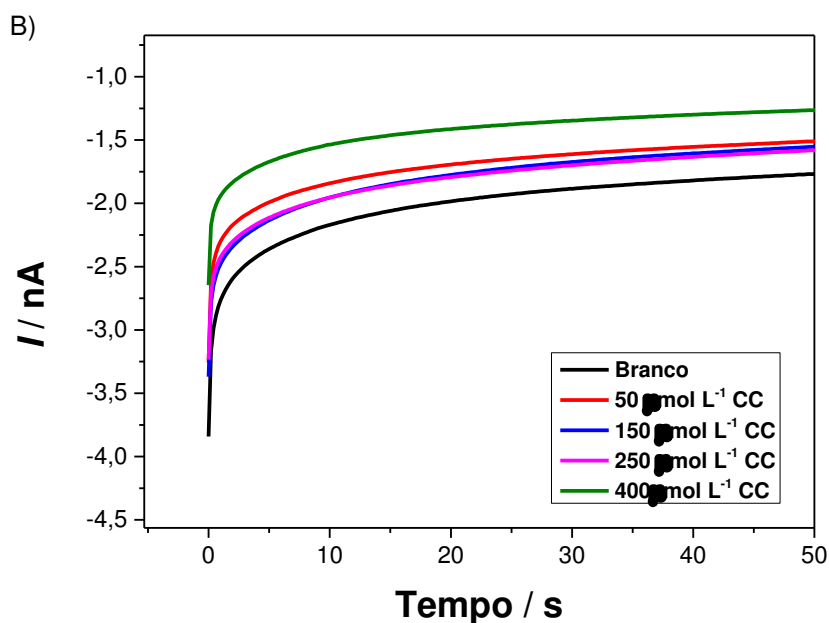
Na Figura 50, curva (1), pode-se destacar que a corrente de pico anódica referente a oxidação da hidroquinona ocorre no potencial próximo a 250 mV. Um

pico de corrente catódica foi observado em -50 mV, referente a redução eletroquímica da benzoquinona. A curva (2), mostra a oxidação do catecol no potencial próximo a 250 mV, enquanto que, sua redução ocorre no potencial de 100 mV.

Experimentos cronoamperométricos foram realizados com os compostos isômeros H₂Q e CC, com o objetivo de construir uma curva analítica obtida para diferentes concentrações de cada analito. Nesse sentido, a HRP/CNTs foi imobilizada sobre um eletrodo de ouro (substrato condutor) e, em seguida realizada uma curva de aproximação (microeletrodo-substrato) no eixo de coordenada z, obtendo uma distância próxima de 50 μm que foi mantida durante todo o experimento. Em seguida, o microeletrodo foi polarizado em -200 mV, com a finalidade de monitorar a corrente de redução para diferentes concentrações dos analitos. A Figura 51 mostra as curvas cronoamperométrica obtida.

Figura 51 - Curvas cronoamperométrica com HRP/CNTs imobilizada sobre superfície condutora em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e variando a concentração de H₂Q, A) em Branco (preta), 0,05 mmol.L⁻¹ (vermelha), 0,15 mmol.L⁻¹ (azul), d) 0,25 mmol.L⁻¹ (rosa), e) 0,40 mmol.L⁻¹ (verde). B) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e variando a concentração de CC, Branco (preta), 0,05 mmol.L⁻¹ (vermelha), 0,15 mmol.L⁻¹ (azul), d) 0,25 mmol.L⁻¹ (rosa), e) 0,40 mmol.L⁻¹ (verde). O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl (KCl sat.).



