

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FUNCIONALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO CARBON
BLACK VULCAN XC-72R PARA APLICAÇÕES EM
BIOSSENSORES BASEADOS EM INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

GLENDIA GISELA IBÁÑEZ REDÍN*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho

* bolsista CAPES

São Carlos - SP
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

I12f Ibáñez Redín, Glenda Gisela
Funcionalização e caracterização do carbon black vulcan XC-72R para aplicações em biossensores baseados em inibição enzimática / Glenda Gisela Ibáñez Redín. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
83 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Carbon black. 2. Funcionalização. 3. Biossensores. 4. Inibição enzimática. 5. Tirosinase.
I. Título.




Folha de Aprovação


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Glenda Gisela Ibáñez Redín, realizada em 18/02/2016:



Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho
UFSCar



Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo
IQSC/USP



Prof. Dr. Fernando Cruz de Moraes
UFSCar

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e amor;

Ao Camilo Akimushkin pelo apoio, compreensão e amor durante esta etapa;

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho pela sua confiança, paciência e orientação;

Ao Prof. Dr. Fernando C. Vicentini pela contribuição no desenvolvimento do trabalho e pelas discussões;

Ao MSc. Tiago A. Silva pela sua contribuição, pelas discussões e pela sua colaboração na revisão do manuscrito;

À MSc. Patrícia Deroco pela sua contribuição em alguns experimentos;

Ao Prof. Dr. Ronaldo C. Faria e ao Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz pelas discussões durante o seminário de mestrado;

Aos membros do Laboratório de Solidificação, DEMA-UFSCar: Prof. Dr. José Eduardo Spinelli, MSc. David Gonzalez Cruz e MSc. Bismarck Luiz Silva pela colaboração nos experimentos sobre ângulo de contato;

Aos Drs. Luiz Gorup e Ricardo Brocenschi pela colaboração em alguns dos experimentos;

Aos meus companheiros de mestrado Marina Baccari, Elson Luiz Fava e Anderson Martins por toda ajuda e amizade;

Aos membros do grupo de pesquisa LABBES;

Aos professores do DQ-UFSCar por seus ensinamentos;

Às secretárias da Pós-Graduação do Departamento de Química: Ariane, Cristina e Luciani pela colaboração;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior, CAPES pela bolsa concedida.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AuNPs – Nanopartículas de ouro (*Gold nanoparticles*)

BSA – Albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin*)

CB – Negro de fumo (*Carbon black*)

DHP – Dihexadecil hidrogenofosfato (*Dihexadecyl hydrogen phosphate*)

CMC – Carboximetilcelulose (*Carboxymethyl cellulose*)

DMF – Dimetilformamida (*N,N-Dimethylformamide*)

E – Enzima livre

ΔE_p – Separação entre os potenciais de pico

E_{pa} – Potencial de pico anódico

E_{pc} – Potencial de pico catódico

GCE – Eletrodo de carbono vítreo (*Glassy carbon electrode*)

GO – Óxido de grafeno (*Graphene oxide*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*)

GRAS – Substâncias geralmente reconhecidas como seguras (*Generally recognized as safe*)

I_0 – Corrente na ausência do inibidor enzimático

I_D – Intensidade da banda D

I_G – Intensidade da banda G

I_i – Corrente na presença do inibidor enzimático

I_s – Corrente do estado estacionário (*Steady state current*)

IL – Líquido iônico (*Ionic liquid*)

I_{pa} – Corrente de pico anódica

K_i – Constante cinética de inibição enzimática

K_M^{app} – Constante cinética aparente de Michaelis-Menten

K_p – Constante cinética de formação de produtos

K_s – Constante de formação do complexo enzima-substrato

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MWCNT – Nanotubos de carbono de parede múltiplas (*Multiwall Carbon Nanotubes*)

NaBz – Benzoato de sódio

P – Produto da reação enzimática

PAMAN – Poliamidoamina (*Polyamidoamine*)

S – Substrato da reação enzimática

SPE – Eletrodos impressos (*Screen-Printed Electrode*)

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1- Tratamentos das amostras de CB e nomenclatura empregada.....	26
TABELA 4.1- Comparação dos resultados da voltametria cíclica obtidos para diferentes eletrodos para uma solução de $K_3Fe(CN)_6$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	38
TABELA 4.2- Resultados do estudo de velocidade de varredura de potenciais dos diferentes eletrodos em solução de $K_3Fe(CN)_6$ 1 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e valores de área eletroativa (média das áreas eletroativas obtidas pelas curva de corrente de pico anódica e catódica)	41
TABELA 4.3- Comparação dos parâmetros analíticos para diferentes biossensores de tirosinase.....	53
TABELA 4.4-Valores de K_M^{app} para diferentes biossensores de Tyr	56
TABELA 4.5-. Efeito da concentração de enzima Tyr utilizada para preparação do biossensor sobre os parâmetros analíticos para a determinação de NaBz. Resultados extraídos das curvas da FIGURA 4.20.....	62
TABELA 4.6- Efeito da concentração de catecol sobre os parâmetros analíticos para a determinação de NaBz. Resultados extraídos das curvas da FIGURA 4.21.	65
TABELA 4.7- Comparação das constantes de inibição para diferentes biossensores de Tyr utilizados na determinação de ácido benzoico.	69
TABELA 4.8- Comparação dos parâmetros analíticos para diferentes biossensores de tirosinase na determinação de benzoato de sódio.....	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1-Componentes gerais dos biossensores enzimáticos. Adaptado de MOHANTY e KOUGIANOS ⁵	2
FIGURA 1.2-Tipos de imobilização enzimática.....	3
FIGURA 1.3- Esquema do princípio de funcionamento dos biossensores baseados na inibição enzimática.	4
FIGURA 1.4- Esquema do mecanismo de inibição competitiva. Sendo: E a enzima, S o substrato, P o produto da reação enzimática, I o inibidor, K_s a constante de formação do complexo enzima-substrato, K_p a constante de formação do produto e K_i a constante de inibição.	6
FIGURA 1.5-Esquema do mecanismo de inibição incompetitiva. Sendo: E a enzima, S o substrato, P o produto da reação enzimática, I o inibidor, K_s a constante de formação do complexo enzima-substrato, K_p a constante de formação do produto e K_i a constante de inibição.	7
FIGURA 1.6-Esquema do mecanismo de inibição não competitiva. Sendo: E a enzima, S o substrato, P o produto da reação enzimática, I o inibidor, K_s a constante de formação do complexo enzima-substrato, K_p a constante de formação do produto e K_i a constante de inibição.	8
FIGURA 1.7-Esquema do mecanismo de inibição mista. Sendo: E a enzima, S o substrato, P o produto da reação enzimática, I o inibidor, K_s a constante de formação do complexo enzima-substrato, K_p a constante de formação do produto,	

K_{i1} a constante de inibição do complexo enzima substrato e K_{i2} a constante de inibição da enzima.....	9
FIGURA 1.8-Mecanismo de inibição da enzima Tyr pelo ácido benzoico. Adaptado de CONRAD, <i>et al.</i> ³⁷	12
FIGURA 1.9-Estrutura das partículas primárias do CB.	15
FIGURA 1.10-Estrutura e morfologia do CB.....	16
FIGURA 1.11-Possíveis grupos funcionais no CB.....	18
FIGURA 1.12- Estrutura do DHP.....	21
FIGURA 3.1- Esquema da fabricação do biossensor de Tyr e CB funcionalizado.	27
FIGURA 4. 1- Imagens de MEV obtidas para as amostras: (a) CB, (b) CB–HNO ₃ 2 mol L ⁻¹ , (c) CB–HNO ₃ , (d) CB–H ₂ O ₂ , (e) CB–HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 1:1 e (f) CB–HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 3:1.	29
FIGURA 4. 2-Imagens de MEV obtidas para as amostras: (a) CB e (b) CB–H ₂ O ₂	30
FIGURA 4.3-Espectro Raman do CB não funcionalizado.	31
FIGURA 4.4- Espectros Raman na faixa de 1100-1700 cm ⁻¹ das amostras: (a) CB, (b) CB–HNO ₃ 2 mol L ⁻¹ , (c) CB–HNO ₃ , (d) CB–H ₂ O ₂ , (e) CB–HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 1:1 e (f) CB–HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 3:1.....	32
FIGURA 4.5-Ângulo de contato das amostras: (a) CB, (b) CB–HNO ₃ 2 mol L ⁻¹ , (c) CB–HNO ₃ , (d) CB–H ₂ O ₂ , (e) CB–HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 1:1 e (f) CB–HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 3:1	33

- FIGURA 4.6- Dispersões das amostras (a) CB e (b) CB-HNO₃/H₂SO₄ 3:1 em hexano.35
- FIGURA 4.7-Dispersões em (A) água e (B) DMF das amostras: (a) CB, (b) CB-HNO₃ 2 mol L⁻¹, (c) CB-HNO₃, (d) CB-H₂O₂, (e) CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1 e (f) CB-HNO₃/H₂SO₄ 3:1.....35
- FIGURA 4.9. Estudo da velocidade de varredura de potenciais empregando-se os eletrodos (A) CB-DHP/GCE e (B) CB-HNO₃-H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE, obtidos em solução de K₃Fe(CN)₆ 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹, $\nu = 10 - 500$ mV s⁻¹. Gráficos inseridos (a) log I_{pc} vs. log ν e (b) I_p vs. $\nu^{1/2}$39
- FIGURA 4.10- Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se os eletrodos: (—) GCE, (—) CB-DHP/GCE, (—) CB-HNO₃ 2 mol L⁻¹, (—) CB-HNO₃, (—) CB-H₂O₂-DHP/GCE, (—) CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE e (—) CB-HNO₃/H₂SO₄ 3:1-DHP/GCE em solução 1,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ de (a) paracetamol, (b) dopamina, (c) hidroquinona e (d) catecol em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, $\nu = 100$ mV s⁻¹.42
- FIGURA 4.11- (a) Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se GCE, CB-DHP/GCE e CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE em solução de dopamina 1,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹; pH 7,0; $\nu = 100$ mV s⁻¹. (b) Curvas de calibração após diferentes concentrações de dopamina.44
- FIGURA 4.12-Voltamogramas cíclicos dos eletrodos contendo tirosinase (biossensores) em solução de catecol 1,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹, tampão fosfato pH 7,5; $\nu = 100$ mV s⁻¹.46

- FIGURA 4.13-Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial ($10\text{--}200\text{ mV s}^{-1}$) para o eletrodo Tyr–CB–HNO₃/H₂SO₄ 1:1–DHP/GCE em solução de catecol $1,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,075\text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5. Gráfico inserido $-I_{pc}$ vs. $v^{1/2}$ 47
- FIGURA 4.14-Voltamogramas cíclicos obtidos para o Tyr–CB–HNO₃/H₂SO₄ 1:1–DHP/GCE em solução de catecol $1,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$ com pH variando no intervalo 5,5 – 8,0. Gráfico inserido $-I_{pc}$ vs. pH. 48
- FIGURA 4.15-Voltamogramas cíclicos obtidos para o Tyr–CB–HNO₃/H₂SO₄ 1:1–DHP/GCE em solução de catecol $1,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,5 com concentração variando no intervalo $0,01\text{ -- }0,15\text{ mol L}^{-1}$. Gráfico inserido $-I_{pc}$ vs. concentração de tampão fosfato. 49
- FIGURA 4.17-Amperograma obtido para adição de diferentes concentrações de catecol em tampão fosfato $0,075\text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), potencial aplicado $-0,2\text{V}$ e velocidade de agitação 450 rpm. Gráficos inseridos: (a) resposta da corrente em função da concentração de catecol e (b) curva analítica. 51
- FIGURA 4.18-Gráfico de Lineweaver-Burck obtido para o biossensor Tyr–CB–HNO₃/H₂SO₄ 1:1–DHP/GCE a partir de medidas de amperometria para diferentes concentrações de catecol em tampão fosfato $0,075\text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), potencial aplicado $-0,2\text{V}$ e velocidade de agitação 450 rpm. 55
- FIGURA 4.19- Amperograma obtido para a adição de diferentes concentrações de NaBz em solução catecol $5,0 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,075\text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), potencial aplicado $-0,2\text{V}$, velocidade de agitação 450 rpm. Concentrações de NaBz entre $4,9 \times 10^{-7}$ e $9,4 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ 59

FIGURA 4.20-Estudo do efeito da concentração da enzima. Gráfico inserido: amperogramas obtidos para os biossensores preparados com diferentes concentrações de enzima (30, 60 e 120 unidades) em solução de catecol $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,075 mol L⁻¹ (pH 7,5), potencial aplicado -0,2 V e velocidade de agitação 450 rpm. Faixa de concentração de NaBz para 30 unidades de enzima: $5,8 \times 10^{-6}$ - $9,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, 60 unidades: $4,9 \times 10^{-7}$ - $9,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e 120 unidades: $4,9 \times 10^{-7}$ - $9,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. 61

FIGURA 4.21-Estudo do efeito da concentração do substrato. Gráfico inserido: amperogramas obtidos para o biossensor Tyr-CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE preparado com concentração fixa de enzima (60 unidades) em solução de tampão fosfato 0,075 mol L⁻¹ (pH 7,5) contendo catecol em diferentes concentrações ($1,0 \times 10^{-6}$; $5,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), potencial aplicado -0,2 V e velocidade de agitação 450 rpm. Faixa de concentração de NaBz para concentração de catecol de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹: $9,5 \times 10^{-5}$ - $9,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; $6,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹: $4,9 \times 10^{-7}$ - $9,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹: $9,7 \times 10^{-7}$ - $9,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. 63

FIGURA 4.22-Gráficos de Lineweaver-Burk obtidos para catecol na ausência e na presença de NaBz em concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,075 mol L⁻¹ (pH 7,5). 66

FIGURA 4.23-Gráfico de Dixon obtidos para benzoato de sódio em soluções de catecol de concentração $5,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,075 mol L⁻¹ (pH 7,5). 68

FIGURA 4.24-Amperograma obtido para a adição de diferentes concentrações de NaBz (faixa de concentrações: $4,9 \times 10^{-7}$ - $9,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). Concentração de

catecol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5),
potencial aplicado $-0,2\text{V}$ e velocidade de agitação 450 rpm..... 70

FIGURA 4.25-Relação entre a porcentagem de inibição e a concentração de NaBz.
Gráfico inserido: curva analítica. 71

RESUMO

FUNCIONALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO CARBON BLACK VULCAN XC-72R PARA APLICAÇÕES EM BIOSSENSORES BASEADOS EM INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Neste trabalho funcionalizou-se o carbon black Vulcan XC-72R utilizando-se cinco tratamentos diferentes, empregando como agentes oxidantes: ácido nítrico, ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio. A caracterização física das amostras funcionalizadas foi realizada empregando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia Raman. Analisando-se os resultados obtidos tem-se que os tratamentos ácidos não alteraram significativamente a morfologia do material. Por outro lado, este tratamento proporcionou um aumento do número de defeitos atribuídos à introdução de grupos funcionais oxigenados. Foram modificados eletrodos de carbono vítreo (do inglês, *glassy carbon electrode*, GCE) com dispersões aquosas dos materiais em dihexadecil hidrogenofosfato (DHP). Para a caracterização eletroquímica dos eletrodos foram realizados estudos de voltametria cíclica empregando-se a sonda hexacianoferrato de potássio (III). Em todos os casos houve aumento da área eletroativa do eletrodo como consequência da funcionalização do material de carbono. Posteriormente, avaliou-se a resposta dos eletrodos frente a diferentes analitos (dopamina, catecol, paracetamol e hidroquinona), o eletrodo modificado em mistura de ácido nítrico e sulfúrico 1:1 (CB-HNO₃/H₂SO₄1:1-DHP/GCE) apresentou maior sinal analítico para os diferentes compostos investigados. Foram construídas curvas de calibração para a determinação de dopamina utilizando o eletrodo GCE, o eletrodo preparado com CB sem funcionalizar (CB-DHP/GCE) e o eletrodo CB-HNO₃/H₂SO₄1:1-DHP/GCE. As sensibilidades (coeficientes angulares das curvas analíticas) foram

0,334, 3,65 e 6,54 A cm⁻² mol L⁻¹, respectivamente. Estes resultados mostram um aumento significativo da sensibilidade como consequência da funcionalização do CB, sugerindo uma vantagem sobre o uso do material sem modificação para aplicações eletroanalíticas. Em seguida desenvolveu-se um procedimento analítico para a determinação de benzoato de sódio (sal de sódio do ácido benzoico) baseado na inibição enzimática da tirosinase imobilizada na superfície do eletrodo CB-HNO₃/H₂SO₄1:1-DHP/GCE (biossensor). Foram realizados estudos de mecanismo de inibição e otimização das condições de operação. A curva analítica correspondente apresentou uma faixa linear de concentração de $4,90 \times 10^{-7}$ a $1,92 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $2,1 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

ABSTRACT

FUNCTIONALIZATION AND CHARACTERIZATION OF CARBON BLACK VULCAN XC-72R FOR APPLICATIONS ON INHIBITION BASED ENZYMATIC BIOSENSORS

