colloquium exactarum

DESENVOLVIMENTO DE FILMES POLIMÉRICOS NANOESTRUTURADOS DE poli[Ni(α,α'-Me$_2$*Salen*)]–OH COMO SENSOR BIOMIMÉTICO NA DETECÇÃO DE GLICEROL

DEVELOPMENT OF NANOSTRUCTURED POLYMERIC FILMS OF poli[Ni(α,α-Me$_2$*Salen*)]–OH AS BIOMIMETIC SENSOR IN DETECTION OF GLYCEROL

André Olean-Oliveira, Wesley Bruno da Silva Machini, Marcos Fernando de Souza Teixeira

Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Departamento de Física, Química e Biologia, Laboratório de Pesquisa em Eletroanalítica e Sensores, Presidente Prudente/SP, CNPq e FAPESP. E-mail: olean.oliveira.a@gmail.com, funcao@fct.unesp.br

RESUMO – Um sensor biomimético baseado no eletrodo de platina eletroquimicamente modificado com filme polimérico nanoestruturado de poli[Ni(α,α'-Me$_2$*Salen*)]–OH para detecção e quantificação de glicerol foi desenvolvido. A eletropolimerização, ativação, comportamento eletroquímico do sensor e a eletrooxidação de glicerol foram investigados utilizando a técnica de voltametria cíclica. A resposta voltamétrica do sensor foi obtida em um intervalo de concentração de 4,99 × 10^{-7} mol L^{-1} a 4,76 × 10^{-5} mol L^{-1} sendo a resposta linear entre 4,99 x 10-7 mol L^{-1} e 3,73 x 10^{-6} mol L^{-1} com limite de quantificação de 38,4 µmol L^{-1}, limite de detecção de 3,82 µmol L^{-1} e sensibilidade de 1,82 µA L mol^{-1}. O sensor apresentou característica cinética semelhante ao modelo de Michaelis-Menten, sendo então os parâmetros cinéticos calculados por Lineweaver-Burke e pelo "ajuste de curva não linear".

Palavras-chave: glicerol; sensor biomimético; sensor eletroquímico.

ABSTRACT – An electrochemical sensor based on the electrochemically platinum electrode modified with nanostructured polymeric film of poly[Ni(α,α'-Me$_2$*Salen*)]–OH for detection and quantitation of glycerol was developed. The electropolymerization, activation, electrochemical behavior of the sensor and the electrooxidation of glycerol were investigated using cyclic voltammetry technique. The voltammetric response was obtained in a concentration range from 4,99 x 10^{-7} mol L^{-1} to 4,76 × 10^{-6} mol L^{-1}, being the linear response from 4,99 × 10^{-7} mol L^{-1} to 3.73 × 10^{-6} mol L^{-1} with limit of quantification 38,4 × 10^{-5} µmol L^{-1}, limit of detection 3,82 x 10^{-6} mol L^{-1} e sensitivity of 1,82 µA L mol^{-1}. The sensor showed kinetic characteristics similar to the Michaelis-Menten model, and then the kinetic parameters calculated by Lineweaver-Burke and nonlinear fitting curve.

Keywords: glycerol; biomimetic sensor; electrochemical sensor.

Recebido em: 27/08/2014_
Aprovado em: 28/08/2014_

1 INTRODUÇÃO

O glicerol (propano-1,2,3-triol) desde 1959 é classificado como seguro para o consumo humano, sendo assim, é amplamente utilizada na indústria alimentícia e farmacêutica (NICULESCU; SIGINA; CSÖREGI, 2003; GORIUSHKINA et al., 2010). Devido sua não toxicidade, também é utilizado como agente adulterante em diversos produtos como óleos e vinhos (NICULESCU; SIGINA; CSÖREGI, 2003). Na área médica, é um dos fatores analisados nos exames sangue. Alterações nos valores normais desta (entre algumas outras substâncias) são um indicativo de possíveis complicações cardiovasculares (UWAJIMA; SHIMIZU; TERADA, 1984).

No setor de biocombustíveis o glicerol é um subproduto obtido através da transesterificação de triacilglicerídeos com metanol (DANTAS et al., 2012). Sua produção em alta escala faz crescer o interesse em desenvolver métodos e dispositivos que pudessem gerar energia através de células combustíveis de baixa temperatura (SILVA; ANGELO; DALL'ANTONIA, 2010). Em contrapartida, o glicerol se torna um agente prejudicial para os motores, uma vez que pode causar o acúmulo de sujeiras nos bicos injetores, no fundo dos tanques de combustíveis dos automóveis, e também gerar problemas nos sistemas de armazenamento. Outra adversidade deve-se a queima de biodiesel junto ao glicerol (acima de 180 °C) onde há a geração de acroleína, um composto altamente tóxico para saúde e para o meio ambiente (LOURENÇO; STRADIOTTO, 2009).

Muitos métodos analíticos vêm sendo desenvolvidos para a detecção e quantificação de glicerol livre, dentre eles, pode ser citado o uso de injeção de fluido utilizando um eletrodo de cobre como um sensor amperométrico (MARUTA; PAIXÃO, 2012), cromatografia líquida (FRIELER et al., 2009), espectrofotometria (MERCER; HALAWEISH, 2010), sensor pizoresonante (ZYABLOV; KALACH; SELEMENEV, 2006) e sensor de fibra óptica (XIONG et al., 2013).