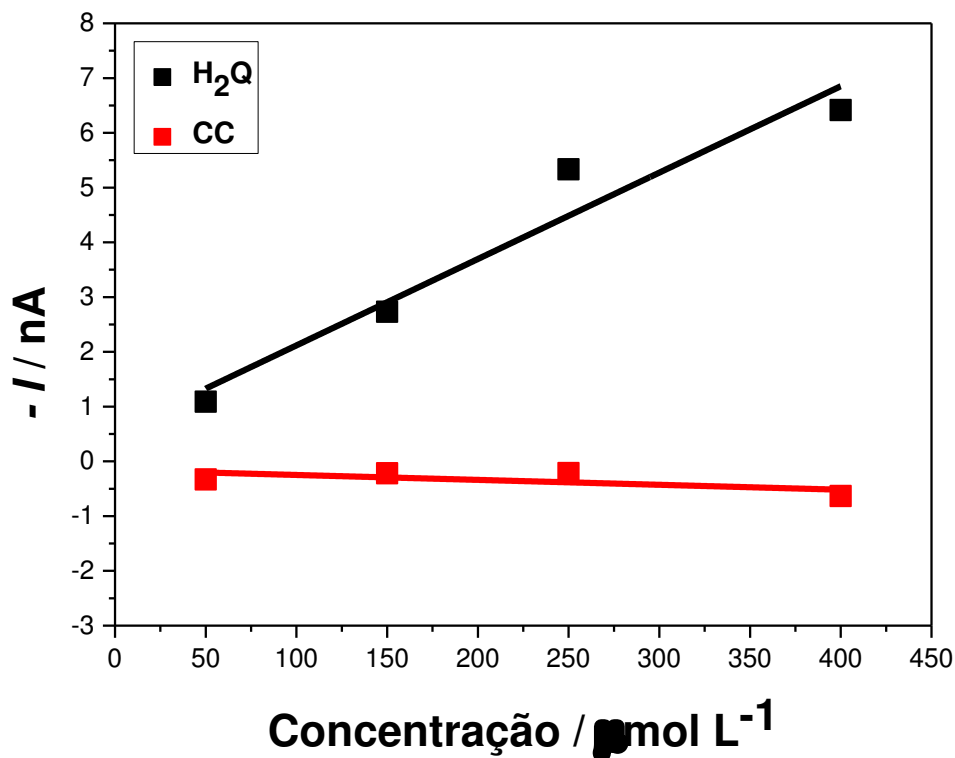


Fonte: Elaborado pelo Autor

A Figura 51(A) mostra os cronoamperogramas para diferentes concentrações de H₂Q (50 - 400 μmol.L⁻¹). Como pode ser observado, à medida que a concentração desse analito é aumentada a corrente de redução aumenta proporcionalmente, mostrando a eficiência do processo catalítico. Por outro lado, para diferentes concentrações de CC a corrente de redução diminui como pode visto na Figura 51(B), mostrando assim, a especificidade da HRP por H₂Q.

Nesse sentido, foram construídas curvas analíticas de corrente de redução vs. concentração de H₂Q e CC, respectivamente. A Figura 52 mostra uma correlação linear desses parâmetros para esses analitos.

Figura 52 - Relação entre a corrente de redução versus a concentração de H₂Q e CC em PBS 0,1 mol.L⁻¹ (pH=7,0) na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e variando a concentração de H₂Q (50 – 400 μmol.L⁻¹) (Preta). Na presença de 1,0 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ e variando a concentração de CC, (50 – 400 μmol.L⁻¹) (Vermelha). O potencial aplicado ao microeletrodo foi de -200 mV vs. Ag/AgCl (KCl sat.).



Fonte: Elaborado pelo Autor

Seguindo as recomendações da IUPAC, os LD e LQ foram determinados utilizando-se $3,3*s/b$ e $10*s/b$, respectivamente, onde s é o desvio padrão para cinco curvas cronoamperométrica do branco e b , o coeficiente de regressão angular da curva analítica (CURRIE, 1995). Para a redução da BQ obteve-se um LD de 38,45 μmol.L⁻¹ e um LQ de 116,52 μmol.L⁻¹ e um coeficiente de correlação de 0,971. A faixa linear de trabalho observada foi de 50 até 400 μmol.L⁻¹.

5 CONCLUSÕES

O Presente trabalho demonstrou que a Microscopia Eletroquímica de Varredura é uma excelente técnica para estudar a reatividade das enzimas GOx e HRP sobre diferentes plataformas.