In this work, carbon black Vulcan XC-72R was functionalized using five different treatments, the oxidizing agents employed were: nitric acid, sulfuric acid and hydrogen peroxide. The physical characterization of functionalized samples was carried out using scanning electron microscopy (SEM) and Raman spectroscopy. The results suggested that the treatments did not significantly alter the morphology of the material in most cases and showed an increase in the number of defects attributed to the introduction of oxygenated functional groups. Glassy carbon electrodes (GCE) were modified with aqueous dispersions of materials in dihexadecyl hydrogen phosphate (DHP). For the electrochemical characterization of the electrodes were performed studies of cyclic voltammetry employing the probe potassium hexacyanoferrate (III). For all cases there was an increase in the electroactive area as a result of the functionalization. Subsequently, the response of the electrodes to different analytes (dopamine, catechol, paracetamol and hydroquinone) was evaluated, the electrode modified in a mixture of nitric and sulfuric acid 1:1 (CB-HNO₃/H₂SO₄1:1-DHP/GCE) showed the highest analytical signal for the different compounds tested. Calibration curves were constructed for the determination of dopamine using the GCE electrode, the electrode prepared with unmodified CB (CB-DHP/GCE) and the CB-HNO₃/H₂SO₄1:1-DHP/GCE electrode, the sensitivities of the analytical curves (angular coefficients of the analytical curves) were: 0.334, 3.65 and 6.54 A cm⁻² L mol⁻¹, respectively. These results show a significant increase in sensitivity as a result of the functionalization

of CB suggesting an advantage over the use of unmodified material for electroanalytical applications. Then, an analytical procedure for the determination of sodium benzoate (sodium salt of benzoic acid) based on enzyme inhibition was developed, where the tyrosinase enzyme was immobilized at the surface of the CB–HNO₃/H₂SO₄1:1–DHP/GCE electrode (biosensor). Studies of the inhibition mechanism and optimization of operating conditions were performed. The corresponding analytical curves had linear concentration ranges between 4.90×10^{-7} and 1.92×10^{-5} mol L⁻¹ and a detection limit of 2.1×10^{-7} mol L⁻¹.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais dos biossensores.....	1
1.2 Biossensores baseados em inibição enzimática	4
1.3 Mecanismos de inibição enzimática.....	5
1.3.1 Inibição competitiva.....	6
1.3.2 Inibição acompetitiva.....	6
1.3.3 Inibição não competitiva.....	7
1.3.4 Inibição mista.....	8
1.4 Determinação de ácido benzoico e/ou benzoato baseada em inibição enzimática.....	9
1.5 Carbon black	14
1.6 Estrutura e morfologia do CB	15
1.7 Grupos funcionais na superfície do CB	16
1.8 Aplicações do CB em eletroanálises	18
1.9 Dihexadecil hidrogenofosfato	21
2 OBJETIVOS.....	22
3 PARTE EXPERIMENTAL	23
3.1 Reagentes e soluções.....	23
3.2 Medidas eletroquímicas	23
3.3 Funcionalização do CB	23
3.4 Caracterização morfológica do CB	24

3.5	Caracterização espectroscópica do CB	24
3.6	Medidas de ângulo de contato.....	24
3.7	Modificação dos eletrodos de carbono vítreo	25
3.8	Imobilização da enzima Tyr.....	26
3.9	Preparação das amostras	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Caracterização do CB funcionalizado.....	28
4.1.1	Caracterização morfológica	28
4.1.2	Caracterização por espectroscopia Raman.....	30
4.1.3	Estudo de molhabilidade	33
4.1.4	Estudo de dispersão.....	34
4.2	Caracterização eletroquímica.....	36
4.3	Aplicações eletroanalíticas dos eletrodos de CB funcionalizados	41
4.4	Estudos da resposta eletroquímica do catecol.....	45
4.4.1	Estudo do efeito da velocidade de varredura de potencial.....	46
4.4.2	Efeito do pH e da concentração do eletrólito suporte	47
4.4.3	Otimização do potencial de trabalho.....	50
4.5	Determinação amperométrica de catecol	51
4.5.1	Estudo do comportamento cinético do catecol sobre o biossensor de Tyr	53
4.5.2	Estudo da estabilidade do biossensor.....	56
4.5.3	Estudo de interferentes.....	57

4.5.4	Aplicação do biossensor proposto na determinação de catecol em amostras de águas naturais e de torneira.....	57
4.6	Comportamento do biossensor de Tyr frente à adição de benzoato de sódio: determinação por inibição enzimática de benzoato de sódio.....	58
4.6.1	Estudo do efeito da concentração de catecol e da enzima na determinação de benzoato de sódio	59
4.6.2	Estudo cinético e mecanismos de inibição para a determinação de NaBz	65
4.7	Determinação amperométrica de NaBz baseada em inibição enzimática	69
5	CONCLUSÕES.....	74
<u>6</u>	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais dos biossensores

Devido à necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos que sejam amigáveis ao meio ambiente e, ao mesmo tempo, sensíveis, seletivos, econômicos e rápidos, diferentes abordagens analíticas têm sido investigadas e vem ocupando posição de destaque frente aos procedimentos analíticos convencionais¹. Particularmente, os biossensores têm adquirido grande destaque neste cenário por combinar a seletividade fornecida pelo uso de um componente biológico com a sensibilidade e a facilidade de operação característica dos biossensores em geral².

Os biossensores são sensores que utilizam um material biológico (enzimas, anticorpos, antígenos, organismos, tecidos animal e vegetal, células, organelas, etc.) conectado a um transdutor que converte o sinal biológico em um sinal quantificável³. A importância destes dispositivos consiste em sua excelente seletividade a qual permite a detecção de um analito mesmo em uma matriz complexa⁴.

A interação seletiva entre as enzimas e os seus substratos têm sido explorada na construção de biossensores enzimáticos, nos quais o analito reage pela ação catalítica da enzima, podendo gerar um ou vários produtos detectáveis. A detecção destes produtos é possível devido à presença do transdutor de sinais o qual converte a resposta biológica em um sinal analítico quantificável, o qual pode ser um sinal térmico, ótico, piezoelétrico ou eletroquímico⁴. Na FIGURA 1.1 é apresentada uma ilustração dos componentes gerais dos biossensores enzimáticos.

Introdução

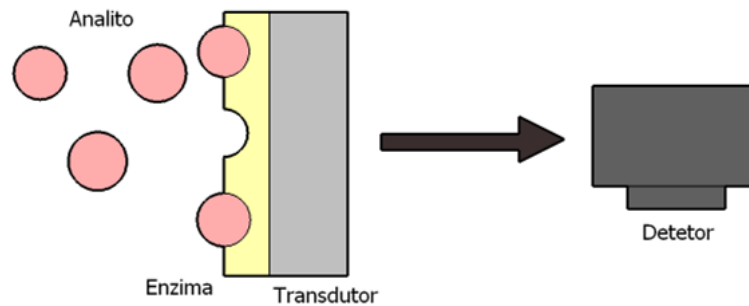


FIGURA 0.1-Componentes gerais dos biossensores enzimáticos. Adaptado de MOHANTY e KOUGIANOS⁵.

Nos biossensores com transdutores térmicos a mudança na temperatura promovida pela absorção das espécies é registrada e relacionada com a entalpia molar e a quantidade de reagentes e produtos⁶. Os transdutores óticos utilizam as mudanças nas propriedades da amostra produzidas por fenômenos óticos como absorção ou fluorescência⁴. Os transdutores piezoelétricos utilizam as propriedades que possuem alguns materiais (como o quartzo) de mudar a frequência de oscilação em função da sua massa depois de experimentar perturbações mecânicas⁷. Finalmente, o transdutor eletroquímico, como seu nome indica, relaciona a concentração do analito com um sinal eletroquímico que pode ser condutométrico, potenciométrico, impedimétrico ou amperométrico/voltamétrico, sendo estes últimos os mais utilizados⁷.

O desempenho e as aplicações dos biossensores enzimáticos são fortemente dependentes do tipo de transdutor de sinal, da fonte da enzima e da interação enzima/substrato e analito/transdutor, sendo este último de grande importância na estabilidade do dispositivo. Nesse contexto, diferentes métodos de imobilização das enzimas no transdutor foram desenvolvidos, entre os mais importantes encontram-se: adsorção sobre a superfície do material, aprisionamento

Introdução

físico, ligações covalentes e aprisionamento *cross-linking*⁸. Na FIGURA 1.2 são ilustradas as diferentes técnicas de imobilização.

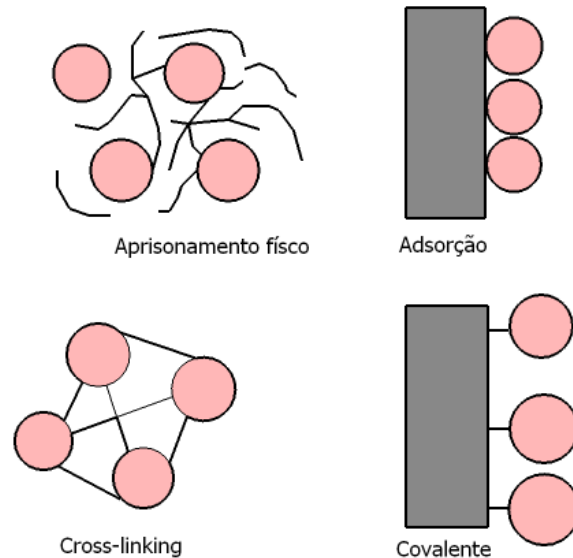


FIGURA 0.2-Tipos de imobilização enzimática.

Desde a primeira aplicação das enzimas em análises clínicas em 1962,⁹ as pesquisas envolvendo biossensores enzimáticos aumentaram notavelmente. Com isso, houve um rápido desenvolvimento de tópicos de pesquisa envolvendo o isolamento e a utilização de diferentes enzimas como componente biológico, o estabelecimento de estratégias para a imobilização das enzimas e a procura por materiais a serem utilizados como sensores eletroquímicos. Neste último tópico, o interesse é encontrar um material que permita a construção de biossensores de alto desempenho analítico por meio da melhoria das propriedades eletroquímicas do transdutor. Este objetivo tem sido alcançado mediante a utilização de diferentes materiais (principalmente de carbono) e distintas modificações químicas e físicas⁴.

1.2 Biossensores baseados em inibição enzimática

A capacidade de alguns analitos de inibir a velocidade das reações catalisadas por várias enzimas têm sido empregadas no desenvolvimento de biossensores baseados na inibição enzimática. O princípio de funcionamento destes dispositivos baseia-se na quantificação do inibidor a partir de medidas da atividade enzimática na ausência e na presença do inibidor enzimático¹⁰. Na FIGURA 1.3 ilustra-se o princípio de funcionamento dos biossensores amperométricos baseados em inibição enzimática. Na ausência do inibidor a enzima catalisa a reação de um substrato gerando um produto, e a reação do produto na superfície do eletrodo produz um sinal de corrente que é proporcional à concentração do substrato. A adição do inibidor ao sistema ocasiona uma diminuição da atividade catalítica da enzima e, conseqüentemente, uma diminuição no sinal de corrente detectado (sinal analítico), o qual é inversamente proporcional à concentração do inibidor¹¹.

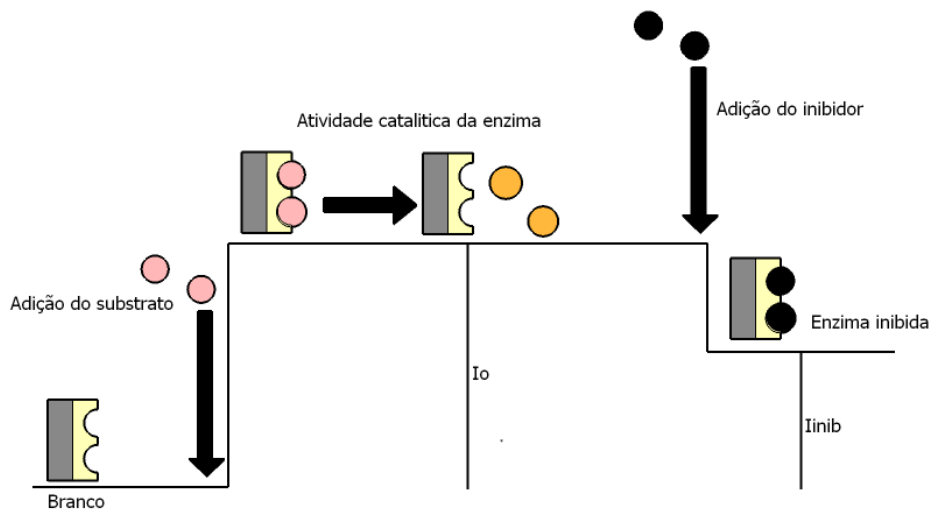


FIGURA 0.3- Esquema do princípio de funcionamento dos biossensores baseados na inibição enzimática.

Introdução

O primeiro procedimento envolvendo um dispositivo baseado em inibição enzimática foi reportado em 1962 quando GUILBAULT *et al.*¹² construíram um biossensor contendo a colinesterase para a detecção de agentes inibidores do sistema nervoso. A partir deste trabalho, diferentes protocolos têm sido desenvolvidos para a quantificação de analitos que vão desde metais pesados¹³ até compostos orgânicos como pesticidas¹⁴ e ácidos carboxílicos¹⁵, entre outros.

As pesquisas envolvendo biossensores baseados em inibição enzimática intensificaram significativamente na última década, se focando principalmente na determinação de pesticidas utilizando como material biológico a enzima acetilcolinesterase¹⁰. Todavia, alguns trabalhos mais recentes reportam a aplicação de outras enzimas na construção de biossensores de inibição para a determinação de diferentes compostos^{16,17,18}.

1.3 Mecanismos de inibição enzimática

As propriedades do biossensor, assim como a suas aplicações dependem da interação enzima-inibidor, a qual pode ser do tipo reversível ou irreversível. A inibição irreversível caracteriza-se pela formação de ligações covalentes entre o inibidor e o sítio ativo da enzima resultando na perda permanente da atividade enzimática¹⁹. Inúmeros biossensores reportados na literatura foram baseados na inibição irreversível da enzima acetilcolinesterase pelos pesticidas organofosforados^{20,21,22}.

No caso da inibição reversível, a enzima recupera a atividade inicial após lavagem com soluções tampão ou água¹⁰. Os mecanismos de inibição reversível se classificam em: inibição competitiva, acompetitiva, não competitiva e mista⁴, os quais são descritos em detalhes a seguir.

Introdução

1.3.1 Inibição competitiva

Na inibição competitiva o inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima, impedindo assim parcialmente ou integralmente a ocorrência da reação do substrato catalisada pela enzima. Altas concentrações de substrato podem deslocar o inibidor do centro ativo e, em consequência, a velocidade máxima da reação catalisada pela enzima não é afetada por esta inibição, mas a constante de velocidade é aumentada²³. Na FIGURA 1.4 é esquematizado o mecanismo de inibição competitiva.

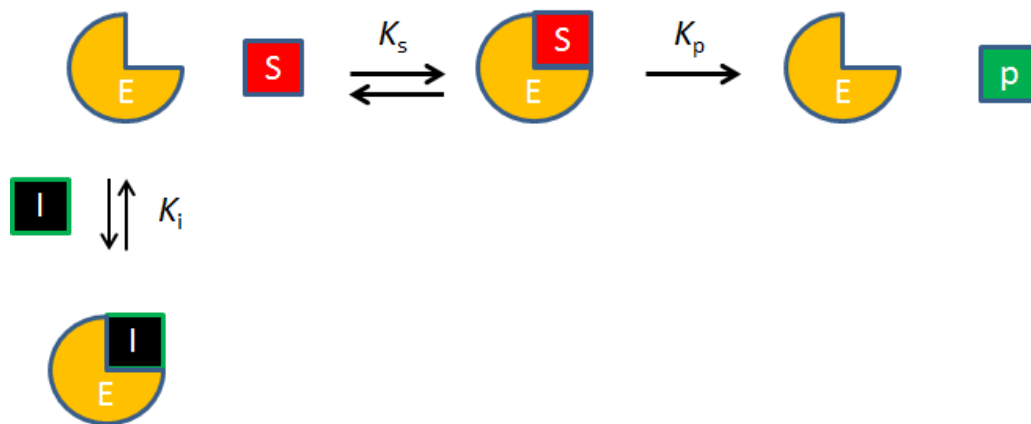


FIGURA 0.4- Esquema do mecanismo de inibição competitiva. Sendo: E a enzima, S o substrato, P o produto da reação enzimática, I o inibidor, K_s a constante de formação do complexo enzima-substrato, K_p a constante de formação do produto e K_i a constante de inibição.

1.3.2 Inibição acompetitiva

Os inibidores acompetitivos se ligam somente ao complexo enzima-substrato (em um sítio diferente do sítio ativo da enzima) e não à enzima livre, como esquematizado na FIGURA 1.5. A formação de um complexo cataliticamente inativo causa mudanças na velocidade de reação e na constante de velocidade²³.

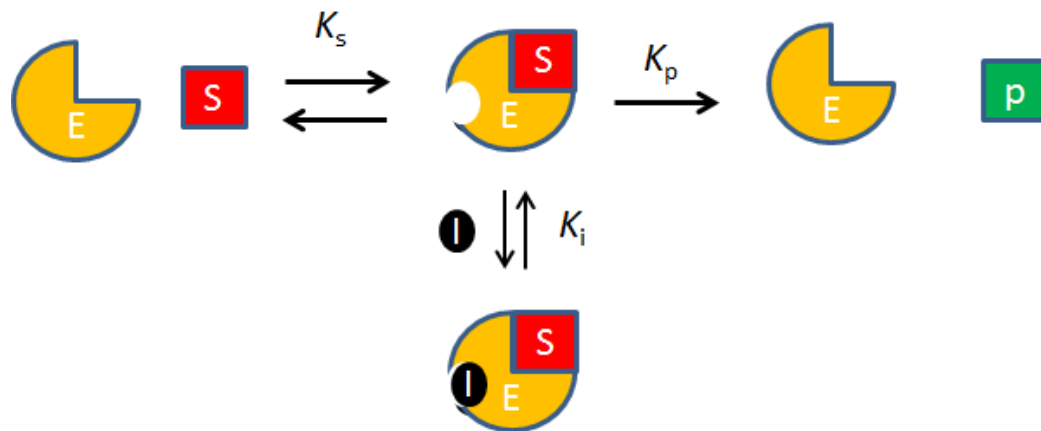


FIGURA 0.5-Esquema do mecanismo de inibição acompetitiva. Sendo: E a enzima, S o substrato, P o produto da reação enzimática, I o inibidor, K_s a constante de formação do complexo enzima-substrato, K_p a constante de formação do produto e K_i a constante de inibição.