Os eletrodos quimicamente modificados há décadas são amplamente estudados, devido a vantagens que os mesmos apresentam. Dentre elas, baixo custo, fácil manuseio, controle da quantidade de matéria depositada juntamente com controle das espécies a ser depositadas. Tais benefícios tornam os eletrodos eletroquimicamente modificados atrativos para serem utilizados como sensores eletroquímicos (BARENDRECHT, 1990; FATIBELLO-FILHO et al., 2007).

As bases de *Schiff* do tipo *Salen* são ligantes altamente quelantes com capacidade de receber diversos metais de transição. Os complexos tipo metal-*Salen* tornaram-se

famosos, dentre vários monômeros que podem ser utilizados para a modificação de superfície de eletrodos, por serem capazes de se eletrodepositarem e eletropolimerizarem, conferindo características e propriedades eletroquímicas interessantes, das quais, a possibilidade do seu emprego como sensores eletroquímicos para a detecção de uma infinidade de moléculas (FATIBELLO-FILHO et al., 2007).

Através deste trabalho, objetivou-se desenvolver e aplicar um eletrodo quimicamente modificado por filmes poliméricos Nanoestruturados de poli[Ni(α,α'-Me_2*Salen*)]–OH como sensor biomimético na eletrooxidação de glicerol.

2 METODOLOGIA

2.1 CONSTRUÇÃO DO SENSOR BIOMIMÉTICO

As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos: eletrodo de calomelano saturado (ECS) como eletrodo de referência, eletrodo de fio de platina como eletrodo auxiliar e eletrodo de platina modificado com filme polimérico de poli[Ni(α,α'-Me_2*Salen*)] como eletrodo de trabalho, conectados a um potenciostato/galvanostatoμ-Autolabtype III (Eco Chimie). A construção do sensor deu-se através da formação do filme polimérico nanoestruturado por eletropolimerização utilizando 1,0 mmol L^{-1} do complexo [Ni(α,α'-Me_2*Salen*)] em CH_3CN/PTBA 0,1 mol L^{-1}, aplicando um intervalo de potencial de 0,0 a 1,4 V *vs.* ECS a 100 mV s^{-1}. A ativação do sensor poli[Ni(α,α'-Me_2*Salen*)] para a formação do poli[Ni(α,α'-Me_2*Salen*)]–OH deu-se através de ciclagens de potenciais em NaOH 0,1 mol L^{-1} em um intervalo de potencial de 0,0 a 0,8 V *vs.* ECS.

2.2 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO SENSOR BIOMIMÉTICO

O comportamento eletroquímico do sensor biomimético poli[Ni(α,α'-Me_2*Salen*)]–OH foi estudado por voltametria cíclica em solução de NaOH 0,1 mol L^{-1}a 25 mV s^{-1}em um intervalo de potencial entre 0,0 a 0,8 V *vs.* ECS.

2.3 DESEMPENHO DO SENSOR BIOMIMÉTICO PARA GLICEROL

A determinação de glicerol foi feita pela aplicação de potenciais através de voltametria cíclica utilizando um intervalo de potencial de 0,3 a 0,6 V vs. ECS a uma taxa de varredura de 25 mV s^{-1}. O sensor biomimético poli[Ni(α,α'-Me_2*Salen*)])]–OH foi submetido a possíveis verificações em 20 mL de NaOH 0,1 mol L^{-1} (pH 13,0) desoxigenada com nitrogênio de alta pureza.

A influência de possíveis compostos eletroativos interferentes na determinação de glicerol pelo sensor biomimético foi investigada para diferentes substâncias

através da técnica de voltametria cíclica empregando um intervalo de potencial de 0,0 a 0,8 V *vs.* ECS com velocidade de 25mV s^{-1} em uma solução NaOH 0,1 mol L^{-1} (pH 13,0) utilizando uma concentração fixa de 2,92 × 10^{-6} mol L^{-1} de glicerol e uma concentração fixa de 2,92 × 10^{-6} mol L^{-1} do possível interferente.

3 RESULTADOS

3.1 CONSTRUÇÃO DO SENSOR BIOMIMÉTICO

Na etapa de eletropolimerização, o voltamograma cíclico apresentou um incremento de corrente, tanto para o pico anódico quanto para o catódico com o aumento do número de ciclos de potenciais (Figura 1).

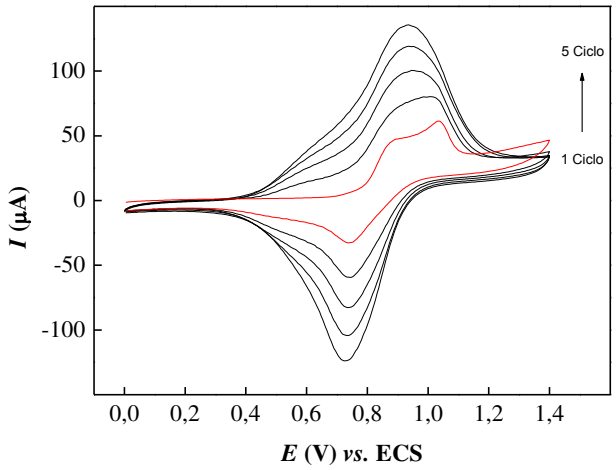


Figura 1. Voltamograma cíclico para a eletropolimerização de 1 mmol L^{-1} do complexo [Ni(α,α'-Me_2*Salen*)] em 0,1 mol L^{-1} de PTBA/CH_3CN com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} e 5 ciclos de potenciais.

A ativação do eletrodo deu-se através de uma segunda modificação, onde apenas um processo redox é observado, o qual é atribuído para Ni^{II}/Ni^{III} sendo E_{pa} = 0,42 e E_{pc} = 0,36 *vs.* ECS. Também, pode ser observado um incremento dos valores de corrente, tanto anódico quanto catódico, durante os 200 ciclos de potenciais aplicados.