Estudos através de curvas de aproximação e imagens SECM foram realizados com a enzima GOx sobre superfície isolante e condutora, demonstrando que a mesma, é muito eficiente no que concerne a oxidação da glicose ou formação do peróxido de hidrogênio.

Estudos através de curvas de aproximação e imagens SECM foram realizados com a enzima HRP sobre superfície isolante e condutora, demonstrando que a mesma, é muito eficiente no que concerne a redução do peróxido de hidrogênio ou oxidação de hidroquinona.

Estudos através de curvas de aproximação e imagens SECM foram realizados com a enzima HRP sobre plataforma de grafeno, demonstrando que a mesma, é muito eficiente no que concerne a redução do peróxido de hidrogênio ou oxidação de hidroquinona se comparado com a enzima imobilizada sobre plataforma isolante.

Estudos através de curvas de aproximação e imagens SECM demonstraram que a enzima HRP imobilizada sobre plataforma de nanotubos de carbono, reduz o peróxido de hidrogênio ou oxida a hidroquinona de forma mais eficiente se comparado com a enzima sobre plataforma isolante e sobre plataforma de grafeno.

Estudos através de curvas de cronoamperométrica demonstraram que a enzima HRP imobilizada sobre plataforma de nanotubos de carbono HRP/CNTs é seletiva para compostos isoméricos.

REFERÊNCIAS

ABERCROMBIE, S. C. B.; DENUAULT, G. Steady state simulation of electrode processes with a new error bounded adaptive finite element algorithm. **Electrochemistry Communications**, v. 5, n. 8, p. 647-656, 2003.

ALPUCHE-AVILES, M. A.; BAUR, J. E.; WIPF, D. O. Imaging of Metal Ion Dissolution and Electrodeposition by Anodic Stripping Voltammetry – Scanning Electrochemical Microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 10, p. 3612 - 3621, 2008.

AMATORE, C. A.; DEAKIN, M., R.; WIGHTMAN, M. Electrochemical kinetics at microelectrodes Part 1. Quasi-reversible electron transfer at cylinders. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 206, n. 1-2, p. 23-36, 1986.

AMEMIYA, S., et al. Studies of charge transfer at liquid/liquid interfaces and bilayer lipid membranes by scanning electrochemical microscopy. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v. 483, p. 7–17. 2000.

AMINE, A. et al. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 1405–1423, 2006.

AMPHLETT, J. L.; DENUAULT, G. Scanning electrochemical microscopy (SECM): An investigation of the effects of tip geometry on amperometric tip response. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 49, p. 9946-9951, 1998.

APARNA, R. et al. An effective route to produce few-layer graphene using combinatorial ball milling and strong aqueous exfoliants. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 5, n. 3, p. 033123–33123, 2013.

ASSUMPÇÃO, M. H. M. T. et al. A comparative study of the electrogeneration of hydrogen peroxide using Vulcan and Printex carbon supports. **Carbon**, v. 49, n. 8, p. 2842–2851, 2011.

BALTES, N.; HEINZE, J. Imaging Local Proton Fluxes through a Polycarbonate Membrane by Using Scanning Electrochemical Microscopy and Functionalized Alkanethiols. **Chemphyschem**, v. 10, n. 1, p. 174 - 179, 2009.

BARD, A. J. et al. Scanning electrochemical microscopy. 12. Theory and experiment of the feedback mode with finite heterogeneous electron-transfer kinetics and arbitrary substrate size. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 96, n. 4, p. 1861-1868, 1992.

BARD, A. J. et al. Scanning Electrochemical Microscopy: introduction and Principles. **Analytical Chemistry**, v. 61, n. 24, p. 132-138, 1989.

BARD, A. J.; MIRKIN, M. V. **Scanning Electrochemical Microscopy**. Second Edition. [s.1] Taylor e Francis, 2012.

BARD, A., J.; MIRKIN, M., V. **Scanning Electrochemical Microscopy**. Marcel Dekker, New York, 2001.

BARD, ALLEN J., FAULKNER LARRY R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. v.1, 1^a ed. New York, 1980.