1.3.3 Inibição não competitiva

No mecanismo de inibição não competitiva, o inibidor se liga tanto à enzima livre quanto ao complexo enzima-substrato em um sítio diferente do substrato. A formação do complexo inibidor-substrato diminui a formação dos produtos e a velocidade de reação. Na FIGURA 1.6 é esquematizado o mecanismo de inibição não competitiva.

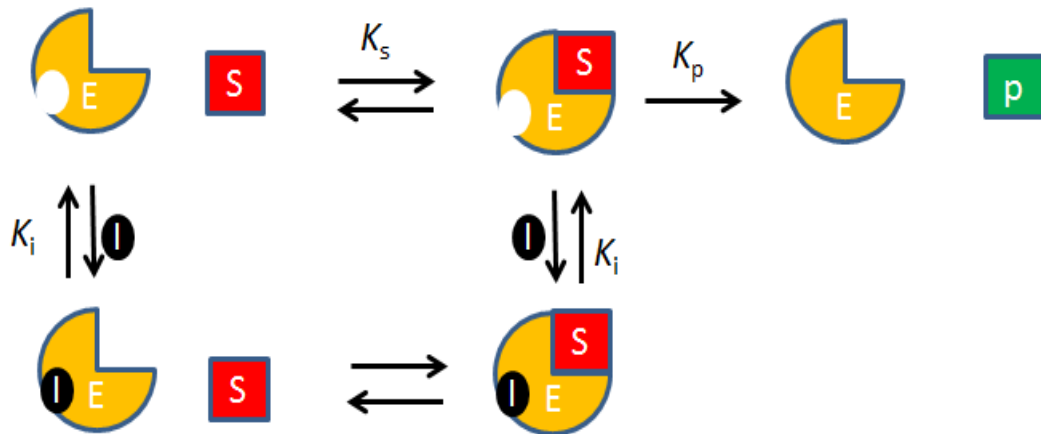


FIGURA 0.6-Esquema do mecanismo de inibição não competitiva. Sendo: E a enzima, S o substrato, P o produto da reação enzimática, I o inibidor, K_s a constante de formação do complexo enzima-substrato, K_p a constante de formação do produto e K_i a constante de inibição.

1.3.4 Inibição mista

Na inibição mista o inibidor se liga à enzima e ao complexo enzima-substrato com diferentes afinidades por ambas espécies. Este tipo de inibidores atuam aumentando a constante de velocidade, diminuindo a velocidade da reação²³. Na FIGURA 1.7 é esquematizado o mecanismo de inibição mista.

Introdução

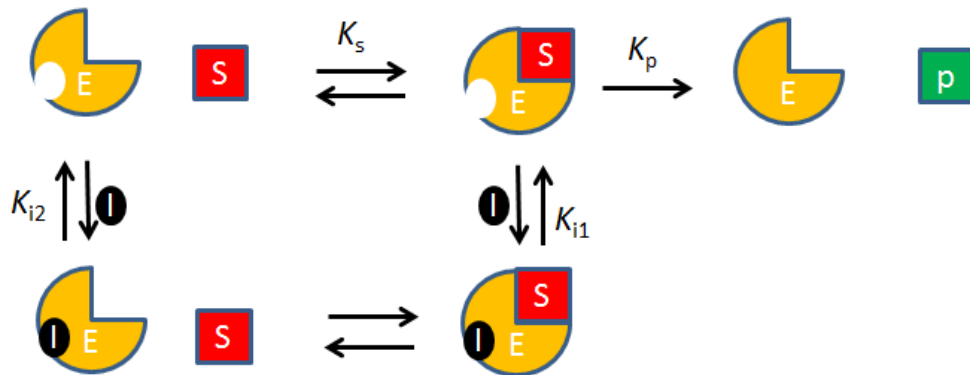


FIGURA 0.7-Esquema do mecanismo de inibição mista. Sendo: E a enzima, S o substrato, P o produto da reação enzimática, I o inibidor, K_s a constante de formação do complexo enzima-substrato, K_p a constante de formação do produto, K_{i1} a constante de inibição do complexo enzima substrato e K_{i2} a constante de inibição da enzima.

1.4 Determinação de ácido benzoico e/ou benzoato baseada em inibição enzimática

Os conservantes são reagentes geralmente adicionados em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos com o objetivo de preservar e estender a sua qualidade. Entre os conservantes mais utilizados encontram-se os ácidos benzoico e sórbico e os seus respectivos sais de sódio e de potássio²⁴. Estes atuam inibindo o crescimento de leveduras e mofo e apresentam atividade antibacteriana²⁵. A eficiência destes conservantes é limitada pela sua permeabilidade na membrana celular, sendo que as moléculas não dissociadas (protonadas) difundem-se com maior facilidade através da membrana e, portanto, estes são mais ativos em meio ácido²⁶.

Devido à sua maior solubilidade em meio aquoso (em comparação com a forma ácida), o benzoato de sódio é comumente usado como conservante em

Introdução

alimentos em conserva e bebidas não alcoólicas como refrigerantes e sucos. Nos Estados Unidos da América, o benzoato de sódio faz parte da lista de substâncias consideradas seguras (*Generally recognized as safe, GRAS*)²⁷, porém, alguns estudos reportam a relação entre o contato cutâneo com benzoato de sódio e ácido benzoico e o surgimento de alergias respiratórias e cutâneas²⁸. As concentrações permitidas deste conservante em produtos alimentícios encontram-se reguladas e dependem da legislação de cada país. No Brasil, o limite de concentração máxima recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é de 0,05 g/100 mg ou 0,05 g/100 mL.

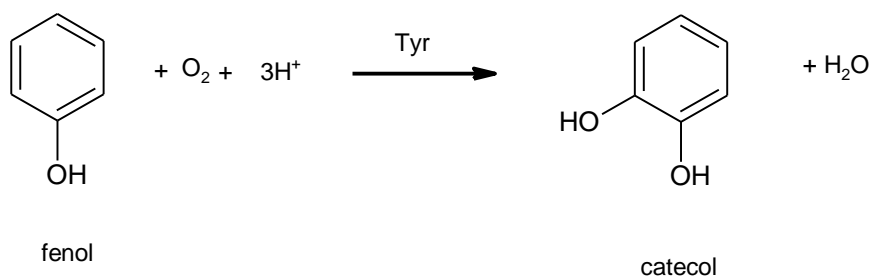
Diferentes métodos para a quantificação de benzoato de sódio e ácido benzoico têm sido desenvolvidos, entre os quais destacam-se: Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”)²⁹, eletroforese capilar³⁰, espectroscopia ultra violeta²⁴ e cromatografia gasosa³¹, entre outros. As principais desvantagens destes métodos residem no elevado custo, complexidade de operação, grande tempo de análise e em alguns casos a necessidade de extração das amostras em fase orgânica³².

Recentemente, os métodos eletroquímicos para a determinação de ácido benzoico têm-se tornado uma alternativa promissora por serem rápidos, econômicos, seletivos e eficientes³³. Estes métodos baseiam-se na inibição da atividade da enzima tirosinase na presença do ácido benzoico³².

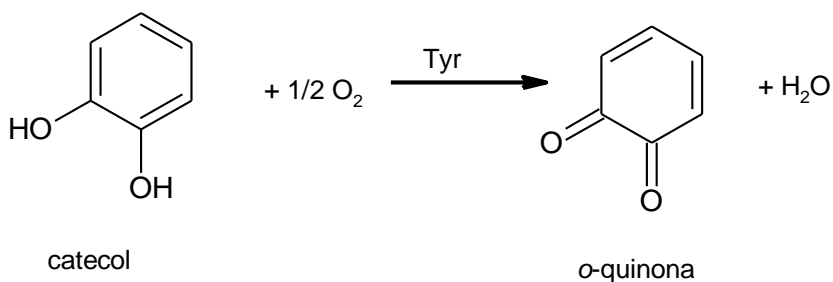
Tirosinase (Tyr) é uma metaloenzima de cobre que catalisa a hidroxilação de monofenóis para *o*-difenois e a oxidação de *o*-difenois para *o*-quinonas³⁴. O seu sítio ativo encontra-se formado por dois átomos de cobre (cada um deles ligado a três moléculas de histidina), os quais podem existir em três formas diferentes dependentes do estado de oxidação conhecidas como *met*, *deoxy*

Introdução

e *oxy*-tirosinase³⁵. As equações 1 e 2 apresentam as reações de oxidação de fenol e *o*-quinona catalisadas pela enzima Tyr na presença de oxigênio.



Eq. 1



Eq. 2

A capacidade de diferentes analitos naturais e sintéticos de inibir a atividade da Tyr tem sido extensivamente estudada devido ao papel fundamental desta enzima no processo de melanogênese em mamíferos e no escurecimento de frutas³⁶. Entre os principais inibidores da atividade da Tyr encontram-se os polifenóis, flavonoides, pesticidas tipo carbamatos e organofosforados, benzaldeídos e derivados de benzoato e ácido benzoico³⁶. O mecanismo de inibição deste último grupo envolve a formação reversível de quelatos com os átomos de cobre impedindo a interação da enzima com o substrato fenólico. Na FIGURA 1.8 apresenta-se o mecanismo de inibição da Tyr pelo ácido benzoico³⁷.

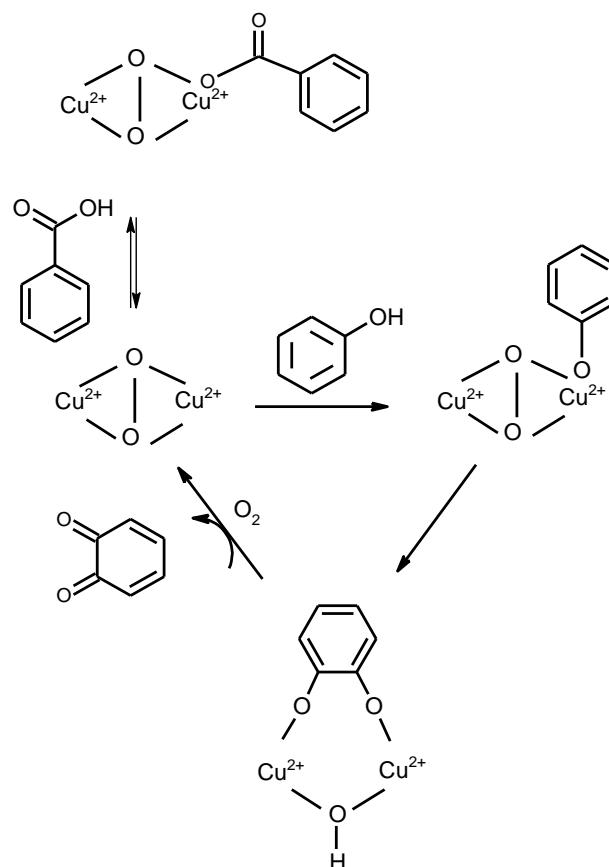


FIGURA 0.8-Mecanismo de inibição da enzima Tyr pelo ácido benzoico. Adaptado de CONRAD, *et al.*³⁷.

Diferentes biossensores para a determinação de ácido benzoico em meio aquoso e orgânico têm sido desenvolvidos. Em 1995, REVIEJO *et al.*³⁸ desenvolveram um biossensor amperométrico de Tyr para determinação de ácido benzoico em um sistema de análise por injeção em fluxo e nessas condições foi obtida uma curva analítica de 1,0 a 7,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

MORALES *et al.*³⁹ produziram um biossensor para a determinação de ácido benzoico em maionese e refrigerantes à base de cola utilizando como

Introdução

substrato fenol, obtendo-se um limite de detecção de $9,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e intervalo linear da curva analítica de 1,0 a 40 µmol L⁻¹.

STREFFER *et al.*³⁵ apresentaram um biossensor bienzimático de Tyr e glicose desidrogenase utilizando como substrato catecol. O biossensor foi empregado para a determinação de ácido kójico e ácido benzoico, obtendo-se limites de detecção de 100 nmol L⁻¹.

Diferentes materiais têm sido avaliados como modificadores de eletrodos amperométricos/voltamétricos para a imobilização de enzimas para determinação de ácido benzoico. Nesse contexto, SHAN *et al.*³² construíram um biossensor amperométrico baseado na imobilização de Tyr em nanopartículas de carbonato de cálcio. O efeito do tipo de substrato, a concentração de enzima e a espessura do filme enzimático foi avaliado e os parâmetros experimentais otimizados. Foram realizados estudos do mecanismo de inibição, encontrando-se que o mecanismo envolvido foi do tipo reversível competitivo por parte do ácido benzoico. O intervalo linear e o limite de detecção encontrados com o sensor proposto foram de $5,6 \times 10^{-7}$ a $9,2 \times 10^{-5}$ e $8,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente.

SÁNCHEZ *et al.*⁴⁰ construíram um biossensor de Tyr adsorvida em um eletrodo de carbono vítreo modificado com fosfato de cálcio. Estudou-se o funcionamento do biossensor em meio aquoso e na presença de diferentes solventes orgânicos, e este foi finalmente aplicado na determinação de ácido benzoico em maionese e refrigerantes.

Materiais de carbono³³ e nanopartículas metálicas¹⁵ têm sido empregados na construção de biossensores de Tyr para a determinação de ácido benzoico. No entanto, não há relatos da determinação de benzoato de sódio ou de potássio em amostras explorando a inibição da Tyr.

1.5 Carbon black

Um aspecto importante a ser considerado na construção de biossensores eletroquímicos é a natureza do material do transdutor o qual é encarregado de converter a resposta biológica em um sinal analítico quantificável. Desta forma, o material utilizado como transdutor deve atender a certos requisitos, como: elevada área superficial, excelente condutividade, estabilidade física e química e a capacidade de aumentar a velocidade da transferência eletrônica. Os materiais de carbono têm sido amplamente utilizados para esta finalidade por apresentar muitas dessas propriedades¹. Exemplos de materiais de carbono bastante explorados utilizados na construção de sensores e biossensores eletroquímicos incluem o grafite⁴¹, nanotubos de carbono²¹ e grafeno⁴², entre outros. Recentemente, há um crescente interesse na utilização do negro de fumo (do inglês *Carbon Black*, CB) como material de eletrodo para aplicações eletroanalíticas em decorrência das suas boas propriedades eletroquímicas e baixíssimo custo em comparação com os outros materiais de carbono geralmente utilizados.

O termo negro de fumo é empregado para definir um grupo de materiais de carbono produzidos a partir da combustão ou decomposição térmica de diferentes derivados do petróleo⁴³. As propriedades físicas do CB são dependentes do processo de produção e segundo este, pode-se classificar em três tipos diferentes, o negro de fumo de forno (*furnace black*) obtido a partir da combustão de óleo na presença de ar, o negro de fumo de canal (*channel black*) obtido pela combustão direta de combustíveis fósseis e finalmente o negro de fumo térmico (*thermal black*) produzido pela decomposição térmica do metano⁴⁴.

As aplicações do CB mudam dependendo das propriedades do material e, portanto, do processo de produção. Algumas das suas aplicações encontram-se

Introdução

na produção de papel, têxteis, revestimentos, pigmentos, catalisadores, baterias e, principalmente, como agente de reforço na produção de borracha⁴⁵.

1.6 Estrutura e morfologia do CB

A estrutura do CB tem influência direta nas suas propriedades físico-químicas, e por este motivo tem sido amplamente estudada utilizando-se diferentes técnicas como difração de raios X⁴⁶, espectroscopia de força atômica⁴⁷ e microscopia eletrônica de transmissão⁴⁸, entre outras. O CB apresenta uma microestrutura formada por camadas hexagonais paralelas, com uma separação maior do que a apresentada no grafite. Grupos de três ou quatro camadas agrupam-se para formar cristalitos, e estes por sua vez se combinam aleatoriamente formando as partículas primárias⁴⁹. Na FIGURA 1.9 ilustra-se a estrutura das partículas primárias do CB.

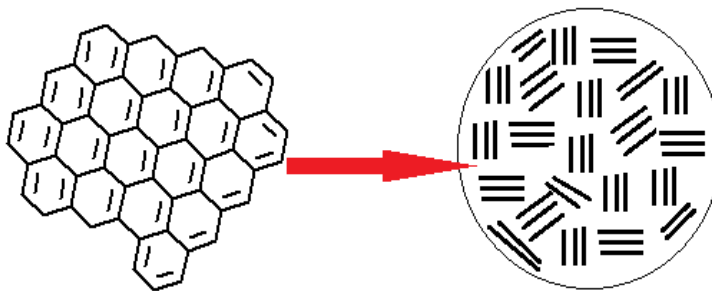


FIGURA 0.9-Estrutura das partículas primárias do CB.

As partículas primárias do CB possuem geometria esférica e diâmetros entre 10 e 100 nm aproximadamente⁴⁹. Estas partículas combinam-se formando aglomerados de diferentes tamanhos e formas, os quais são os responsáveis pela estrutura do material. Quando o CB possui aglomerados de grande tamanho formados por muitas partículas, este é considerado de estrutura grande. Caso contrário,

Introdução

considera-se o CB de estrutura pequena⁴³. Na FIGURA 1.10 ilustra-se o CB de estrutura grande e pequena.