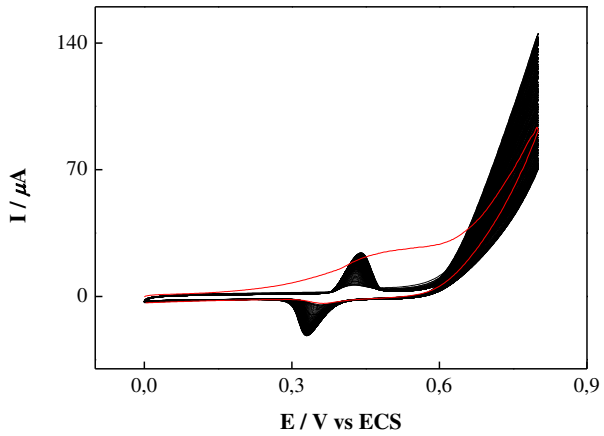


Figura 2. Voltamograma cíclico para a ativação do sensor em NaOH 0,1 mol L^{-1} (pH 13,0) utilizando um intervalo de potencial de 0,0 a 0,8 (V) *vs.* ECS com velocidade de varredura de 25 mV s^{-1}.

3.2 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO SENSOR BIOMIMÉTICO

A fim de investigar os mecanismos eletroquímicos do sensor biomimético para posterior aplicação na detecção e quantificação de glicerol, medidas voltamétricas foram realizadas. Na Figura 3 é apresentado o voltamograma para o sensor baseado no poli[Ni(α,α'-Me_2*Salen*)]–OH onde apresentou um sistema *quasi*-reversível com um processo redox, onde os valores de potencial de pico anódico e catódico são 0,44 e 0,39 V vs. ECS respectivamente.

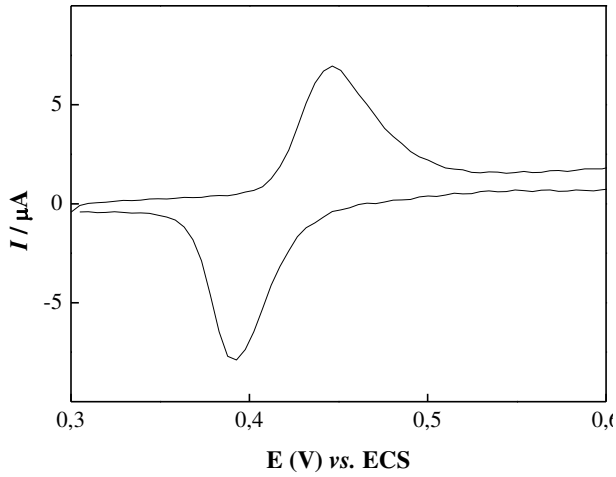


Figura 2. Voltamograma cíclico para sensor eletroquímico em NaOH 0,1 mol L^{-1} (pH 13,0) utilizando um intervalo de potencial de 0,0 a 0,8 (V) *vs.* ECS com velocidade de varredura de 25 mV s^{-1}.

A estimativa da quantidade de espécie ativa presente na superfície do eletrodo foi realizada através da relação teórica (BAR; FAULKNER, 2001):

$$I_p = \frac{n^2 F^2 A}{4\,RT}\,v$$

onde *n* é o número de elétrons envolvidos na transferência (~1), *F* é a constante de Faraday (96,485 C mol^{-1} e-), *A* como a área superficial do eletrodo (0,071 cm^{-2}), I_p é o pico de corrente (A), *R* é a constante dos gases (C K^{-1} mol^{-1}), *T* a temperatura (K) e *v* é a velocidade de varredura (V s^{-1}). O valor de *Γ* foi calculada através do coeficiente angular da reta referente aos valores de I_{pa}, já que o processo eletroquímico é controlado por adsorção. O valor encontrado para *Γ* foi estimado em 1,96 nmol cm^{-2}.

A espessura do filme polimérico pode ser estimada através da equação (HAMNETT et al., 1999):

$$h = \frac{W\,Q}{n\,F\,A\,\rho}$$

onde *W* é a massa molecular de um fragmento de poli[Ni(α,α'-Me_2*Salen*)]–OH (353,11 g mol^{-1}), *Q* (C) é carga elétrica calculada pela integral da onda do voltamograma do pico anódico do voltamograma (*v* = 25 mV s^{-1}), *n* é o número de elétrons transferidos (assume-se 1), *F* é a constante de Faraday (96485,3365 C mol^{-1}), *A* é a área da superfície do eletrodo e *ρ* é a densidade do filme (assume-se 1 g cm^{-3}). Sob as condições de eletropolimerização e ativação descritas, obteve-se um filme polimérico com espessura de 22,8 nm.

3.2 DETERMINAÇÃO DE GLICEROL UTILIZANDO O SENSOR BIOMIMÉTICO

A atividade eletrocatalítica do sensor frente à eletrooxidação do glicerol é apresentada na Figura 3. Através dos voltamogramas é possível observar um aumento dos valores de corrente pico anódica e catódica com o aumento da concentração de glicerol.