BARKER A. L., et al. Scanning Electrochemical Microscopy: beyond the solid/liquid interface. **Analytica Chimica Acta**, v. 385, p. 223–40, 1999.

BERTONCELLO, P. et al. Measurement of apparent diffusion coefficients within ultrathin Nafion Langmuir-Schaefer films: Comparison of a novel scanning electrochemical microscopy approach with cyclic voltammetry. **Langmuir**, v. 22, n. 25, p. 10380-10388, 2006.

BINNIG, C. F., QUATE, C. GERBER. Atomic Force Microscope. **Physical Review Letters**. v. 56, p. 930–933, 1986.

BINNIG, G. et al. Surface studies by scanning tunneling microscopy. **Physical Review Letters**, v. 49, n. 1, p. 57, 1982.

BOCKRIS, J. O. M.; REDDY, A. K. N.; GAMBOA-ALDECO, M. E. **Modern Electrochemistry 2A: Fundamentals of Electroics**, v. 2A. Springer, 2000.

BOND, A., M.; OLDHAM, K., B.; ZOSKI, C., G. Theory of electrochemical processes at an inlaid disc microelectrode under steady-state conditions. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 245, n. 1, p. 71-104, 1988.

BOTTOMLEY, L. A. et al. Scannig Probe Microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 12, p. 185 – 230, 1998.

BRETT, A. M.; BRETT, C. M. **Electrochemistry: principles, methods, and applications**. v 1. 1^a ed. New York, 1993.

BURCHARDT, M.; WITTSTOCK, G. Kinetic studies of glucose oxidase in polyelectrolyte multilayer films by means of scanning electrochemical microscopy (SECM). **Bioelectrochemistry**, v. 72, n. 1, p. 66-76, 2008.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Pure and Applied Chemistry**, 67, pp. 1699-1723, 1995.

CHANCE, B. The kinetics and stoichiometry of the transition from the primary to the secondary peroxidase peroxide complexes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 41, n. 2, p. 416-424, 1952.

CHEN, C. et al. Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review. **Rsc Advances**, v. 3, n. 14, p. 4473-4491, 2013.

CHING, S.; DUDEK, R.; TABET, E. Cyclic voltammetry with ultramicroelectrodes. **Journal of Chemical Education**, v. 71, n. 7, p. 602, 1994.

COMPTON, R. G.; BANKS, C. E. **Understanding voltammetry**. Singapore: World Scientific, 2007.

CORNUT, R.; HAPIOT, P.; LEFROU, C. Enzyme-mediator kinetics studies with SECM: Numerical results and procedures to determine kinetics constants. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 633, n. 1, p. 221-227, 2009.

CORNUT, R.; LEFROU, C. A unified new analytical approximation for negative feedback currents with a microdisk SECM tip. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 608, n. 1, p. 59-66, 2007.

CORREIA, A. N. et al. Ultramicroeletrodos. Parte 1. Revisão Teórica e Perspectivas. **Química Nova**, v. 18, n. 5, p. 475-480, 1995.

COX, M. M.; LEHNINGER, N. D. **Princípios de bioquímica**. São Paulo, 2006.

CRANK, J. **The mathematics of diffusion**. Oxford university press, 1979.

CRANK, J.; FURZELAND, R. M. The treatment of boundary singularities in axially symmetric problems containing discs. **IMA Journal of Applied Mathematics**, v. 20, n. 3, p. 355-370, 1977.

DA SILVA, J. V. et al. Application of horseradish peroxidase/polyaniline/bis (2-aminoethyl) polyethylene glycol-functionalized carbon nanotube composite as a platform for hydrogen peroxide detection with high sensitivity at low potential. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 17, n. 11, p. 2795-2804, 2013.

DAI, H. Carbon nanotubes: synthesis, integration, and properties. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 12, p. 1035-1044, 2002.

DAMOS, F. S. et al. Iron (III) tetra-(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin as a biomimetic catalyst of horseradish peroxidase on the electrode surface: An amperometric sensor for phenolic compound determinations. **Analyst**, v. 128, n. 3, p. 255-259, 2003.