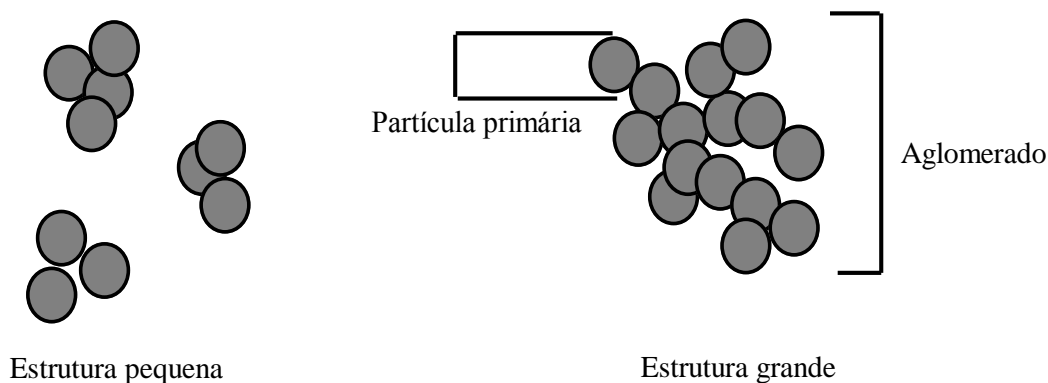


FIGURA 0.10-Estrutura e morfologia do CB.

O tamanho das partículas primárias assim como a sua aglomeração podem ser controlados no processo de manufatura e tem influência em propriedades do material como área superficial e tamanho de poro.

1.7 Grupos funcionais na superfície do CB

O CB encontra-se composto predominantemente por carbono e hidrogênio, porém, na sua composição pode-se encontrar outros elementos como enxofre, nitrogênio, halogênios e principalmente oxigênio. A proporção e a forma química na qual se encontram estes elementos muda de um tipo de CB para outro e depende diretamente do tipo de hidrocarboneto empregado e do processo de manufatura e estocagem.

Geralmente o conteúdo de nitrogênio no CB é baixo em comparação com outros elementos, mas este também pode ser introduzido na superfície do material através de tratamentos que envolvem reagentes tais como amônia e

Introdução

dimetilamina em altas temperaturas, promovendo-se a formação de complexos carbono-nitrogênio. O enxofre pode-se encontrar no CB formando complexos carbono-enxofre e como sulfetos inorgânicos e orgânicos. Por sua vez, os halogêneos são introduzidos através de processos que envolvem absorção tanto física quanto química⁵⁰.

O oxigênio é o elemento de maior influência sobre as propriedades físico-químicas do CB, tais como: molhabilidade, dispersibilidade, atividade catalítica, condutividade, entre outras. Estes grupos podem-se encontrar formando ligações com os átomos de carbono na borda das camadas de grafite (*edge plane*) ou formando sistemas heterocíclicos⁵⁰. Dependendo da natureza dos grupos funcionais, o CB pode exibir comportamento ácido, básico ou neutro em dispersões aquosas.

Os grupos funcionais oxigenados podem ser encontrados no CB como resultado do processo de manufatura, mas também podem ser introduzidos a partir de diferentes tratamentos de funcionalização. Os grupos ácidos, são formados pela funcionalização com oxigênio em temperaturas altas ou pela reação com agentes oxidantes, os grupos básicos se formam quando o CB é aquecido em atmosfera inerte e após o resfriamento deixado em contato com oxigênio e, finalmente, os grupos neutros são formados pela adsorção de oxigênio nos sítios insaturados na superfície do CB⁵⁰. Na FIGURA 1. 11 são apresentados alguns dos grupos funcionais oxigenados que podem ser identificados no CB.

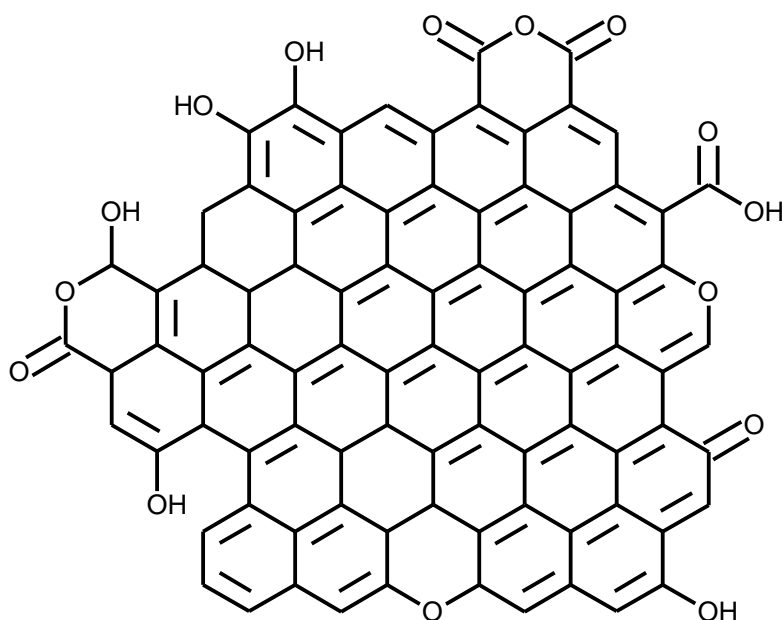


FIGURA 0.11-Possíveis grupos funcionais no CB.

A química superficial do CB foi extensivamente estudada empregando-se métodos que envolvem principalmente titulações dos grupos funcionais⁵¹, análises térmicas⁵² e diferentes técnicas espectroscópicas^{53,54}. As aplicações deste material são diretamente afetadas pela sua química superficial, e diferentes estudos demonstraram o efeito positivo da funcionalização do CB sobre as suas propriedades adsorptivas para a remoção de poluentes⁵⁴, o seu desempenho como suporte na síntese de catalisadores metálicos^{55,56} e sobre algumas das propriedades dos compósitos CB-polímero⁵⁷, entre outros.

1.8 Aplicações do CB em eletroanálises

Embora em torno de 90% da produção de CB seja destinada para a indústria da borracha (principalmente para a manufatura de pneus de automóveis)⁴⁵, diferentes aplicações deste material foram exploradas com o passar do tempo.

Introdução

Alguns tipos de CB têm propriedades como grande área superficial, resistência à corrosão e alta condutividade elétrica, as quais são muito atraentes do ponto de vista eletroquímico, e por este motivo têm sido exploradas na fabricação de baterias⁵⁸ e catalisadores para células a combustível⁵⁹.

Recentemente, o CB foi empregado como um material alternativo para aplicações eletroanalíticas, e suas boas propriedades eletroquímicas combinadas com o seu baixo custo (1 kg por 1 euro)⁶⁰ têm feito com que o número de trabalhos utilizando CB como material para eletrodos seja cada vez maior. Um dos primeiros trabalhos envolvendo CB como material para a construção de sensores foi realizado por ARDUINI *et al.*⁶¹ em 2010, através da avaliação do comportamento voltamétrico de diferentes analitos frente a um eletrodo de pasta de CB N220. Os resultados desse trabalho mostraram deslocamentos nos potenciais de pico para valores menos positivos e incrementos nas correntes de pico para alguns dos analitos em comparação com o eletrodo de pasta de grafite.

Posteriormente, ARDUINI *et al.*⁶⁰ demonstraram as vantagens da utilização de dispersões de CB como material modificador. Foram modificados eletrodos impressos (do inglês *Screen-Printed Electrode*, SPE) com filmes de CB obtendo-se melhoras na resposta eletroquímica de diferentes analitos em comparação com o SPE sem modificação. A partir deste trabalho, o CB tem sido extensivamente empregado como material para a construção de diferentes sensores^{62,63} e biossensores^{16,22,64,65}.

Uma contribuição importante ao estudo das propriedades eletroquímicas do CB foi realizada em 2014 por VICENTINI *et al.*⁶⁶ ao caracterizar física e morfológicamente três tipos de CB (Vulcan XC-72R, BP 4750 e E2000) e comparar o comportamento de diferentes analitos frente a eletrodos

Introdução

modificados com dispersões poliméricas dos CBs. Os resultados mostraram um melhor desempenho do eletrodo modificado com CB vulcan XC-72R.

O vulcan XC-72R é um tipo de *furnance black* extensivamente utilizado em eletrocatalise como suporte de catalisadores metálicos para células a combustível, possui área superficial específica de $254 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e baixa resistividade elétrica⁶⁷. Entre as propriedades deste material destaca-se a facilidade de modificar os grupos funcionais na sua superfície sem alterar significativamente as suas propriedades condutoras, e isto tem sido aproveitado por pesquisadores para avaliar o efeito das mudanças nos grupos funcionais sobre as propriedades dos catalisadores^{56,68}.

O efeito da química superficial do CB sobre as suas propriedades eletroanalíticas ainda foi pouco estudado. Em 1997, FRYSZ e CHUNG⁶⁹ estudaram as mudanças nas propriedades eletroquímicas de eletrodos de CB (*acetylene black*) após diferentes tratamentos de funcionalização térmica e eletroquímica. Os resultados desse trabalho mostraram mudanças das áreas eletrocatalíticas, das capacitâncias dos eletrodos e aumentos nas constantes de transferência heterogênea de elétrons para a sonda eletroquímica hexacianoferrato (II) de potássio como consequência da funcionalização. Estes resultados foram atribuídos às alterações no tamanho de poro e nos grupos funcionais na superfície do CB.

ARDUINI *et al.*⁶¹ estudaram o efeito da funcionalização química (em meio ácido e básico) e eletroquímica do CB N220 sobre o comportamento voltamétrico de diferentes espécies, encontrando-se uma vantagem do uso do CB funcionalizado em meio ácido para a maioria dos analitos.

Embora pesquisas anteriores sugerem a possibilidade de melhorar as propriedades eletroquímicas do CB para aplicações em eletroanálises utilizando tratamentos de funcionalização, ainda são necessários estudos para compreender

Introdução

como as mudanças estruturais e a natureza dos grupos funcionais afetam a transferência eletrônica.

1.9 Dihexadecil hidrogenofosfato

O dihexadecil hidrogenofosfato (DHP, do inglês “Dihexadecyl Hydrogen Phosphate”) é um surfactante hidrofóbico amplamente utilizado (junto com outros materiais) na preparação de sensores e biossensores eletroquímicos. Possui uma cabeça polar com carga negativa e duas cadeias hidrofóbicas longas. Trabalhos anteriores mostraram a capacidade do mesmo de formar filmes homogêneos e estáveis a partir da modificação de eletrodos com dispersões aquosas de DHP⁷⁰ e materiais de carbono como nanotubos e CB⁶⁶. Na FIGURA 1.12 apresenta-se a estrutura do DHP.

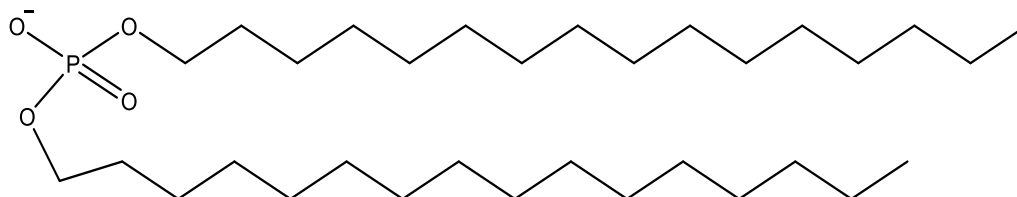


FIGURA 0.12- Estrutura do DHP.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi funcionalizar o carbon black Vulcan XC-72R utilizando diferentes tratamentos oxidantes, avaliar o efeito da funcionalização sobre as propriedades tanto físicas quanto eletroquímicas do material e empregar o CB funcionalizado na construção de um biossensor de tirosinase para a determinação de catecol e de benzoato de sódio baseada em inibição enzimática..

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Tyr (CAS: 2197-63-9) extraída de fungo (≥ 1000 unidades mg^{-1}), dihexadecil hidrogenofosfato (CAS:9002-10-2), catecol (99 %) (CAS: 120-80-9) e hidrocloreto de dopamina (98 %) (CAS: 62-31-7) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O carbon black Vulcan XC-72R (CAS:1333-86-4) foi cedido pela Cabot Corporation. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções foram preparadas em água ultrapura obtida num sistema Milli-Q (Millipore[®], Bedfore, MA) com resistividade superior a 18,2 $\text{M}\Omega$ cm.

3.2 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula de vidro de 10 mL com tampa de Teflon[®] contendo orifícios para os eletrodos. Foi utilizado um sistema de três eletrodos, sendo que os de trabalho foram os eletrodos de carbono vítreo modificados, como referência foi utilizado o eletrodo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e como eletrodo auxiliar uma placa de platina. As medidas foram realizadas utilizando-se um potenciostato $\mu\text{AUTOLAB III}$ (Ecochemie) interfaciado a um computador e gerenciado pelo software GPES 4.9.

3.3 Funcionalização do CB

O CB foi funcionalizado usando diferentes tratamentos. Para isto, 50 mg de CB e 100 mL de solução de agente oxidante foram misturados em béqueres. As misturas foram agitadas utilizando-se um agitador magnético durante 30 min à temperatura controlada de 25 ± 1 °C, e após este intervalo de tempo os materiais

Parte Experimental

foram lavados com água ultrapura até a solução atingir pH 7 e, posteriormente, foram secadas em estufa a 120 °C durante 12 horas. Os diferentes agentes oxidantes empregados foram: HNO₃/H₂SO₄ (3:1 v:v), HNO₃/H₂SO₄ (1:1 v:v), HNO₃ concentrado, HNO₃ 2 mol L⁻¹ e H₂O₂ (30 % m/v).

3.4 Caracterização morfológica do CB

A caracterização morfológica do CB foi realizada empregando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) de alta resolução, utilizando-se um equipamento modelo Supra 35-VP (Carl Zeiss, Alemanha) com feixe de elétrons de 25 keV. Para a preparação das amostras, 8,0 µL de dispersões de 1,0 mg de CB preparadas em 1,0 mL de água foram depositados sobre placas de carbono vítreo e deixado secar durante 2 h antes dos experimentos.

3.5 Caracterização espectroscópica do CB

A caracterização espectroscópica do CB foi realizada empregando-se a espectroscopia Raman, utilizando-se um espectrofotômetro Raman Horiba/Join Yvon Labram com laser de 540 nm. Para a preparação das amostras, 8,0 µL de dispersões de 1 mg de CB preparadas em 1 mL de água foram depositadas sobre placas de silício, e as amostras foram deixadas secar durante 2 h antes dos experimentos.

3.6 Medidas de ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato com água deionizada foram realizadas utilizando-se um goniômetro HTM Reetz GMBH modelo DSAHT-12 (Kross) com o software DSA 3 Image. Para a preparação das amostras, 8,0 µL de dispersões de 1,0 mg de CB preparadas em 1,0 mL de água foram depositadas

Parte Experimental

sobre placas de carbono vítreo, e as amostras foram deixadas secar durante 2 h antes dos experimentos. Para as medidas de molhabilidade, foram depositados 3,0 μL de água sobre as superfícies das placas de carbono vítreo contendo os filmes de CB.

3.7 Modificação dos eletrodos de carbono vítreo

Para a modificação do eletrodo de carbono vítreo (do inglês, *glassy carbon electrode*, GCE) foi preparada uma dispersão de 1,0 mg de CB funcionalizado e 1,0 mg de DHP em 1,0 mL de água ultrapura, e a mistura foi dispersada em ultrassom durante 30 minutos.

Antes da modificação, o GCE de 3 mm de diâmetro foi polido com alumina e lavado com água ultrapura e álcool isopropílico em um ultrassom durante 2 minutos. Posteriormente, 8,0 μL da dispersão foram depositados sobre a superfície do eletrodo e o solvente foi deixado evaporar durante 2 h. Na TABELA 3.1 é apresentada a nomenclatura empregada para os eletrodos modificados com cada tipo de CB funcionalizado.

Parte Experimental

TABELA 3.1- Tratamentos das amostras de CB e nomenclatura empregada

Tratamento	Amostras	Eletrodos
–	CB	CB–DHP/GCE
HNO ₃ 2 mol L ⁻¹	CB–HNO ₃ 2 mol L ⁻¹	CB–HNO ₃ 2 mol L ⁻¹ – DHP/GCE
HNO ₃ concentrado	CB–HNO ₃	CB–HNO ₃ –DHP/GCE
H ₂ O ₂ 30% (m/v)	CB–H ₂ O ₂	CB–H ₂ O ₂ –DHP/GCE
HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 1:1 (v:v)	CB–HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 1:1	CB–HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 1:1– DHP/GCE
HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 3:1 (v:v)	CB–HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 3:1	CB–HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 3:1– DHP/GCE

3.8 Imobilização da enzima Tyr

Para a imobilização da enzima Tyr no GCE modificado utilizou-se o método da ligação covalente cruzada (*cross linking*) com glutaraldeído como reagente reticulante. Foram misturados sobre a superfície do eletrodo modificado com CB e DHP, 3,0 µL de solução estoque de Tyr de concentração 60 U µL⁻¹ em tampão fosfato pH 7,0; 2,0 µL de solução de glutaraldeído 0,25% (v:v) em água e 2,0 µL de solução de albumina de soro bovino (BSA) 0,1% (m:v) em tampão fosfato pH 7,0. O eletrodo foi deixado secar durante 12 h em um dessecador. Na FIGURA 3.1 apresenta-se o esquema da imobilização da enzima Tyr na superfície do GCE modificado com CB.

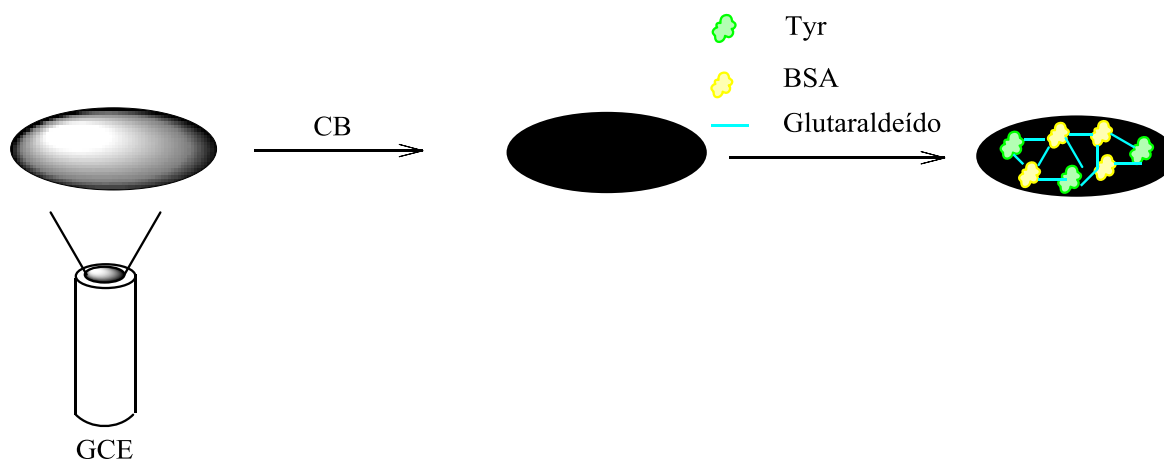


FIGURA 3.1- Esquema da fabricação do biossensor de Tyr e CB funcionalizado.