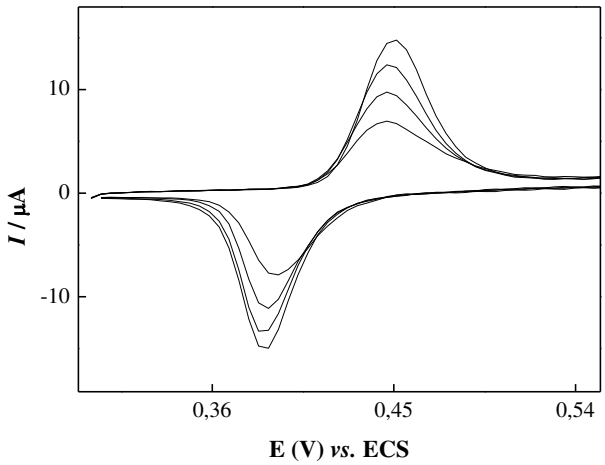


Figura 3. Voltamogramas cíclicos para sensor eletroquímico em NaOH 0,1 mol L^{-1} (pH 13,0) utilizando um intervalo de potencial de 0,0 a 0,8 (V) *vs.* ECS com velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} na (a) ausência e presença de (b) 1,49 × 10^{-6} (c) 3,73 × 10^{-6} e (d) 9,90 × 10^{-6} mol L^{-1} de glicerol.

A seletividade do sensor frente a outros álcoois possíveis interferentes na detecção e quantificação do glicerol em amostras reais, como diesel e biodiesel, foi avaliada. A Figura 4 apresenta os valores de corrente relativa para o sensor eletroquímico na presença dos interferentes.

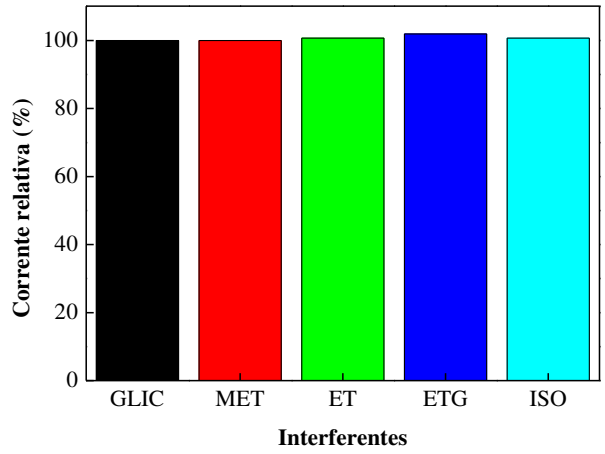


Figura 4. Relação da corrente relativa para a detecção de glicerol na presença de interferentes, onde GLIC = glicerol, MET = metanol, ET = etanol, ETG = etilenoglicol e ISO = isopropanol.

Os valores de interferências encontrados foram de 0,00%, 0,71%, 0,63% e 1,96% para metanol, etanol, isopropanol e etilenoglicol, respectivamente.

Investigada a atividade catalítica e a seletividade do sensor, medidas de voltametria cíclica em um intervalo de potencial de 0,0 a 0,8 V *vs.* ECS a 25 mV s^{-1} em NaOH 0,1 mol L^{-1} (pH 13,0) com adições de glicerol variando concentrações entre 4,99 × 10^{-7} a 4,76 × 10^{-5} mol L^{-1} (Figura 5) a fim de obter uma curva analítica foram realizadas.

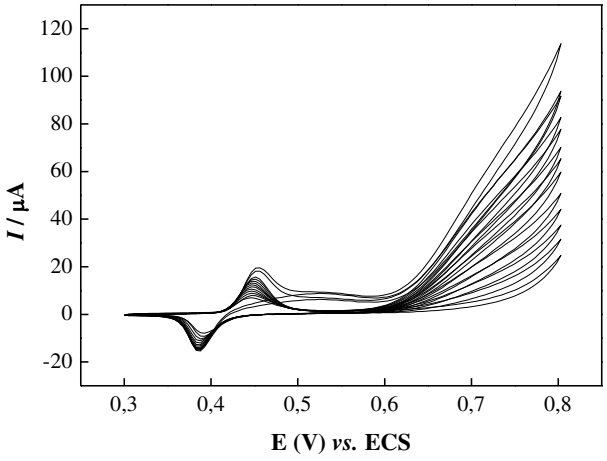


Figura 5. Voltamogramas cíclicos para sensor eletroquímico em NaOH 0,1 mol L^{-1} (pH 13,0) utilizando um intervalo de potencial de 0,0 a 0,8 (V) *vs.* ECS com velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} na ausência e com sucessivas adições de glicerol.

A Figura 6 apresenta a dependência dos valores de corrente de pico anódico em

função da concentração de glicerol. Através obteve-se um intervalo linear de concentração de 4,99 × 10^{-7} a 3,73 × 10^{-6} mol L^{-1} com valores de limite de detecção (três vezes o sinal do branco/coeficiente angular) de 3,82 µmol L^{-1}, limite de quantificação (dez vezes o sinal do branco/coeficiente angular) de 38,4 µmol L^{-1} e sensibilidade de 1,82 µA L µmol^{-1}.

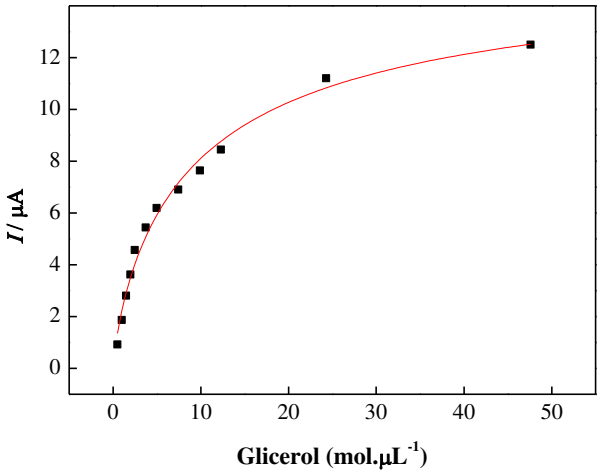


Figura 6. Dependência dos valores de corrente de pico anódica em função da concentração de glicerol de 4,99 × 10^{-7} a 4,76 × 10^{-5} mol L^{-1}.