DAVID T. et al. Scanning Electrochemical Microscopy. 17. Studies of enzyme-mediator kinetics for membrane- and surface-immobilized glucose oxidase. **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 1795-1804, 1992.

DAYTON, M. A. et al. Faradaic Electrochemistry at Micro-Voltammetric Electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 946-950, 1980.

DE JESUS, K., A.; FREIRE, E.; GUIMARÃES, M., J., OC. Grafeno: aplicações e tendências tecnológicas. 2012.

DEMAILLE, C.; UNWIN, P. R.; BARD, A. J. Scanning electrochemical microscopy .33. Application to the study of ECE/DISP reactions. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 33, p. 14137-14143, 1996.

ENGSTROM, R., C. et al. Measurements within the diffusion layer using a microelectrode probe. **Analytical Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 844-848, 1986.

FAN, F. R. F.; BARD, A. J. Insitu Scanning Tunneling Microscopy of Polycrystalline Platinum-Electrodes under Potential Control - Copper Electrode position and Pyrrole Electropolymerization. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 136, p. 3216-3222, 1989.

FERNÁNDEZ, J. et al. Modified carbon fabric electrodes: preparation and electrochemical behavior toward amaranth electrolysis. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 45, p. 263-272, 2015.

FERREIRA, G., M., M. et al. DNA and graphene as a new efficient platform for entrapment of methylene blue (MB): Studies of the electrocatalytic oxidation of β -nicotinamide adenine dinucleotide. **Electrochimica Acta**, v. 111, p. 543-551, 2013.

FLEISCHMANN, A.; MULLER, P. Superconducting Tunneling and Upper Critical-Field Measurements of Amorphous Zr Based Alloys. **Physica B: Condensed Matter**, v. 135, p. 302-304, 1985.

FORSTER, R. J. Microelectrodes: new dimensions in electrochemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 23, n. 4, p. 289-297, 1994.

FURICO JUNIOR, A. Enzimas e suas aplicações: cinética enzimática. Santa Catarina, Universidade Federal de Santa Catarina–Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, 2001.

FURTADO, R.; F. et al. **Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos**. Embrapa Agroindústria Tropical, 2008.

GIBSON, Q., H.; SWOBODA, B., EP.; MASSEY, V. Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 239, n. 11, p. 3927-3934, 1964.

GORTON, L. et al. Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 400, n. 1, p. 91-108, 1999.

GREENSHIELDS, M. de W. **Sensores Químicos baseados em Compósitos de Nanotubos de Carbono**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná. Departamento de Física Curitiba, 110 p. 2011.

GUADAGNINI, L. et al. Microscopy techniques for the characterization of modified electrodes in the development of glucose biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 126, n. 2, p. 492-498, 2007.

HÄGGBLUM, M. M. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. **FEMS Microbiology Letters**, v. 103, n. 1, p. 29-71, 1992.

HEINZE, J. Ultramicroelectrodes in electrochemistry. **Angewandte Chemie International**, v. 32, n. 9, p. 1268-1288, 1993.

<https://www.ebi.ac.uk> acessada em 10 de Agosto de 2016.

IJIMA, S. et al. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 56-58, 1991.

IVANOVSKII, A. L.; ENYASHIN, A. N. Chlorgraphynes: formation path, structure and electronic properties. **Nanosystems: Physics, Chemistry, mathematics**, v. 5, p. 477-485, 2014.

IZQUIERDO, J. et al. Uses of scanning electrochemical microscopy for the characterization of thin inhibitor films on reactive metals: The protection of copper surfaces by benzotriazole. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 28, p. 8791–8800, 2010.

JOSHI, V. S. et al. Mapping of Electrocatalytic Sites on a Single Strand of Carbon Fiber Using Scanning Electrochemical Microscopy (SECM). **The Journal of Physical Chemistry**, v. 116, n.17, p. 9703–9708, 2012.