3.9 Preparação das amostras

Foi realizada a determinação de catecol em amostras de água natural e de torneira. A amostra de água natural foi coletada da represa da universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e posteriormente filtrada. A amostra de água de torneira foi utilizada sem qualquer pre-tratamento. Alíquotas de 920 μL de água natural e 920 μL de água de torneira foram fortificadas com catecol, e 100 μL de cada alíquota foram adicionados na célula contendo 10 mL de solução de tampão fosfato 0,075 mol L^{-1} (pH 7,5) para obter uma concentração de catecol de $8,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} . A determinação de benzoato de sódio foi realizada em uma amostra de cebolas em conserva obtida comercialmente. Uma alíquota de 950 μL de água de conserva foi fortificada com benzoato de sódio e 100 μL foram adicionados na célula contendo 10 mL de solução de tampão fosfato 0,075 mol L^{-1} (pH 7,5) e uma concentração de catecol de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} para obter uma concentração de benzoato de sódio de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do CB funcionalizado

4.1.1 Caracterização morfológica

As propriedades eletroquímicas dos materiais de carbono são fortemente dependentes da sua estrutura. A estrutura do CB é formada por partículas primárias as quais são combinadas formando agregados de vários tamanhos e formas⁷¹. Com o objetivo de estudar as possíveis mudanças morfológicas provocadas pelos diferentes tratamentos, avaliou-se por MEV a morfologia do material antes e depois de cada tratamento realizado. Na FIGURA 4.1 são apresentadas as imagens de MEV obtidas para as amostras de CB submetidas aos diferentes agentes de funcionalização, (a) CB, (b) CB–HNO₃ 2 mol L⁻¹, (c) CB–HNO₃, (d) CB–H₂O₂, (e) CB–HNO₃/H₂SO₄ 1:1, e (f) CB–HNO₃/H₂SO₄ 3:1. Como pode ser observado, o CB apresentou a morfologia típica de uma estrutura grande, sem mudanças aparentes na estrutura do material como consequência da funcionalização com ácidos. Resultados similares foram obtidos por LÁZARO *et al.*⁶⁸, encontrando que os tratamentos de oxidação em meio ácido do carbon black à temperatura ambiente e por curtos períodos de tempo não causaram modificações visíveis na sua morfologia.

Resultados e Discussão

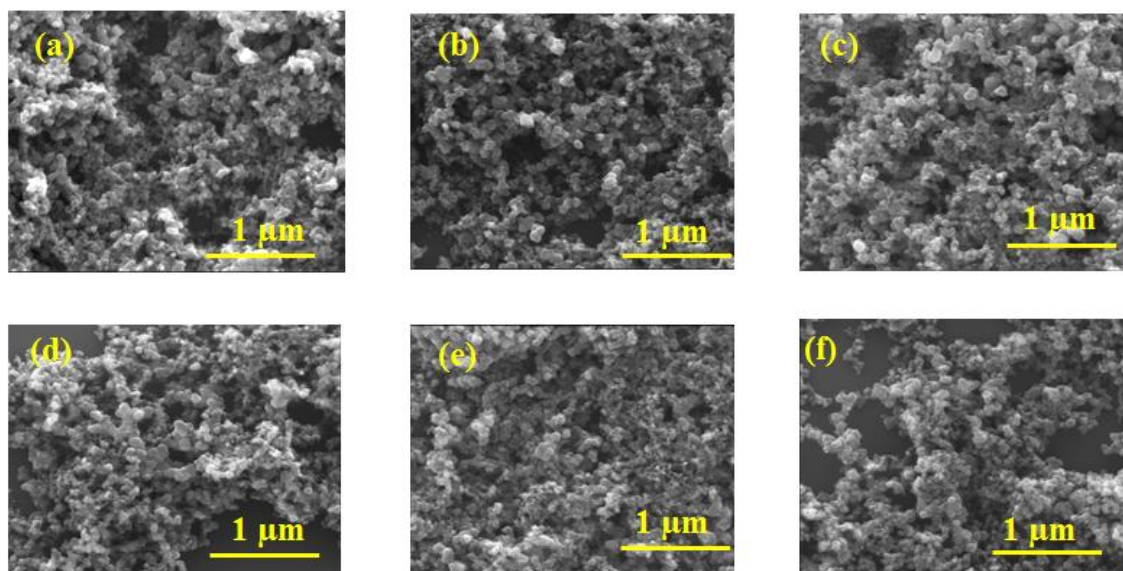


FIGURA 4. 1- Imagens de MEV obtidas para as amostras: (a) CB, (b) CB-HNO₃ 2 mol L⁻¹, (c) CB-HNO₃, (d) CB-H₂O₂, (e) CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1 e (f) CB-HNO₃/H₂SO₄ 3:1. Magnitude: 100 000.

No caso do CB funcionalizado com H₂O₂ 30% (m/v) foram observadas mudanças significativas na morfologia como consequência da funcionalização. Na FIGURA 4.2 são apresentadas as imagens de MEV do CB não funcionalizado e do CB-H₂O₂ para uma ampliação menor (3 µm). No caso da amostra funcionalizada, é possível observar a aparição de buracos como resultado das mudanças na estrutura dos aglomerados do CB e, esse comportamento pode ser atribuído à formação de grupos funcionais carregados na superfície das nanopartículas de CB, os quais aumentam o grau de dispersão entre os aglomerados⁴⁵.

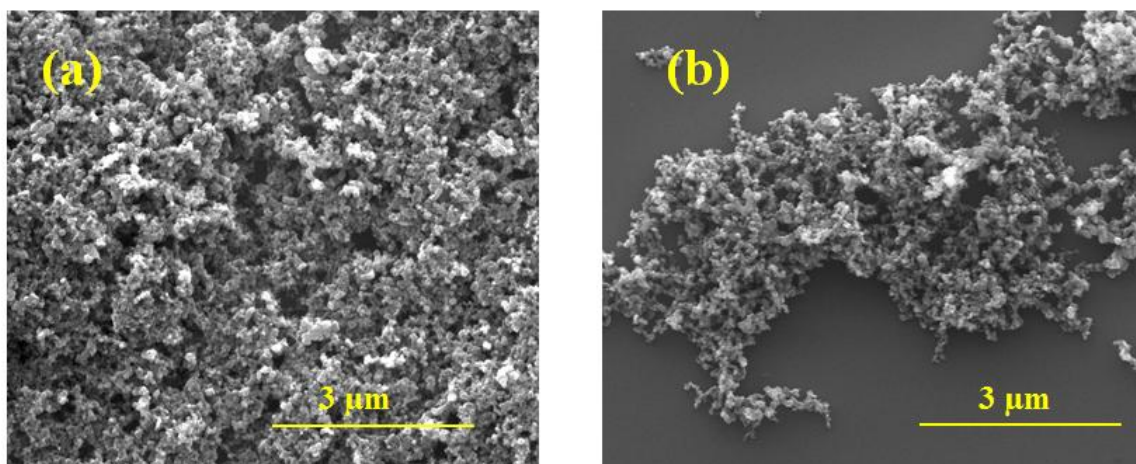


FIGURA 4. 2-Imagens de MEV obtidas para as amostras: (a) CB e (b) CB-H₂O₂. Magnitude: 40 000.

Os resultados da caracterização morfológica permitiram concluir que com exceção da funcionalização com peróxido de hidrogênio, não foram observadas mudanças significativas na morfologia do CB como consequência da funcionalização.

4.1.2 Caracterização por espectroscopia Raman

O efeito da funcionalização sobre o grau de desordem estrutural tem sido estudado para diferentes materiais de carbono utilizando-se a espectroscopia Raman^{72,73}. Na FIGURA 4.3 apresenta-se o espectro Raman do CB não funcionalizado, e se observa a presença da banda G ao redor de 1625 cm⁻¹, relacionada com as vibrações das ligações duplas carbono - carbono (sp²), e a banda D ao redor de 1366 cm⁻¹, relacionada com a presença de desordem e defeitos⁷⁴.

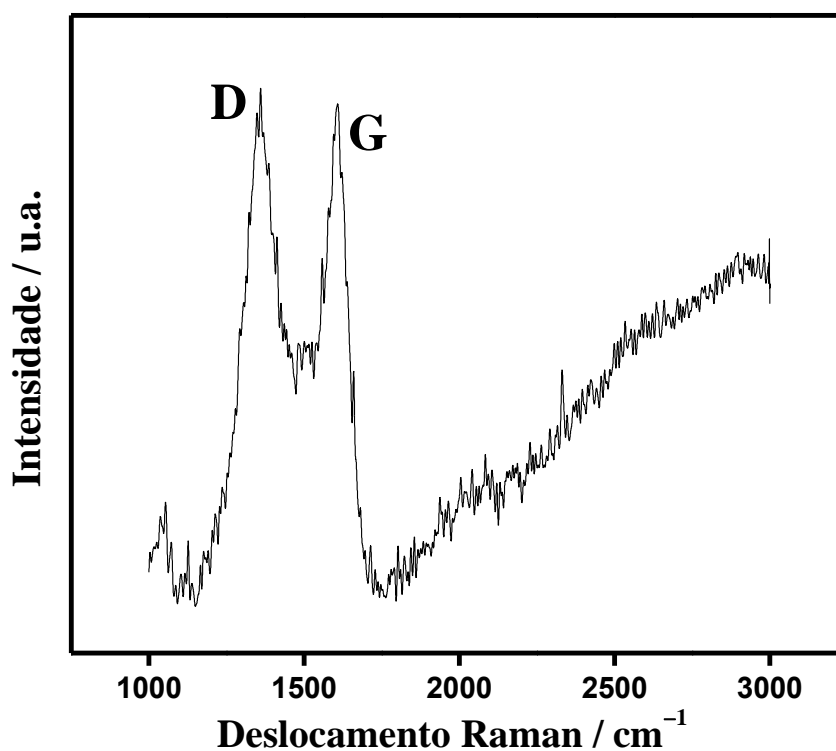


FIGURA 4.3-Espectro Raman do CB não funcionalizado.

A relação entre as áreas das bandas D e G (A_D/A_G) é comumente utilizada como uma estimativa do grau de desordem em materiais de carbono e, é esperado um incremento do valor desta relação como consequência do aumento do número de defeitos no material e a diminuição no tamanho dos cristalitos. Na FIGURA 4.4 são apresentados os espectros Raman de todas as amostras na faixa de 1200 a 1700 cm^{-1} , os valores de A_D/A_G foram calculados como: 1,84; 2,00; 2,18; 2,19; 2,40 e 2,18 para as amostras CB, CB-HNO₃ 2 mol L⁻¹, CB-HNO₃, CB-H₂O₂, CB-HNO₃/ H₂SO₄ 1:1 e CB-HNO₃/H₂SO₄ 3:1, respectivamente.

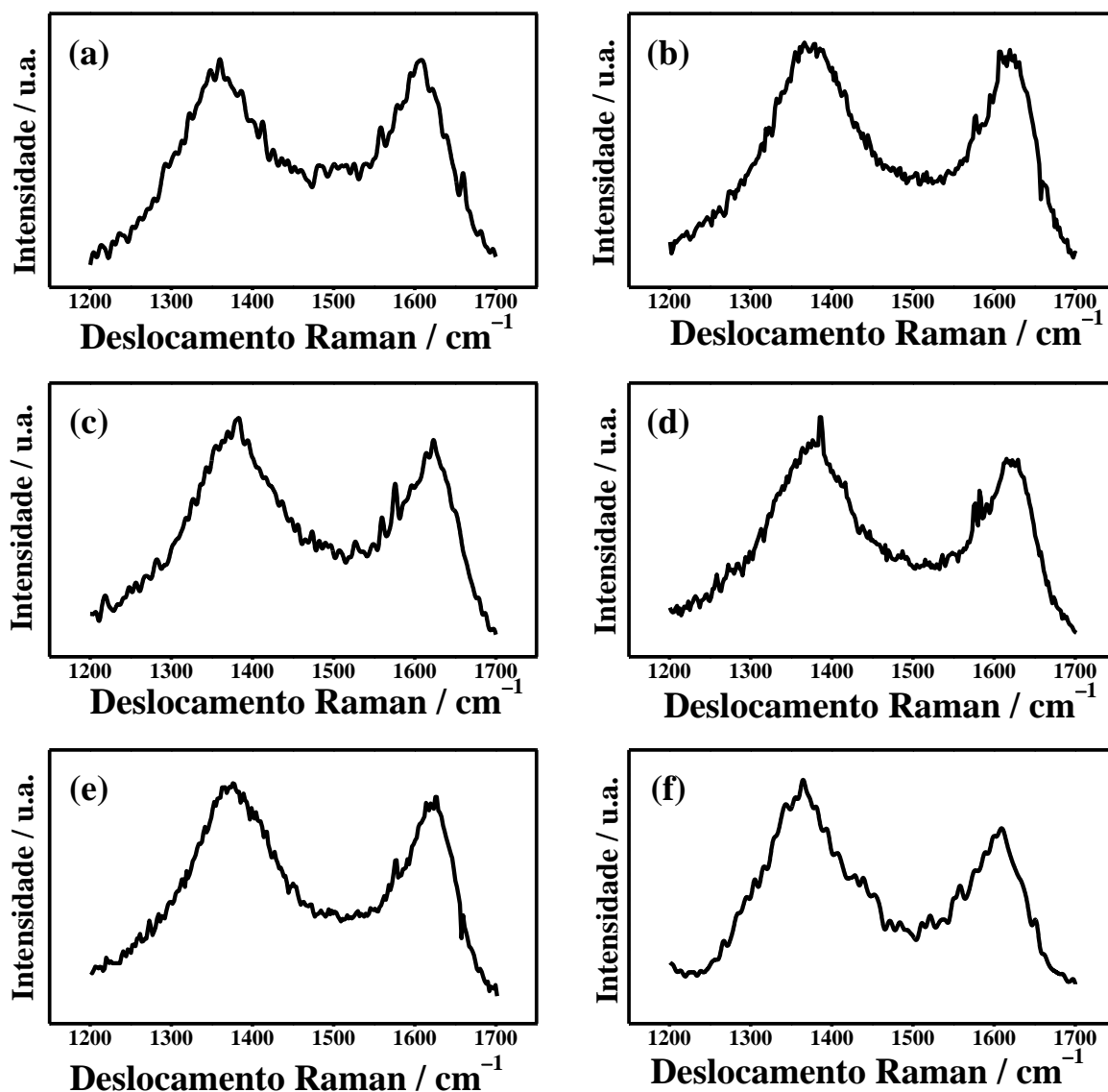
Resultados e Discussão

FIGURA 4.4- Espectros Raman na faixa de 1100-1700 cm⁻¹ das amostras: (a) CB, (b) CB-HNO₃ 2 mol L⁻¹, (c) CB-HNO₃, (d) CB-H₂O₂, (e) CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1 e (f) CB-HNO₃/H₂SO₄ 3:1.

Como era de se esperar, o valor da relação A_D/A_G foi maior para todas as amostras de CB funcionalizado em comparação com o CB sem funcionalização, e este resultado pode ser atribuído ao incremento do número de defeitos no material

Resultados e Discussão

devido à introdução de grupos funcionais oxigenados na borda das camadas de grafeno. Resultados similares têm sido observados para materiais de carbono como nanofibras, nanotubos e grafite⁷².

4.1.3 Estudo de molhabilidade

O efeito da funcionalização do CB sobre a sua hidrofiliabilidade foi estudado a partir de medidas de ângulo de contato com água. Na FIGURA 4.5 são apresentadas as imagens obtidas para as diferentes amostras e os respectivos valores dos ângulos (a média entre os ângulos dos dois extremos). A FIGURA 4.5 (a) corresponde à amostra de CB não funcionalizada, e o valor obtido ($40,1^\circ$) é menor em comparação com os valores encontrados na literatura para outros materiais de carbono sem pré-tratamento⁷⁵. Esse comportamento pode ser devido a introdução de grupos oxigenados durante o processo de fabricação do CB Vulcan na presença de oxigênio (*furnace black*).

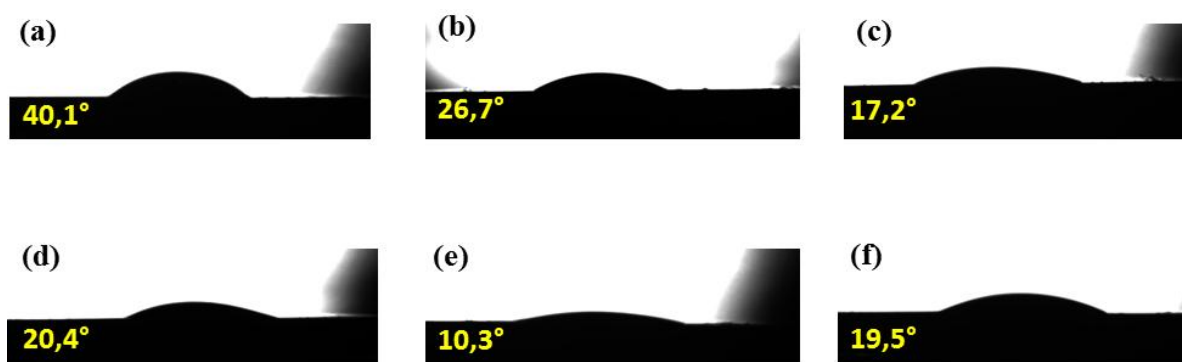


FIGURA 4.5-Ângulo de contato das amostras: (a) CB, (b) CB-HNO₃ 2 mol L⁻¹, (c) CB-HNO₃, (d) CB-H₂O₂, (e) CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1 e (f) CB-HNO₃/H₂SO₄ 3:1.