O perfil de corrente de pico anódica em função da concentração de glicerol apresentou característica cinética semelhante ao modelo de Michaelis-Menten de um eletrodo enzimático. Desta forma, os parâmetros cinéticos derivados da equação de Michaelis-Menten foram avaliados (LYONS et al., 1998):

$$i_{\mathrm{SSC}} = \frac{n\,F\,A\,\Gamma\,k_{obs}\,[glicerol]}{K_M^{app} + [glicerol]} = \frac{i_{\max}\,[glicerol]}{K_M^{app} + [glicerol]}$$

onde *n* é o número de elétrons envolvidos na reação catalítica, K_M é constante aparente de Michaelis-Menten, *A* é a área superficial do eletrodo (0,071 cm^{-2}), *Γ* (mol cm^{-2}) é a quantidade de espécie eletroativa sobre a superfície do eletrodo, k_{obs} é a taxa de constante catalítica, $i_{\max}$ é o valor máximo da corrente catalítica ($i_{\max}$ = 1,60 × 10^{-5}) e [Glicerol] é a concentração de glicerol presente em solução. Assim, os parâmetros cinéticos foram obtidos a partir de dois diferentes métodos através do rearranjo da equação de Michaelis-Menten.

Pela equação Lineweaver-Burke:

$$I_{LB} = \frac{1}{n\,F\,A\,\Gamma\,k_{obs}}$$

$$S_{LB} = \frac{K_M}{n\,F\,A\,\Gamma\,k_{cat}}$$

e através da análise da curva utilizando o programa de montagem de regressão de mínimos quadrados não linear com base no algoritmo de Marquardt-Levenberg – *Nonlinear Fitting* (PRIGOGINE; RICE, 1996). As incógnitas *S* e *I* referem-se ao coeficiente angular e a interceptação da equação linear, respectivamente. Ainda avaliando os parâmetros cinéticos, o valor de constante de especificidade (aqui denominado de k_s – PETSKO, 1999) e a constante de heterogeneidade foram calculados através

das seguintes equações, para ambos os métodos.

$$k_s = k_{obs}/K_M^{app}$$

$$k'_e = k_{obs}\,\Gamma/K_M^{app}$$

O gráfico de I_{pa}^{-1} *vs.* [glicerol]$^{-1}$ para o método de Lineweaver-Burke é apresentado na Figura 7 e os valores cinéticos obtidos encontram-se na Tabela 1.

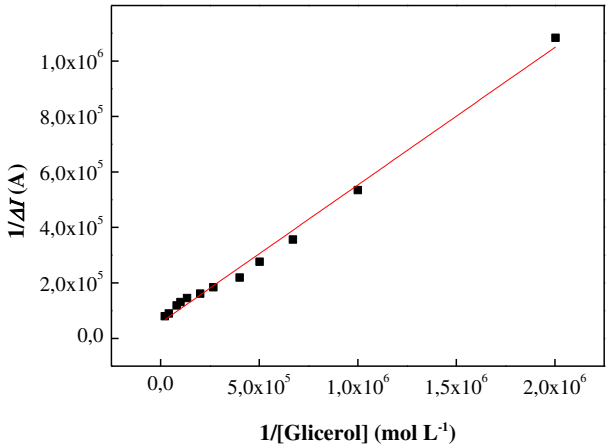


Figura 7. Dependência do inverso da corrente de pico anódica em função do inverso da concentração de glicerol.

Tabela 1. Valores cinéticos avaliados através de Lineweaver-Burke e *Nonlinear Fitting* para o sensor biomimético.

Parâmetros	Lineweaver-Burke	Nonlinear Fitting
K_m (µmol L^{-1})	8,68	9,67
K_{obs} (s^{-1})	1,30	1,19
k_s (mol L^{-1} s^{-1})	1,50 × 10^5	1,23 × 10^5
k'_e (cm s^{-1})	2,94 × 10^{-4}	2,41 × 10^{-4}

4 DISCUSSÃO

Para etapa de formação do filme polimérico através da técnica de eletropolimerização o primeiro pico anódico é atribuído para a geração de cátions radicais durante o primeiro de ciclo de potencial (SANTOS et al., 2000) e o segundo pico é atribuído ao par redox Ni^{I}/Ni^{II} em 0,93 e 0,72 V *vs.* ECS, respectivamente. Após a eletropolimerização é observado sobre a superfície do eletrodo um filme na coloração amarela.

O filme polimérico de poli[Ni(α,α'-Me_2*Salen*)] tende a se arranjar sobre a superfície do eletrodo de platina na forma de colunas moleculares (Figura 8). Esta formação é possível devido à interação do centro metálico com o anel aromático da molécula adjacente, sendo que o transporte eletrônico se dá através do comportamento denominado *electron hopping* (SANTOS et al., 2000; VILAS-BOAS et al., 2003).