JUSTINO, D. D. et al. High Sensitive Microsensor Based on Organic-Inorganic Composite for Two-Dimensional Mapping of H₂O₂ by SECM. **Electroanalysis**, v. 27, n. 5, p. 1202-1209, 2015.

KARNICKA, K. et al. Visualisation of the local bio-electrocatalytic activity in biofuel cell cathodes by means of redox competition scanning electrochemical microscopy (RC-SECM). **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 8, p. 1998-2002, 2007.

KATSNELSON, M., I. Graphene: carbon in two dimensions. **Materials Today**, v. 10, n. 1, p. 20-27, 2007.

KWAK, J.; BARD, A. J. Scanning electrochemical microscopy. Theory of the feedback mode. **Analytical Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 1221-1227, 1989.

LEE, J. H. et al. Fabrication of microelectrode arrays for in situ sensing of oxidation reduction potentials. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 115, n. 1, p. 220-226, 2006.

LEE, Y.; AMEMIYA, S.; BARD, A. J. Scanning electrochemical microscopy. 41. Theory and characterization of ring electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 10, p. 2261-2267, 2001.

LEFROU, C. A unified new analytical approximation for positive feedback currents with a microdisk SECM tip. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 592, n. 1, p. 103-112, 2006.

LEFROU, C. A very easy kinetics determination for feedback curves with a microdisk SECM tip and rather rapid substrate reaction. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 601, n. 1, p. 94-100, 2007.

LEFROU, C.; CORNUT, R. Analytical expressions for quantitative scanning electrochemical microscopy (SECM). **ChemPhysChem**, v. 11, n. 3, p. 547-556, 2010.

LEISINGER, T. Microorganisms and xenobiotic compounds. **Experientia**, v. 39, n. 11, p. 1183, 1983.

LI, F. et al. Scanning electrochemical microscopy of redox-mediated hydrogen evolution catalyzed by two-dimensional assemblies of palladium nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 26, p. 9686-9694, 2008.

LIANG, Z. et al. Nanoscale surface analysis that combines Scanning Probe Microscopy and Mass Spectrometry: A critical review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 75, p. 24, 2016.

LU, X.; WANG, Q.; LIU, X. Review: recent applications of scanning electrochemical microscopy to the study of charge transfer kinetics. **Analytica Chimica Acta**, v. 601, n. 1, p. 10-25, 2007.

SENSOLYTCS. **Scanning Electrochemical microscopy (SECM)**. Instruction Manual, 2015.

MARAÑÓN, M. J. R.; VAN HUYSTEE, R. B. Plant peroxidases: interaction between their prosthetic groups. **Phytochemistry**, v. 37, n. 5, p. 1217-1225, 1994.

MATOS, I. O. et al. Approaches for multicopper oxidases in the design of electrochemical sensors for analytical applications. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 5223-5229, 2010.

MCKAY, L.; LESUER, R. J. A mechanistic investigation of di-tert-butyl nitroxide using scanning electrochemical microscopy (SECM). **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 28, p. 8305-8309, 2008.

MIJNLIEFF, P. F.; VREEDENBERG, H. A. A Study of Concentration-Dependent Three-Component Diffusion. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 70, n. 7, p. 2158-2169, 1966.

MIRKIN M. V. High-resolution studies of heterogeneous processes with the Scanning Electrochemical Microscope. **Microchimica Acta**, v. 130, p.127–53, 1999.

MIRKIN, M. V.; HORROCKS, B. R. Electroanalytical measurements using the scanning electrochemical microscope. **Analytica Chimica Acta**, v. 406, n. 2, p. 119-146, 2000.

MIRKIN M. V., FAN, F-R. F.; BARD, A. J. Scanning electrochemical microscopy: 13. Evaluation of the tip shapes of nanometer size microelectrodes. **J. Electroanal. Chem.** v. 328, p. 47–62, 1992.

MIRKIN, M. V.; RICHARDS, T. C.; BARD, A. J. Scanning electrochemical microscopy. 20. Steady-state measurements of the fast heterogeneous kinetics in the ferrocene/acetonitrile system. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 29, p. 7672-7677, 1993.