Foi observado a diminuição nos ângulos de contato das amostras de CB funcionalizado em comparação com o CB não funcionalizado, o que pode ser

Resultados e Discussão

atribuído ao aumento na hidrofiliçidade pela introdução de grupos funcionais polares durante os tratamentos de funcionalização. O caráter hidrofílico das amostras de CB obedeceu a seguinte ordem: CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1 > CB-HNO₃ > CB-HNO₃/H₂SO₄ 3:1 > CB-H₂O₂ > CB-HNO₃ 2 mol L⁻¹ > CB.

4.1.4 Estudo de dispersão

A dispersabilidade do material é uma das propriedades mais importantes a ser levada em consideração na preparação de filmes para modificação de eletrodos. Os grupos funcionais presentes no CB exercem uma grande influência sobre a dispersabilidade deste material e, assim, alguns trabalhos já foram reportados na literatura onde foi avaliado o efeito dos grupos funcionais sobre a dispersibilidade do CB em diferentes meios, principalmente poliméricos^{76,77}.

O efeito da funcionalização sobre a dispersabilidade do CB foi estudado em três solventes diferentes: água, dimetilformamida (DMF) e hexano. São apresentadas na FIGURA 4.6 as imagens das dispersões de CB e CB-HNO₃/H₂SO₄ 3:1 v/v em hexano. Como esperado, observou-se uma diminuição significativa no grau de dispersabilidade como consequência da funcionalização, uma vez que a introdução de grupos funcionais polares sobre a superfície do material diminui a interação desta com um solvente de menor polaridade como o hexano.

Resultados e Discussão

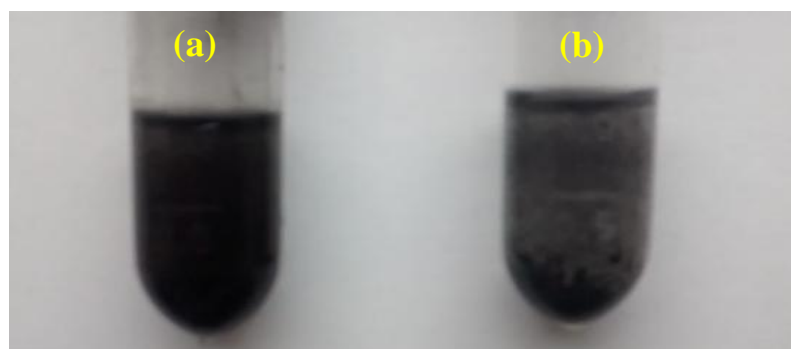


FIGURA 4.6- Dispersões das amostras (a) CB e (b) CB-HNO₃/H₂SO₄ 3:1 em hexano.

Na FIGURA 4.7 são apresentadas as imagens das dispersões das diferentes amostras de CB em água e DMF. Não foram observados efeitos negativos da funcionalização sobre a dispersibilidade nos dois solventes que têm sido mais utilizados na preparação de dispersões de CB para modificação de eletrodos^{66,62}.

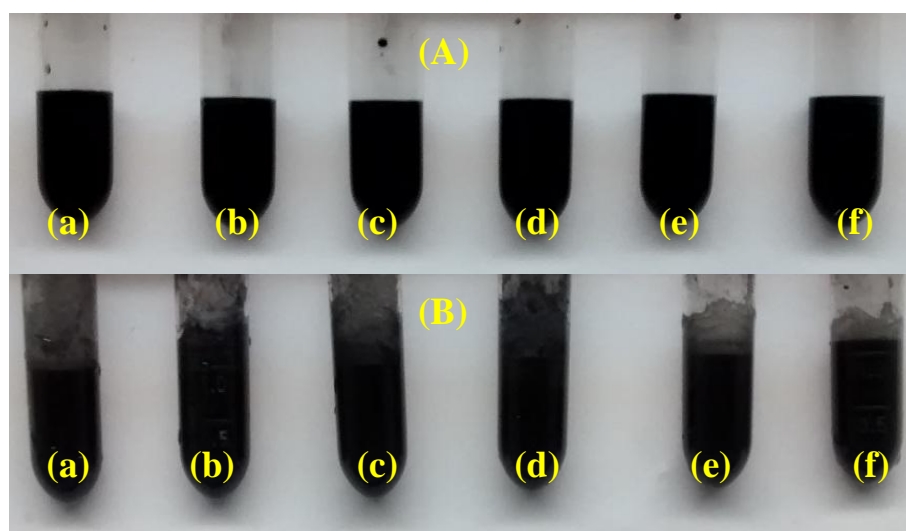


FIGURA 4.7-Dispersões em (A) água e (B) DMF das amostras: (a) CB, (b) CB-HNO₃ 2 mol L⁻¹, (c) CB-HNO₃, (d) CB-H₂O₂, (e) CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1 e (f) CB-HNO₃/H₂SO₄ 3:1.

4.2 Caracterização eletroquímica

A caracterização eletroquímica dos eletrodos foi realizada por voltametria cíclica com a sonda eletroquímica $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$. Na FIGURA 4.8 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para o GCE, o GCE modificado com dispersão de DHP (DHP/GCE) e os eletrodos modificados com as diferentes dispersões de CB, em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Todos os voltamogramas apresentam um par de picos bem definidos, e são observadas diferenças tanto nas intensidades de corrente quanto nas separações dos potenciais de pico anódico e catódico. A maior intensidade de corrente foi obtida para o eletrodo preparado empregando CB modificado com a mistura de ácidos nítrico e sulfúrico 1:1 (v/v) (CB- $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ 1:1-DHP/GCE), seguido por CB- H_2O_2 -DHP/GCE, CB- $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ 3:1-DHP/GCE, CB- HNO_3 -DHP/GCE, CB-DHP/GCE e, finalmente, CB- HNO_3 2 mol L^{-1} . Observou-se um incremento nas correntes de pico como consequência da funcionalização do CB, com exceção do eletrodo CB- HNO_3 2 mol L^{-1} , que acarretou uma diminuição das correntes de pico.

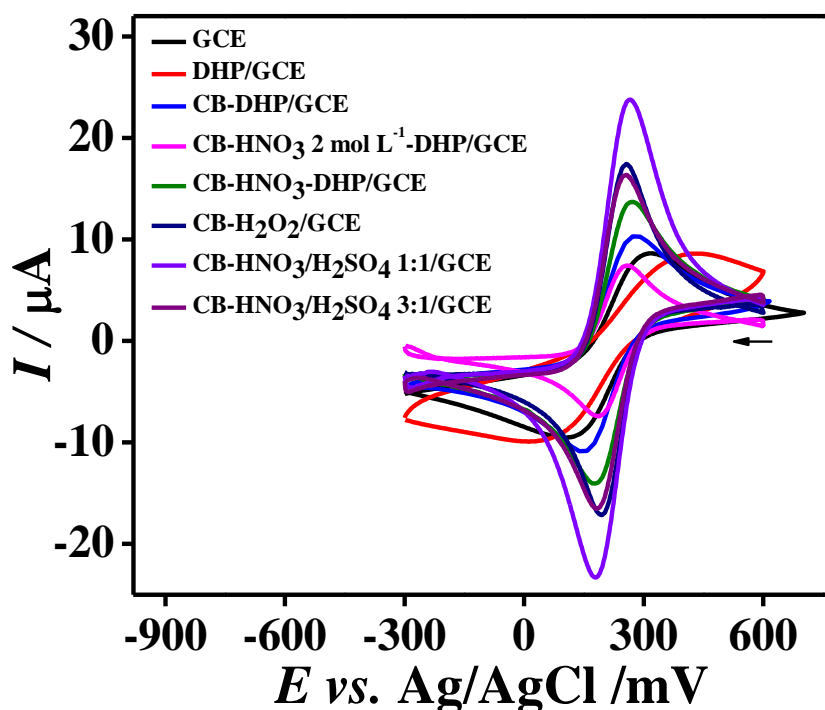
Resultados e Discussão

FIGURA 4.8-Voltamogramas cíclicos dos diferentes eletrodos modificados com CB, obtidos para a solução de $K_3Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Os potenciais de pico anódico e catódico e os valores de ΔE_p (separação entre os potenciais de pico anódico e catódico) obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos da FIGURA 4.8 são apresentados na TABELA 4.1. Para o eletrodo DHP/GCE foi observado um aumento no valor de ΔE_p em comparação com o GCE, o que sugere que o DHP bloqueia a superfície do eletrodo diminuindo a velocidade de transferência de elétrons.

Para todos os eletrodos modificados com CB foi observada a diminuição no valor de ΔE_p em comparação com o GCE, sugerindo o incremento na velocidade de transferência de elétrons⁷⁸ com a introdução do CB. Além disso, obtiveram-se valores menores de ΔE_p para todos os eletrodos de CB funcionalizados em comparação com o eletrodo preparado com CB sem tratamento,

Resultados e Discussão

mostrando-se a melhora na transferência de elétrons entre o hexacianoferrato (III) de potássio e os eletrodos como consequência da funcionalização do CB.

TABELA 4.1- Comparação dos resultados da voltametria cíclica obtidos para diferentes eletrodos para uma solução de $K_3Fe(CN)_6$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$

Eletrodo	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	ΔE_p (mV)	I_{pa} (μA)
GCE	318,8	103,1	215,7	8,519
DHP/GCE	419,2	32,86	386,3	8,526
CB–DHP/GCE	278,8	147,6	131,1	10,26
CB–HNO ₃ 2 mol L ⁻¹ – DHP/GCE	258,9	184,9	101,0	7,205
CB–HNO ₃ –DHP/GCE	267,2	180,7	96,50	13,32
CB–H ₂ O ₂ –DHP/GCE	255,0	196,0	59,00	17,04
CB–HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 1:1– DHP/GCE	265,3	180,0	85,30	23,81
CB–HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 3:1– DHP/GCE	255,0	184,0	71,00	15,95

Estudos de voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura foram desenvolvidos para avaliar o comportamento das correntes de pico em função da velocidade de varredura. Na FIGURA 4.9 apresentam-se os voltamogramas registrados para os eletrodos (a) CB–DHP/GCE e (b) CB–HNO₃ /H₂SO₄ 1:1–DHP/GCE em solução $K_3Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os gráficos inseridos correspondem ao comportamento das correntes de pico

Resultados e Discussão

em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($v^{1/2}$) e o $\log -I_{pc}$ vs. $\log v$.

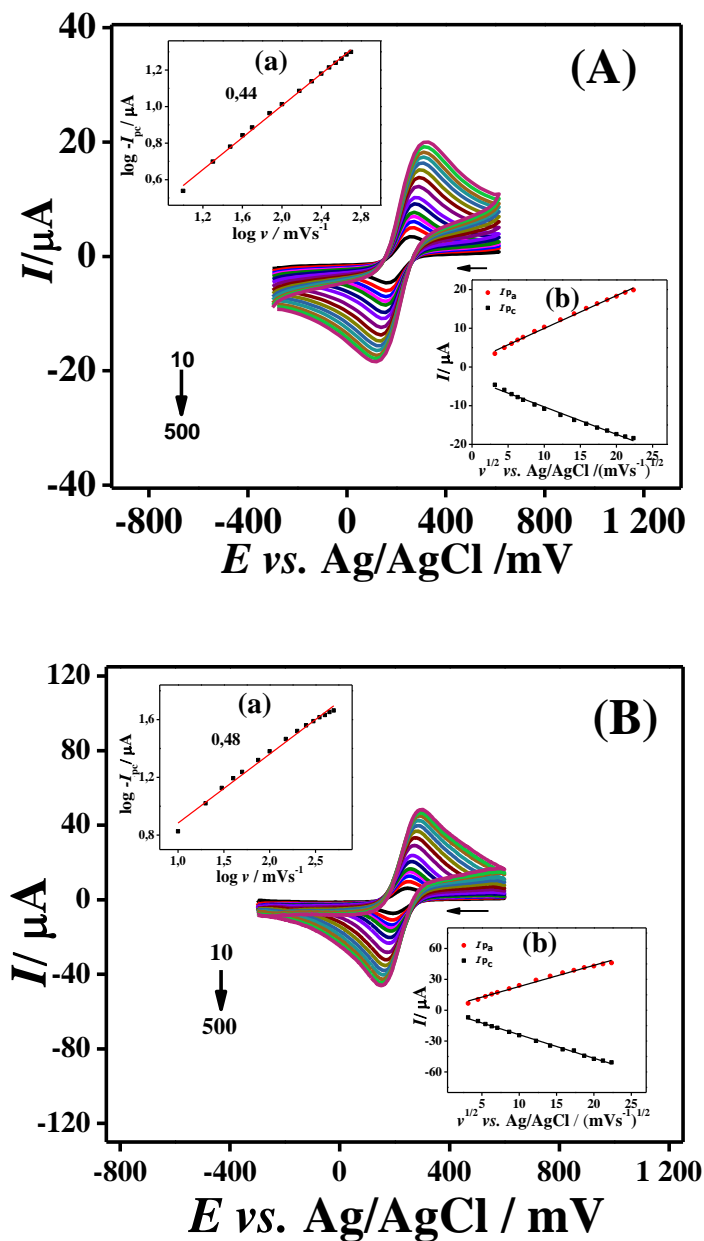


FIGURA 4.9. Estudo da velocidade de varredura de potenciais empregando-se os eletrodos (A) CB-DHP/GCE e (B) CB-HNO₃-H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE, obtidos em solução de K₃Fe(CN)₆ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹, $v = 10 - 500$ mV s⁻¹. Gráficos inseridos (a) $\log I_{pc}$ vs. $\log v$ e (b) I_p vs. $v^{1/2}$.

Resultados e Discussão

Para todos os eletrodos foram observadas relações lineares entre I_p e $v^{1/2}$ e todos os coeficientes angulares das retas de linearização dos gráficos $\log I_{pc}$ vs. $\log v$ estiveram próximos ao valor teórico de 0,5 para os processos controlados por difusão. Conhecendo-se o controle difusional, foram estimadas as áreas eletroativas dos eletrodos, empregando-se a equação de Randles-Sevcik para sistemas controlados por difusão (Equação 3).

$$I_p = \pm (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Eq.3}$$

Sendo I_p a corrente de pico anódico ou catódico, n o número de elétrons envolvidos no processo, A (cm^2) área eletroativa do eletrodo, D ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) o coeficiente de difusão da espécie, C (mol cm^{-3}) a concentração do analito e v (V s^{-1}) a velocidade de varredura. Considerando $n = 1$, $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ e $C = 1,0 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$. Na TABELA 4.2 apresentam-se os valores dos coeficientes angulares dos gráficos de I_{pc} vs. $v^{1/2}$ e os valores estimados das áreas eletroativas.

Na maioria dos casos foram obtidos aumentos na área eletroativa como consequência da funcionalização do CB. O eletrodo CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE apresentou a maior área eletroativa (0,0926 cm^2), cerca de três vezes maior do que a obtida para o CB-DHP/GCE. Os resultados sugerem uma vantagem do uso do eletrodo CB modificado com ácido nítrico e sulfúrico na razão 1:1 v/v sobre os outros eletrodos em termos de sinal analítico.

Resultados e Discussão

TABELA 4.2- Resultados do estudo de velocidade de varredura de potenciais dos diferentes eletrodos em solução de $K_3Fe(CN)_6$ 1 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e valores de área eletroativa (média das áreas eletroativas obtidas pelas curva de corrente de pico anódica e catódica)

Eletrodo	Coefficiente angular ($A/(Vs^1)^{1/2}$)	Área eletroativa (cm^2)
GCE	$2,37 \times 10^{-5}$	0,0289
CB-DHP/GCE	$2,68 \times 10^{-5}$	0,0322
CB-HNO ₃ 2 mol L^{-1} -DHP/GCE	$2,04 \times 10^{-5}$	0,0288
CB-HNO ₃ -DHP/GCE	$3,42 \times 10^{-5}$	0,0478
CB-H ₂ O ₂ -DHP/GCE	$6,28 \times 10^{-5}$	0,0837
CB-HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 1:1-DHP/GCE	$6,51 \times 10^{-5}$	0,0926
CB-HNO ₃ /H ₂ SO ₄ 3:1-DHP/GCE	$4,78 \times 10^{-5}$	0,0667

A partir dos resultados da caracterização eletroquímica pode ser observado que há um grande efeito da funcionalização do CB sobre as propriedades eletroquímicas frente à sonda $Fe(CN)_6^{4-/3-}$, a qual é consideravelmente sensível aos defeitos e grupos funcionais na superfície dos eletrodos⁷⁴. Resultados similares foram observados por FRYSZ e CHUNG⁶⁹ em 1997 e por ARDUINI *et al.*⁶¹ em 2010 para os CB *acetylene black* e N220, respectivamente, e foram atribuídos à introdução de grupos oxigenados na superfície do CB.

4.3 Aplicações eletroanalíticas dos eletrodos de CB funcionalizados

A resposta dos diferentes eletrodos frente a quatro analitos de interesse (paracetamol, dopamina, hidroquinona e catecol) foi avaliada por voltametria cíclica em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Na FIGURA 4.10 estão

Resultados e Discussão

apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para (a) paracetamol, (b) dopamina, (c) hidroquinona e (d) catecol.