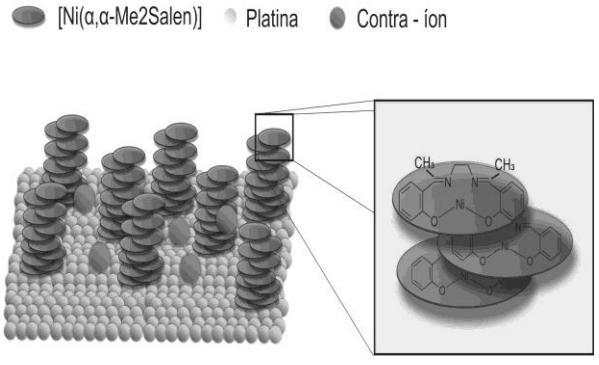


Figura 8. Representação ilustrativa para a formação das colunas moleculares e formação do filme polimérico de poli[Ni(α,α'-Me_2*Salen*)] sobre o substrato de platina.

A cada ciclagem de potencial mais monômeros vão sendo depositados sobre esta coluna. Por fim, a coluna adquire caráter de carga positiva a cada oxidação, sendo necessário que o ânion presente em solução tenha a função de contra íon, contribuindo para o balanço de carga (SANTOS et al., 2000). Também, o ânion exerce influência na distância entre as colunas moleculares.

A ativação do sensor através da segunda modificação tem o intuito de introduzir sobre as colunas moleculares a espécie de hidróxido de níquel, a qual apresenta um eficiente comportamento catalítico para diversos álcoois (SILVA; ANGELO; DALL'ANTONIA, 2010). A estabilização em 200 ciclos de potenciais demonstra, teoricamente, o total recobrimento do filme polimérico com espécies de hidróxido de níquel.

A modificação se dá na molécula terminal da coluna. Esta teoria se sustenta a partir do pressuposto de que caso as modificações se dessem também na forma intramolecular, as configurações espaciais das colunas seriam alteradas, não sendo possível assim, manterem as colunas moleculares. Tal fato se refletiria na resposta eletroquímica, onde o filme tenderia a apresentar dificuldades para realizar o transporte de elétrons por entre a coluna molecular, resultando em uma diminuição dos valores de corrente e/ou aumento dos valores de potencial de meia. A Figura 9 é apresentada a fim de elucidar esta segunda modificação e formação de poli[Ni(α,α'-Me_2*Salen*)]–OH.

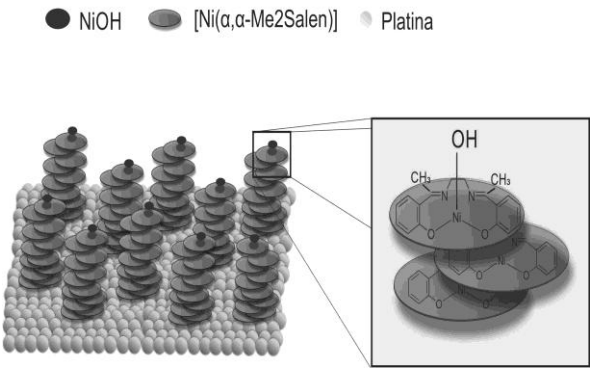


Figura 9. Representação ilustrativa referente à formação das espécies de hidróxido de níquel sobre as colunas moleculares e formação final do sensor eletroquímico baseado no poli[Ni(α,α'-Me_2*Salen*)]–OH.

O processo redox observado no voltamograma cíclico obtido no estudo do comportamento eletroquímico do sensor (Figura 2) é atribuído ao par redox Ni^{II}/Ni^{III}, de acordo com a equação:

$$poli[Ni^{II}(\alpha,\alpha'\text{-}Me_2Salen)]_{(superfície)} + OH^- \rightarrow poli[Ni^{III}(\alpha,\alpha'\text{-}Me_2Salen)]\text{–}OH_{(superfície)}$$

Utilizando a técnica de voltametria cíclica foi possível investigar o comportamento catalítico do sensor poli[Ni(α,α'-Me_2*Salen*)]–OH na presença de

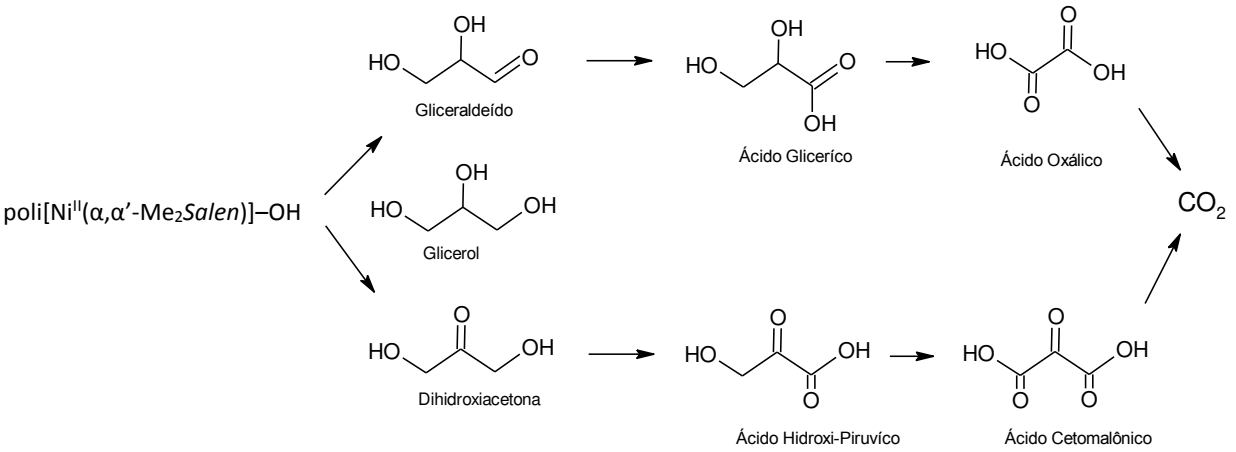


Figura 10. Esquema reacional do possível mecanismo de eletrooxidação do glicerol.