MOLINA, J. et al. Polyaniline coated conducting fabrics. Chemical and electrochemical characterization. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 10, p. 2003-2015, 2011.

MORKVENAITE-VILKONCIENE, I.; RAMANAVICIENE, A.; RAMANAVICIUS, A. Redox competition and generation-collection modes based scanning electrochemical microscopy for the evaluation of immobilised glucose oxidase-catalysed reactions. **RSC Advances**, v. 4, n. 91, p. 50064-50069, 2014.

YOGESWARAN, U.; THIAGARAJAN, S.; CHEN, SM. Nanocomposite of functionalized multiwall carbon nanotubes with nafion, nano platinum, and nano gold biosensing film for simultaneous determination of ascorbic acid, epinephrine, and uric acid. **Analytical biochemistry**, v. 365, n. 1, p. 122-131, 2007.

NOMNGONGO, P. N. et al. Determination of selected persistent organic pollutants in wastewater from landfill leachates, using an amperometric biosensor. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, v. 50, p. 252-261, 2012.

NUNES, L. O. **Síntese, caracterização e aplicação do óxido de grafite e grafeno em estudos eletroquímicos envolvendo ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina e epinefrina**. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Sociais Aplicadas e Exatas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha, Diamantina, 2013.

OPHUS C., CISTON J., NELSON, C., T. Correcting nonlinear drift distortion of scanning probe and scanning transmission electron microscopies from image pairs with orthogonal scan directions. **Ultramicroscopy**, v. 162, p. 1-9, 2016.

PAIXÃO, T. R. L. C. Métodos para fabricação de microeletrodos visando a detecção em microambientes. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1306-1314, 2009.

PEEBLES, C. L. et al. A self-splicing RNA excises an intron lariat. **Cell**, v. 44, n. 2, p. 213-223, 1986.

PELLISSIER, M. et al. Optimized preparation and scanning electrochemical microscopy analysis in feedback mode of glucose oxidase layers grafted onto conducting carbon surfaces. **Langmuir**, v. 24, n. 16, p. 9089-9095, 2008.

PÉREZ, F. B. M. et al. Scanning electrochemical microscopy studies for the characterization of localized corrosion reactions at cut edges of coil-coated steel. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 18, p. 2983-2992, 2014.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2014.

PLETCHER, D. **Why microelectrodes?**. In: *Microelectrodes: theory and applications*. Springer Netherlands, p. 3-16, 1991.

PONCHON, J. L. et al. Normal Pulse Polarography with Carbon-Fiber Electrodes for Invitro and Invivo Determination of Catecholamines. **Analytical Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 1483-1486, 1979.

REIS, R. M. et al. The use of copper and cobalt phthalocyanines as electrocatalysts for the oxygen reduction reaction in acid medium. **Electrochimica Acta**, v. 139, n. 0, p. 1-6, 2014.

RUZGAS, T. et al. Peroxidase-modified electrodes: fundamentals and application. **Analytica Chimica Acta**, v. 330, n. 2, p. 123-138, 1996.

SAITO, Y. A theoretical study on the diffusion current at the stationary electrodes of circular and narrow band types. **Review of Polarography**, v. 15, p. 177-187, 1968.

SANTOS, L. M. et al. Electrografting Polyaniline on Carbon through the Electroreduction of Diazonium Salts and the Electrochemical Polymerization of Aniline. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 41, p. 16103-16109, 2008.

SHANTILATHA, R.; VARMA, S.; MITRA, C. K. Designing a simple biosensor. *Advances in Biosensors: Perspectives in Biosensor*. **JAI Press, Stamford**, p. 1-36, 2003.

SHAO, Y.; MIRKIN, M. V. Probing ion transfer at the liquid/liquid interface by scanning electrochemical microscopy (SECM). **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 49, p. 9915-9921, 1998.

SILVA, R. A., RIBEIRO, A. M. C., PETRI, D. F. S. Adsorption behavior and Activity of Horseradish Peroxidase onto Polysaccharide-decorated Particles". **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 4, p. 404-409, 2007.