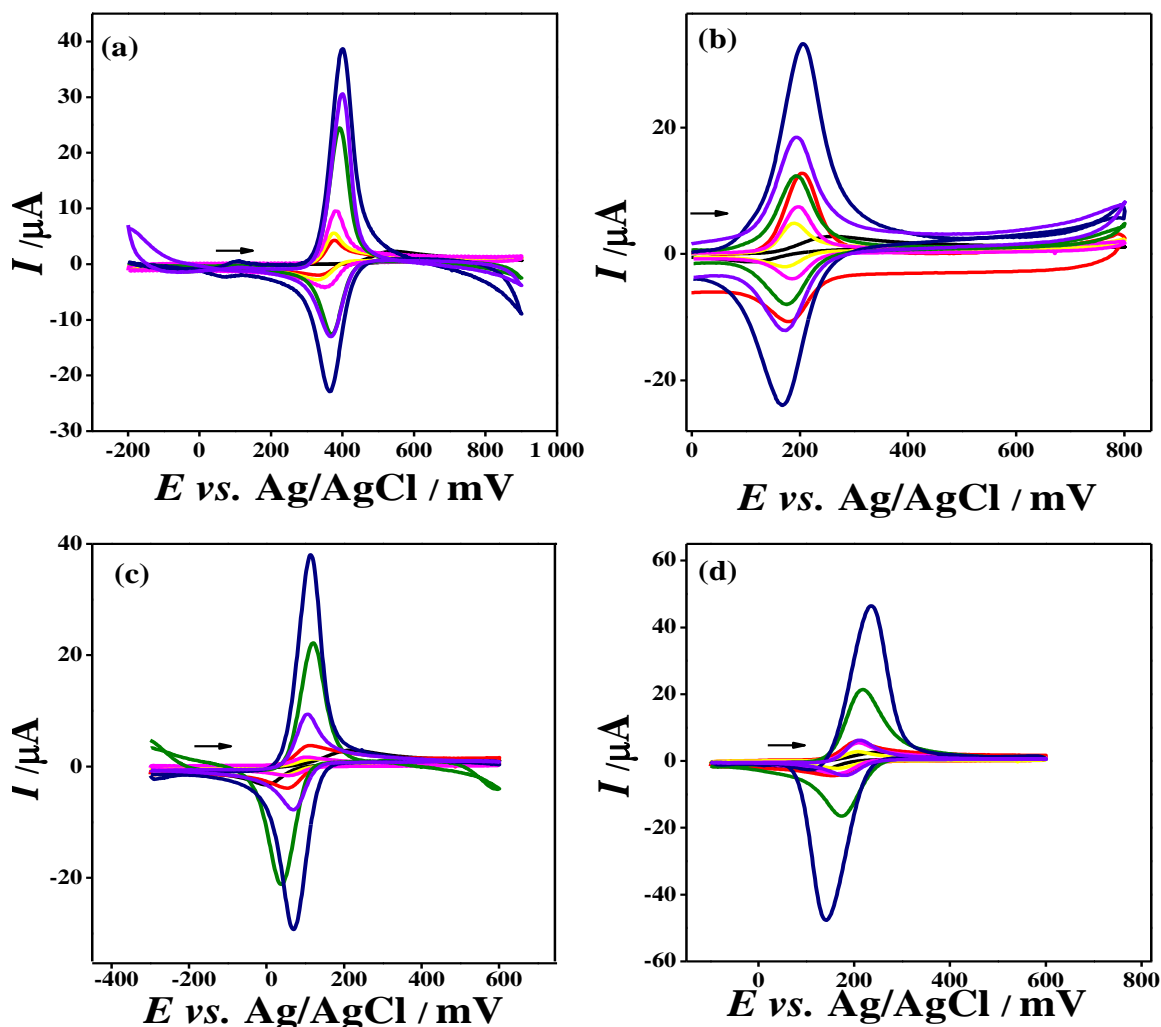


FIGURA 4.10- Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se os eletrodos: (—) GCE, (—) CB-DHP/GCE, (—) CB-HNO₃ 2 mol L⁻¹, (—) CB-HNO₃, (—) CB-H₂O₂-DHP/GCE, (—) CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE e (—) CB-HNO₃/H₂SO₄ 3:1-DHP/GCE em solução 1,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ de (a) paracetamol, (b) dopamina, (c) hidroquinona e (d) catecol em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Resultados e Discussão

Foram observadas melhoras na resposta voltamétrica dos analitos (em termos de separação dos potenciais de pico e sinal de corrente) como consequência da funcionalização do CB na maioria dos casos. Se observou um efeito da natureza do analito no comportamento nos diferentes eletrodos. As respostas obtidas para catecol e hidroquinona foram semelhantes entre si e diferentes do comportamento observado para paracetamol e dopamina. Isto pode ser atribuído à existência de interações entre as moléculas avaliadas e os grupos funcionais, os quais podem mudar dependendo do tratamento de funcionalização. Como era esperado, o maior sinal analítico em todos os casos foi obtido empregando-se o CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1 v/v-DHP/GCE e assim esse eletrodo foi selecionado para estudos posteriores. Os resultados obtidos podem ser atribuídos à maior hidrofiliabilidade e maior área eletroativa observadas para este eletrodo.

A resposta dos eletrodos GCE, CB-DHP e CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE frente à adição de diferentes concentrações de dopamina em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) foi avaliada empregando-se voltametria cíclica. Na FIGURA 4.11 apresentam-se a resposta voltamétrica dos três eletrodos em solução de dopamina 1,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ e as curvas analíticas correspondentes. As sensibilidades das curvas analíticas (método voltamétrico) foram 0,334; 3,65; e 6,54 A cm⁻² mol⁻¹ L para os eletrodos GCE, CB-DHP e CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE, respectivamente. Esses resultados mostram um aumento significativo na sensibilidade como consequência da funcionalização do CB (1,8 vezes maior), sugerindo uma vantagem sobre o uso do material sem modificação para aplicações eletroanalítica. Sendo assim, o CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE foi selecionado como eletrodo para o desenvolvimento do biossensor.

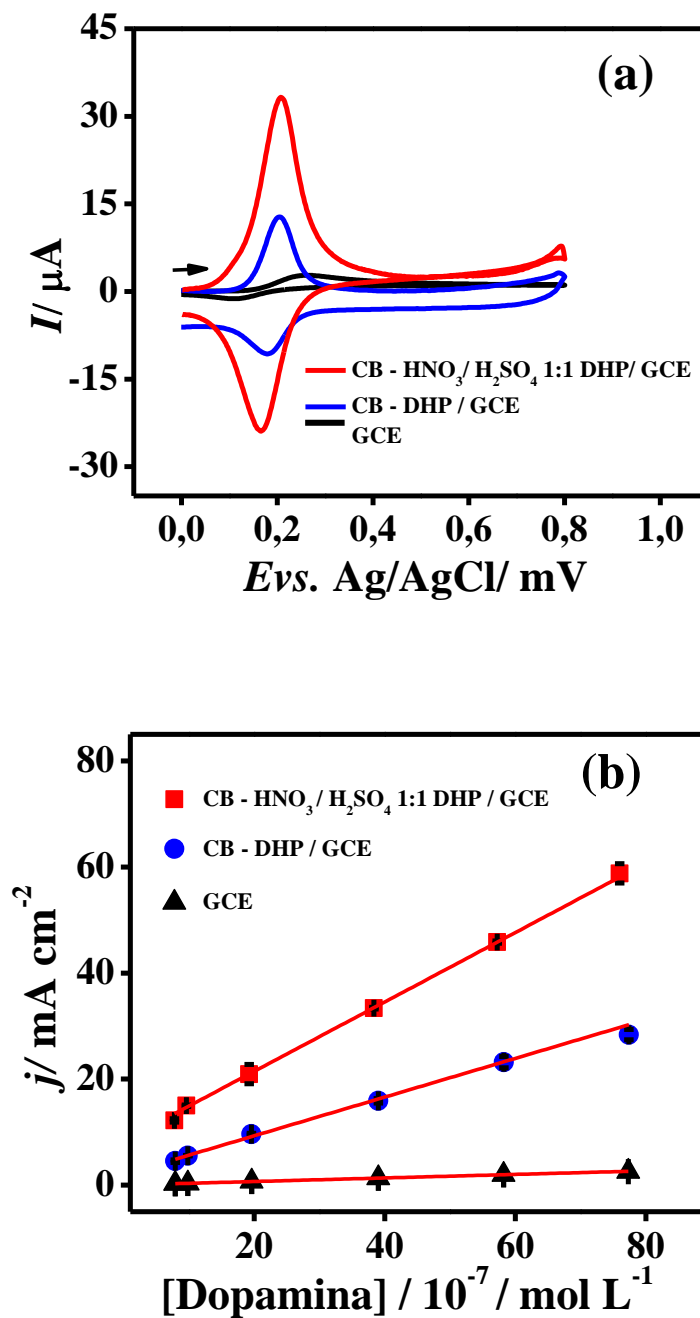


FIGURA 4.11- (a) Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se GCE, CB-DHP/GCE e CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE em solução de dopamina $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0; $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (b) Curvas de calibração após diferentes concentrações de dopamina.

4.4 Estudos da resposta eletroquímica do catecol

A enzima Tyr foi imobilizada sobre a superfície do eletrodo CB–HNO₃/H₂SO₄ 1:1–DHP/GCE utilizando-se o método das ligações covalentes cruzadas com glutaraldeído e BSA. O glutaraldeído foi empregado para promover ligações covalentes entre os grupos amino da Tyr e a BSA. Na FIGURA 4.12 são apresentados os voltamogramas cíclicos do biossensor Tyr–CB–HNO₃/H₂SO₄ 1:1–DHP/GCE e do biossensor construído com CB não funcionalizado (Tyr–CB–DHP/GCE) obtidos em solução de catecol $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em solução de tampão fosfato 0,075 mol L⁻¹, pH 7,5.

A enzima imobilizada na superfície do eletrodo catalisa a oxidação de catecol para *o*-quinona. A *o*-quinona produzida na reação enzimática é reduzida eletroquimicamente a catecol na superfície do eletrodo ⁷⁹ aumentando o sinal de corrente de redução para ambos os casos. Pode-se observar que o melhor desempenho em termos de intensidade do sinal de corrente de redução foi obtido para o biossensor construído com CB funcionalizado. A corrente de pico catódica aumentou de $-10,5 \mu\text{A}$ no Tyr–CB–DHP/GCE para $-15,6 \mu\text{A}$ no caso do Tyr–CB–HNO₃/H₂SO₄ 1:1–DHP/GCE. Este comportamento pode ser atribuído à maior área superficial e maior hidrofiliabilidade do CB funcionalizado.

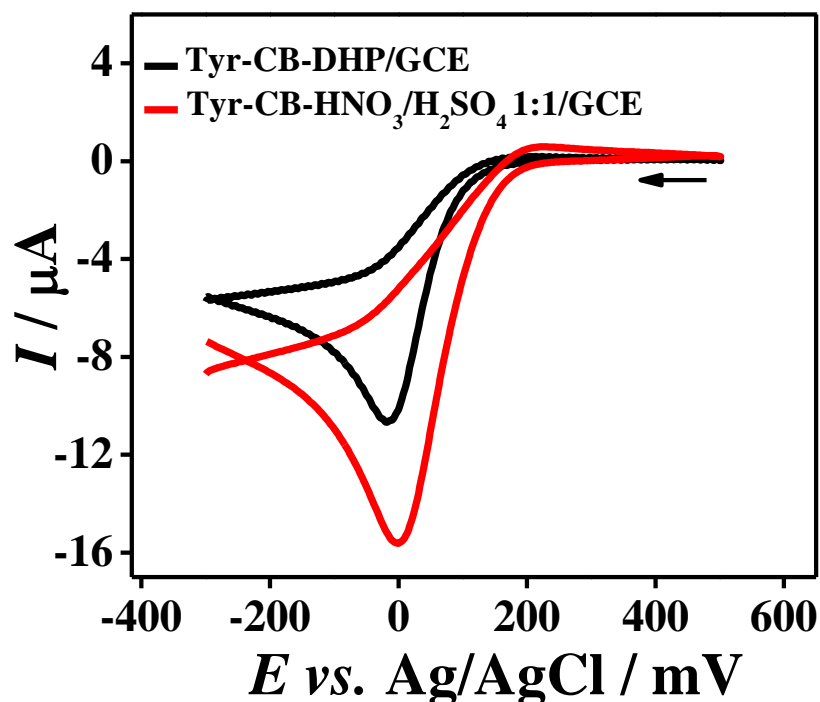


FIGURA 4.12-Voltamogramas cíclicos dos eletrodos contendo tirosinase (biossensores) em solução de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato pH 7,5; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

4.4.1 Estudo do efeito da velocidade de varredura de potencial

O efeito da velocidade de varredura de potencial na resposta eletroquímica do catecol para o biossensor Tyr-CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE foi avaliado em tampão fosfato $0,075 \text{ mol L}^{-1}$. Na FIGURA 4.13, são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (10 até 200 mV s^{-1}), a partir dos quais é possível se verificar o aumento das correntes de pico anódico e catódico e da separação dos potenciais de pico com o aumento da velocidade de varredura. As correntes de pico apresentaram uma dependência linear com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($v^{1/2}$) indicando

Resultados e Discussão

que o processo redox foi controlado pela difusão do catecol até a superfície do eletrodo. Trabalhos anteriores reportaram uma resposta similar do catecol frente à biossensores de Tyr⁸⁰.

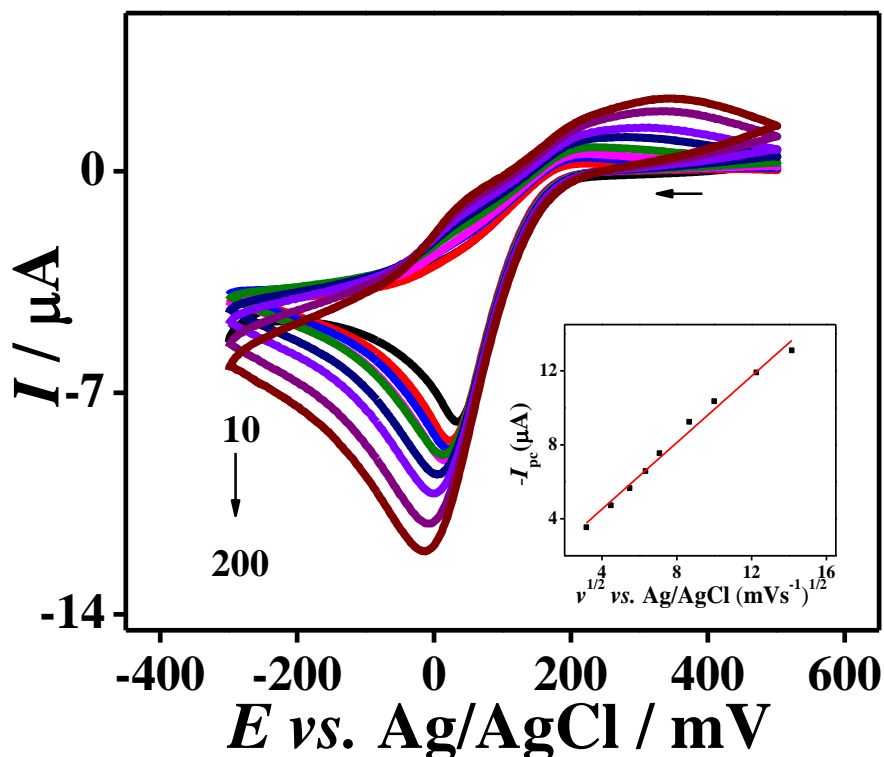


FIGURA 4.13-Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial ($10\text{--}200 \text{ mV s}^{-1}$) para o eletrodo Tyr-CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE em solução de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5. Gráfico inserido $-I_{pc}$ vs. $v^{1/2}$.

4.4.2 Efeito do pH e da concentração do eletrólito suporte

A atividade catalítica das enzimas é fortemente dependente do pH do meio e, portanto, a influência do pH na redução de catecol utilizando-se biossensor proposto foi avaliada para valores de pH entre 5,5 e 8,0. Para este estudo foi

Resultados e Discussão

empregada a voltametria cíclica e solução de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas cíclicos registrados são apresentados na FIGURA 4.14. A faixa de pH estudada foi escolhida considerando-se trabalhos prévios na literatura sobre a atividade da enzima tirosinase⁸¹. No gráfico inserido da FIGURA 4.14 apresenta-se o comportamento da corrente de pico catódico em função do pH, e observou-se que a corrente atingiu seu valor máximo em $\text{pH} = 7,5$ e, portanto, este pH foi selecionado para os estudos posteriores.

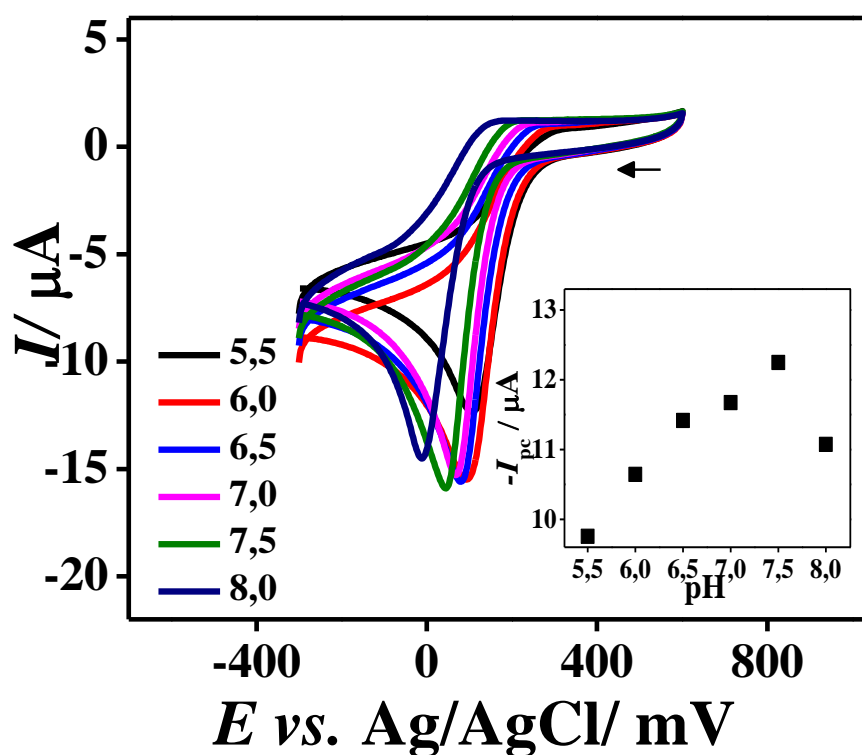


FIGURA 4.14-Voltamogramas cíclicos obtidos para o Tyr-CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE em solução de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH variando no intervalo 5,5 – 8,0. Gráfico inserido $-I_{pc}$ vs. pH.