Fonte: (TEHRANI; GHANI, 2010).

glicerol. A eletrooxidação de glicerol pelo sensor baseia-se em um mecanismo onde a espécie de interesse difunde-se até a superfície do sensor e os centros catalíticos de poli[Ni(α,α'-Me2Salen)]–OH promovem sua oxidação, gerando então um incremento de corrente de pico anódica e catódica (BALLOTTIN; PAIM; STRADIOTTO, 2013). O esquema para a eletrooxidação do glicerol pode ser acompanhado segundo a Figura 10 (TEHRANI; GHANI, 2012). Através deste, nota-se que eletrooxidação do glicerol envolve diversas etapas e vários intermediários (OLIVEIRA et al., 2013).

A seletividade e possível interferência dos álcoois etanol, etilenoglicol, isopropanol e metanol foi estudada. Através dos resultados é possível avaliar que todas as espécies analisadas não afetam significativamente as medidas caso estejam presentes em solução. Todos os álcoois estiveram abaixo do limite de interferência aceitáveis pelos padrões analíticos, a qual corresponde a 5%. A maior interferência, com 2%, foi apresentada para etilenoglicol, dado que a mesma possui duas hidroxilas e estrutura que comporta melhor uma função cetona.

A curva analítica obtida através das sucessivas adições apresentou um amplo sinal analítico e três intervalos lineares regulares. A faixa analisada e melhor (4,99 × 10^{-7} a 3,73 × 10^{-6} mol L^{-1}) oportunizou em bons valores de limite de detecção (3,82 µmol L^{-1}), limite de quantificação (38,4 µmol L^{-1}) e sensibilidade (1,82 µA L µmol^{-1}). O desempenho do sensor para glicerol foi comparada com outros sensores descritos na literatura (Tabela 2). Como pode ser visto, o sensor apresentou limites de detecção mais baixos que alguns estudos, o que indica uma boa plataforma para detecção e monitoramento de glicerol.

Tabela 2. Valores comparativos de limite de detecção para diversos sensores eletroquímicos.

Material	Limite de detecção	Referência
EDDB	11,00 µmol L^{-1}	(POP et al., 2012)
Óxido de platina	25,00 µmol L^{-1}	(LOURENÇO; STRADIOTTO, 2009)
$Ni(OH)_2$/NiOOH	30,00 µmol L^{-1}	(BALLOTTIN; PAIM; STRADIOTTO, 2013)
Glicerol oxidase	50,00 µmol L^{-1}	(GORIUSHKINA et al., 2010)
Nanopartículas de Ni	95,00 µmol L^{-1}	(NEIVA, et al., 2014)
poli[Ni(α,α'-Me_2*Salen*)]–OH	3,82 µmol L^{-1}	Este trabalho

O comportamento observado através da curva analítica deve-se possivelmente a biomimetização da enzima *glicerol oxidase* pelo poli[Ni^{II}(α,α'-Me_2*Salen*)]–OH. Sendo assim, analisados os parâmetros cinéticos de acordo com o modelo de Michaelis-Menten evidencia-se uma grande afinidade do filme polimérico de poli[Ni^{II}(α,α'-Me_2*Salen*)]–OH pelo glicerol, já que a constante de Michaelis-Menten (K_M) está relacionada com a relação da enzima ou do material biomimético pelo substrato em questão. A constante catalítica (k_{obs}) oferece a medida direta da produção catalítica. Dessa forma, pode-se analisar a velocidade em que o sensor biomimético leva para catalisar a oxidação da molécula de glicerol. Por fim, a constante de especificidade (k_s) e a constante de heterogeneidade (k'_e) revelam a taxa relativa de reação do substrato (glicerol), quando é cataliticamente transformado pelo material eletroativa (poli[Ni^{II}(α,α'-Me_2*Salen*)]–OH) e o sistema baseado no mecanismo de mediação eletrônica, respectivamente.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos para o sensor baseado no filme polimérico nanoestruturado de poli[Ni^{II}(α,α'-Me_2*Salen*)]–OH demonstram grande atividade eletrocatalítica na oxidação de glicerol e propriedades biomiméticas, as quais foram estudadas através dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten. Além disso, o sensor biomimético oportunizou baixa detecção, alta sensibilidade, eficientes valores cinéticos, apresentando-se igual ou superior a outras técnicas e sensores demonstrados no decorrer do trabalho. Por fim, os resultados obtidos através deste estudo se mostraram satisfatórios e promissores na detecção e quantificação de glicerol em amostras reais de biodiesel e diesel.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (504218/2010-7) e ao Conselho

Nacional de Pesquisa – CNPq (2005/01296-4) pelo apoio à pesquisa e a bolsa concedida pela FAPESP (2013/10469-6) à W. B. S. Machini. Os autores agradecem a SJT.

REFERÊNCIAS

BALLOTTIN, D. P. M.; PAIM, L. L.; STRADIOTTO, N. R. Determination of glycerol in biodiesel using a Nickel(II) oxyhydroxide chemically modified electrode by cyclic voltammetry. **Electroanalysis**, v.25, n.7, p.1751-1755, 2013. http://dx.doi.org/10.1002/elan.201300090

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods:** fundamentals and applications. 2. ed. New York: Wiley, 2001.