SILVA, S. M. et al. Direct electron transfer kinetics of horseradish peroxidase on self-assembled monolayer/gold nanoparticles decorated multiwalled carbon nanotubes. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, n. 2, p. 1348-1358, 2012.

SMITH, A. T.; VEITCH, N. C. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. **Current opinion in Chemical Biology**, v. 2, n. 2, p. 269-278, 1998.

STULIK, K. et al. Microelectrodes: Definitions, characterization, and applications (Technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1483-92, 2000.

TENENT, R. C.; WIPF, D. O. Local electron transfer rate measurements on modified and unmodified glassy carbon electrodes. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 13, n. 4, p. 583-590, 2009.

THEVENOT, D.R., TOTH, K., DURST, R.A., WILSON, G.S., Electrochemical Biosensors: recommended definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v.71, p. 2333–2348, 1999.

TICIANELLI, E., A.; GONZALEZ, E. R. **Eletroquímica: Princípios e Aplicações**. vol. 17. Edusp, 2013.

TRINH, D.; TOUZAIN, S. Numerical simulation of the far-field boundaries onto a microdisc electrode by using the infinite element. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 729, p. 1-8, 2014.

UNWIN, P. R.; BARD, A. J. Scanning electrochemical microscopy. 9. Theory and application of the feedback mode to the measurement of following chemical reaction rates in electrode processes. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 95, n. 20, p. 7814-7824, 1991.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 249-259, 2004.

VEITCH, N. C.; SMITH, A. T. Horseradish peroxidase. **Advances in Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 107-162, 2000.

WALSH, D., A.; LOVELOCK, K., RJ; LICENCE, P. Ultramicroelectrode voltammetry and scanning electrochemical microscopy in room-temperature ionic liquid electrolytes. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 11, p. 4185-4194, 2010.

WEI, C.; BARD, A. J.; MIRKIN, M. V. Scanning electrochemical microscopy. 31. Application of SECM to the study of charge transfer processes at the liquid/liquid interface. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 43, p. 16033-16042, 1995.

WIGHTMAN, R. M. Eletrodos Microvoltammetric. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 1125A-1134A, 1981.

WILSON, R.; TURNER, A. P. F. Glucose oxidase: an ideal enzyme. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 7, n. 3, p. 165-185, 1992.

WIPF, D. O.; BARD, A. J. Scanning Electrochemical Microscopy X. High Resolution Imaging of Active Sites on an Electrode Surface. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 138, n. 5, p. L4-L6, 1991.

WIPF, D., O.; BARD, A., J. Scanning electrochemical microscopy. 15. Improvements in imaging via tip-position modulation and lock-in detection. **Analytical Chemistry**, v. 64, n. 13, p. 1362-1367, 1992.

WITTSTOCK, G. et al. Scanning electrochemical microscopy for direct imaging of reaction rates. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 10, p. 1584-1617, 2007.

WOHLFAHRT, G. et al. 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 55, n. 5, p. 969-977, 1999.

WOHLFAHRT, G. et al. The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 260, n. 1, p. 69-83, 2004.

WONG, C., M.; WONG, K., H.; CHEN, X., D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 6, p. 927-938, 2008.

YOGESWARAN, U. et al. Biomonitoring of methomyl pesticide by laccase inhibition on sensor containing platinum nanoparticles in ionic liquid phase supported in montmorillonite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 155, n. 1, p. 331-339, 2011.

ZHANG, X., JU, H., WANG, J. Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications. **Elsevier, San Diego**, v. 12, p. 1-15, 2008.

ZIGAH, D. et al. Covalent immobilization and SECM analysis in feedback mode of glucose oxidase on a modified oxidized silicon surface. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 628, n. 1, p. 144-147, 2009.

ZOSKI, C. G. **Handbook of electrochemistry**. Elsevier, 2006.

ZOSKI, C., G.; MIRKIN, M. V. Steady-state limiting currents at finite conical microelectrodes. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 9, p. 1986-1992, 2002.