BARENDRECHT, E. Chemically and physically modified electrodes - some new developments. **Journal of Applied Electrochemistry**, v.20, n.2, p.175-185, 1990. http://dx.doi.org/ 10.1007/Bf01033593

DANTAS, L. M. F. et al. SECM Studies on the electrocatalytic oxidation of glycerol at copper electrodes in alkaline medium. **Electroanalysis**, n.8, 2012. http://dx.doi.org/10.1002/elan.201200144

FATIBELLO-FILHO, O. et al. Electrochemical modified electrodes based on metal-salen complexes. **Analytical Letters**, v.40, n.10, p.1825-1852, 2007. http://dx.doi.org/10.1080/00032710701487122

FRIELER, R. A. et al. Quantitative determination of free glycerol and myo-inositol from plasma and tissue by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v.877, n.29, p.3667-3672, 2009. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.09.015

GORIUSHKINA, T. B. et al. Amperometric biosensor based on glycerol oxidase for glycerol determination. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.144, n.2, p. 361-367, 2010. http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2008.11.051

HAMNETT, A. et al. A study of the polymerisation and electrochemical cycling of Pd methoxy-Salen derivatives using fast ellipsometry and FT-infrared spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.1, n.22, p.5147-5156, 1999. http://dx.doi.org/10.1039/A906632b

LI, N. et al. Electrochemical detection of free glycerol in biodiesel using electrodes with single gold particles in highly ordered SiO_2 cavities. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.196, p.314-320, 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.02.017

LOURENÇO, L. M.; STRADIOTTO, N. R. Determination of free glycerol in biodiesel at a platinum oxide surface using potential cycling technique. **Talanta**, v.79, n.1, p.92-96, 2009. http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.03.013

LYONS, M. E. G. et al. Reaction/diffusion with Michaelis-Menten kinetics in electroactive polymer films - Part 2: The transient amperometric response. **Analyst**, v.123, p.1947-1959, 1998. http://dx.doi.org/10.1039/A803274b

MARUTA, A. H.; PAIXÃO, T. R. L. C. Flow injection analysis of free glycerol in biodiesel using a copper electrode as an amperometric detector. **Fuel**, v.91, n.1, p.187-191, 2012. http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2011.06.071

MERCER, E. J.; HALAWEISH, F. Determination of free glycerol in biodiesel via solid-phase extraction and spectrophotometric analysis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.88, n.5, p.655-659, 2010. http://dx.doi.org/10.1007/s11746-010-1707-6

NEIVA, E. G. C. et al. PVP-caped nickel nanoparticles: Synthesis, characterization and utilization as a glycerol electrosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.196, p.574-581, 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.02.041

NICULESCU, M.; SIGINA, S.; CSÖREGI, E. Glycerol dehydrogenase based amperometric biosensor for monitoring of glycerol in alcoholic beverages. **Analytical Letters**, v.36, n.9, p.1721-1737, 2003. http://dx.doi.org/10.1081/Al-120023611

OLIVEIRA, V. L. et al. Glycerol oxidation on nickel based nanocatalysts in alkaline medium – Identification of the reaction products. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.703, p.56-62, 2013. http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2013.05.021

PETSKO, G. A. Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding. **Nature**, v.401, p.115-116, 1999. http://dx.doi.org/10.1038/43565

POP, A. et al. Non-enzymatic electrochemical detection of glycerol on boron-doped diamond electrode. **Analyst**, v.137, p.641-647, 2012. http://dx.doi.org/10.1039/c2an15645h

PRIGOGINE, I.; RICE, S. A. **Polymeric systems**. New York: Wiley, 1996.

SANTOS, I. C. et al. Electrochemical and X-ray studies of nickel(II) Schiff base complexes derived from salicylaldehyde. Structural effects of bridge substituents on the stabilisation of the+3 oxidation state. **Polyhedron**, v.19, n.6, p.655-664, 2000. http://dx.doi.org/10.1016/S0277-5387(00)00300-4

SILVA, M. R.; ANGELO, A. C. D.; DALL'ANTONIA, L. H. Hidróxido de Níquel Suportado em Carbono: Um Catalisador de Baixo Custo para a Eletro-oxidação de Alcoois em Meio Alcalino. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2027-2031, 2010. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010001000004

TEHRANI, R. M. A.; GHANI, S. Electrocatalysis of free glycerol at a nanonickel modified graphite electrode and its determination in biodiesel. **Electrochimica Acta**, v.70, p.153-157, 2012. http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2012.03.044

TEHRANI, R. M. A.; GHANI, S. **Nanoelectrochemistry.** VDM Publishing, 2010.

UWAJIMA, T.; SHIMIZU, Y.; TERADA, O. Glycerol oxidase, a novel copper hemoprotein from aspergillus-japonicus - molecular and catalytic properties of the enzyme and its application to the analysis of serum triglycerides. **Journal of Biological Chemistry**, v.259, n.5, p.2748-2753, 1984.

VILAS-BOAS, M. et al. Electrochemical behavior of a new precursor for the design of poly[Ni(salen)]-based modified electrodes. **Langmuir**, v.19, n.18, p.7460-7468, 2003. http://dx.doi.org/10.1021/La034525r

XIONG, F. B. et al. G.Fiber-optic sensor based on evanescent wave absorbance around 2.7 µm for determining water content in polar organic solvents. **Applied Physics B**, v.115, n.1, p.129-135, 2013. http://dx.doi.org/10.1007/s00340-013-5583-2

ZYABLOV, A. N.; KALACH, A. V.; SELEMENEV, V. F. Determination of glycine and glycyl-glycine in aqueous and alcoholic solutions using a piezoresonance sensor. **Journal of Analytical Chemistry**, v.61, n.12, p.1209-1211, 2006. http://dx.doi.org/10.1134/S106193480612015x