A influência da concentração do tampão fosfato na redução de catecol foi avaliada no intervalo entre $0,010$ e $0,15 \text{ mol L}^{-1}$. Na FIGURA 4.15 observa-se o

Resultados e Discussão

aumento da corrente com o aumento da concentração de tampão fosfato até 0,075 mol L⁻¹, e após essa concentração foi observado uma diminuição do sinal analítico. Este resultado tem sido observado para biossensores de tirosinase e é atribuído à inibição da enzima na presença de concentrações altas de fosfato¹⁴. Portanto, a solução de tampão fosfato pH 7,5; 0,075 mol L⁻¹ foi selecionada como eletrólito suporte para estudos posteriores.

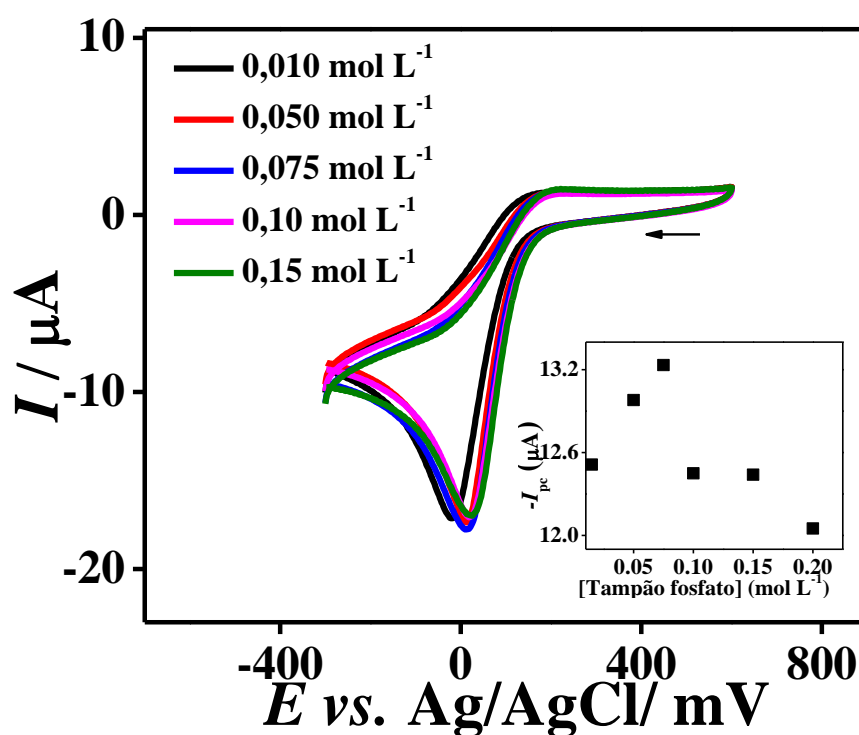


FIGURA 4.15-Voltamogramas cíclicos obtidos para o Tyr-CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE em solução de catecol 1,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ em tampão fosfato pH 7,5 com concentração variando no intervalo 0,01 – 0,15 mol L⁻¹. Gráfico inserido -I_{pc} vs. concentração de tampão fosfato.

4.4.3 Otimização do potencial de trabalho

O efeito do potencial de trabalho empregado nas medidas amperométricas sobre a intensidade do sinal de corrente foi estudado na faixa de $-0,30$ V a $+0,10$ V em solução de catecol $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato $0,075$ mol L⁻¹ (pH 7,5) e velocidade de agitação de 450 rpm. Na FIGURA 4.16 é apresentado o comportamento da corrente catódica em função do potencial de trabalho aplicado. Observou-se o aumento da corrente a partir de potenciais mais negativos até $-0,20$ V, e a partir deste valor de potencial houve uma diminuição na corrente. Considerando estes resultados, para a construção da curva analítica o potencial de trabalho selecionado foi igual a $-0,20$ V.

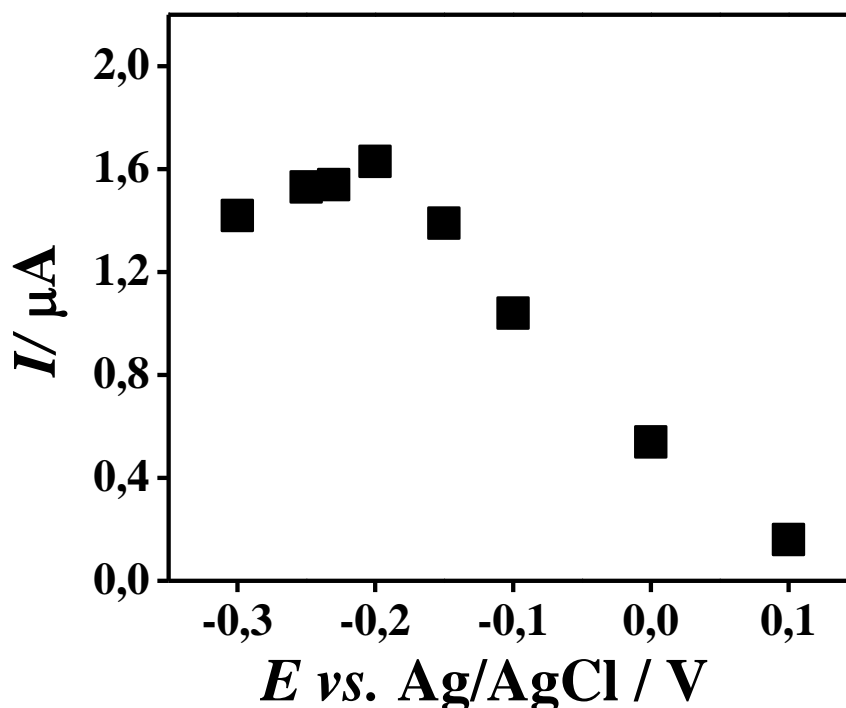


FIGURA 4.16-Influência do potencial de trabalho sobre a redução de catecol. Estudos realizados em solução de catecol $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato $0,075$ mol L⁻¹ (pH 7,5). Velocidade de agitação de 450 rpm.

4.5 Determinação amperométrica de catecol

Uma vez encontradas as melhores condições experimentais, foi construída uma curva analítica para a determinação de catecol empregando-se amperometria. Na FIGURA 4.17 é apresentado o amperograma obtido para a adição de diferentes concentrações de catecol, e os gráficos inseridos correspondem a magnitude de corrente em função da concentração de catecol e à respectiva curva analítica. A equação que representa a curva analítica é: $\Delta I_p (\mu\text{A}) = -0,21 + 5,39 \times 10^5 [\text{catecol}]$ (mol L^{-1}). O limite de detecção (calculado como sendo três vezes o desvio padrão do branco ($n = 10$) dividido pela sensibilidade, ou seja, o coeficiente angular da curva analítica) foi calculado como $8,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

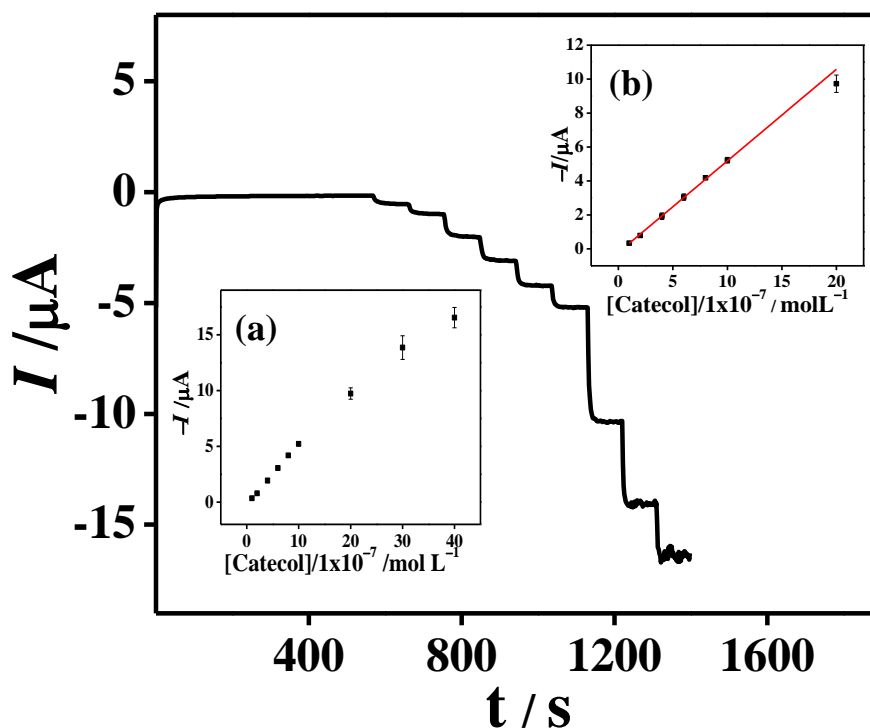


FIGURA 4.17-Amperograma obtido para adição de diferentes concentrações de catecol em tampão fosfato $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), potencial aplicado $-0,2\text{V}$ e velocidade de agitação 450 rpm. Gráficos inseridos: (a) resposta da corrente em função da concentração de catecol e (b) curva analítica.

Resultados e Discussão

Na TABELA 4.3 é apresentada uma comparação entre os parâmetros analíticos obtidos para o biossensor de Tyr e CB funcionalizado e os encontrados na literatura para diversos biossensores contendo a Tyr na determinação de catecol. Se observa que o biossensor Tyr–CB–HNO₃/H₂SO₄ 1:1– DHP/GCE apresentou um menor limite de detecção e maior sensibilidade analítica em relação aos obtidos pela maioria dos biossensores reportados ^{79,81,82,83,84}, nos quais são utilizados materiais mais custosos (como nanotubos de carbono) e arquiteturas mais complexas.

Resultados e Discussão

TABELA 4.3- Comparação dos parâmetros analíticos para diferentes biossensores de tirosinase

Biossensor	Intervalo linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade ($\text{mA mol}^{-1} \text{L}$)	Referência
Nafion–Tyr–ZnO/GCE	10–1000	4,0	2,14	82
Tyr–MWCNT–PPy/GCE	3,0–50	0,67	8,0	83
Tyr–IL–MWCNT–DHP/GCE	4,9–1100	0,58	32,8	81
Tyr/MWCNTs/AuNPs/AEP/Au	1,0 – 500	0,80	150	84
Tyr–Nafion–MWCNT/GCE	1–23	0,22	346	79
Tyr–CB–HNO₃/H₂SO₄ DHP/GCE	1:1– 1–20	0,087	539	Este trabalho
Tyr–PAMAN–GO–CMC/GCE	0,002–0,4	0,00090	630	85
Tyr–MWCNT–ZnO–Nafion/GCE	0,03–32	0,030	1890	86

MWCNT: nanotubos de carbono de paredes múltiplas; PPy: polipirrol; IL: líquido iônico; AuNPs: nanopartículas de ouro; AEP: Acetona extraída de própolis; Au: eletrodo de ouro; PAMAN: poliamidoamina, GO: óxido de grafeno, CMC: carboximetilcelulose. Estudo do comportamento cinético do catecol sobre o biossensor de Tyr.

Resultados e Discussão

O comportamento cinético do catecol na superfície do biossensor Tyr–CB–HNO₃ /H₂SO₄ 1:1–DHP/GCE foi estudado a partir dos valores da constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}), a qual corresponde à constante de velocidade da dissociação do complexo enzima-substrato e é uma estimativa da afinidade da enzima pelo substrato. O valor de K_M^{app} foi estimado utilizando-se a equação de Lineweaver-Burck (Eq. 4).

$$\frac{1}{I_s} = \frac{1}{I_{\text{max}}} + \frac{K_M^{\text{app}}}{I_{\text{max}}} \times \frac{1}{[\text{Catecol}]} \quad \text{Eq. 4}$$

sendo I_s a corrente no estado estacionário medida para o produto da reação enzimática e I_{max} a corrente máxima do sistema obtida para condições de saturação da enzima.

Na FIGURA 4.18 é apresentado o gráfico de Lineweaver-Burck para o biossensor Tyr–CB–HNO₃ /H₂SO₄ 1:1–DHP/GCE. A reta obtida segue a equação: $1/I_s (\mu\text{A}^{-1}) = 0,0095 + 1,87 \times 10^{-6} /[\text{catecol}] (\text{mol L}^{-1})$ (coeficiente de correlação 0,999). O valor de K_M^{app} obtido a partir destes resultados foi igual a $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

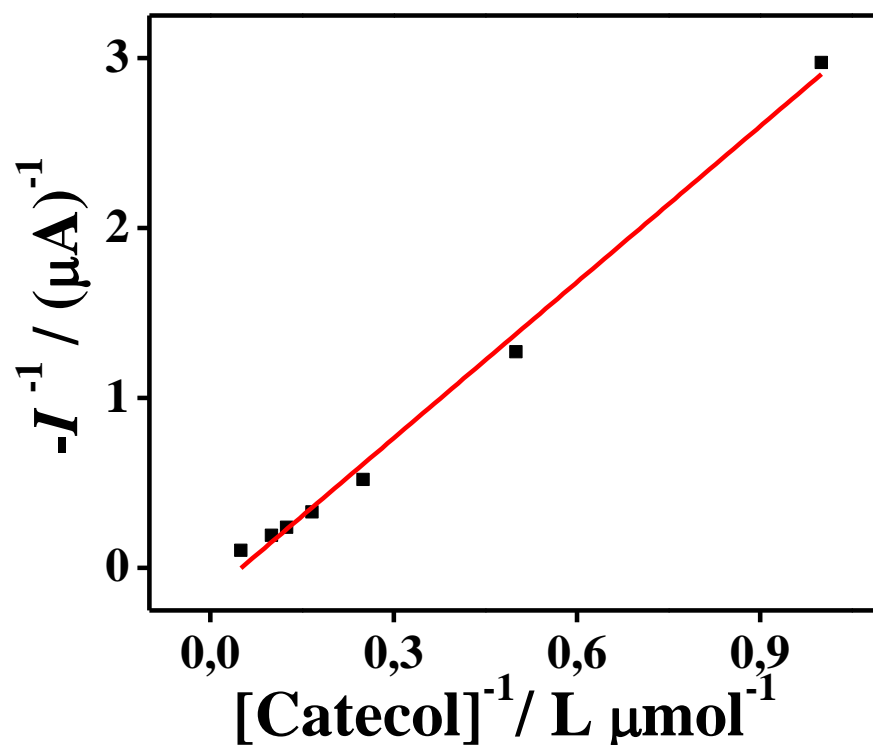


FIGURA 4.18-Gráfico de Lineweaver-Burck obtido para o biossensor Tyr-CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE a partir de medidas de amperometria para diferentes concentrações de catecol em tampão fosfato 0,075 mol L⁻¹ (pH 7,5), potencial aplicado -0,2V e velocidade de agitação 450 rpm.

Na TABELA 4.4 apresenta-se os valores de K_M^{app} encontrados na literatura para diferentes biossensores de Tyr. Para o biossensor Tyr-CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE foi obtido um valor de K_M^{app} menor do que o obtido para a Tyr livre⁸⁷, e para a enzima imobilizada em diferentes superfícies como nanotubos de carbono⁸¹ e nanopartículas de óxido de zinco⁸². Estes resultados indicam uma grande afinidade da enzima imobilizada no eletrodo de CB funcionalizado pelo catecol.

Resultados e DiscussãoTABELA 4.4-Valores de K_M^{app} para diferentes biossensores de Tyr

Biossensor	K_M^{app} (mol L ⁻¹)	Referência
Tyr-PPy/Pt	$1,0 \times 10^{-1}$	88
Tyr livre	$4,0 \times 10^{-3}$	87
Nafion-Tyr-ZnO/GCE	$1,7 \times 10^{-3}$	82
Tyr-IL-MWCNT-DHP/GCE	$1,9 \times 10^{-4}$	81
Tyr-Nafion-MWCNT/GCE	$2,6 \times 10^{-5}$	79
Tyr-CB-HNO₃/H₂SO₄ DHP/GCE 1:1-	$2,0 \times 10^{-5}$	Este trabalho
Tyr-MWCNT-ZnO-Nafion/GCE	$2,0 \times 10^{-5}$	86
Tyr-PAMAN-GO-CMC/GCE	$7,2 \times 10^{-6}$	85

4.5.1 Estudo da estabilidade do biossensor

Com o objetivo de avaliar a estabilidade do biossensor Tyr-CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE, foram realizados estudos de repetibilidade intra-dia ($n = 5$) e inter-dias ($n = 3$) a partir do monitoramento do sinal de corrente para uma concentração de catecol de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em solução de tampão fosfato 0,075 mol L⁻¹ (pH 7,5). Foram obtidos valores da porcentagem de desvio padrão relativo (% RSD) de 3,3% e 3,8% para os estudos intra e inter-dias, respectivamente, o que sugere uma boa estabilidade da resposta do biossensor proposto. Os estudos de repetibilidade inter-dias foram realizados utilizando-se um biossensor novo em cada dia. Os resultados obtidos nesse estudo mostram uma boa reprodutibilidade da preparação do dispositivo.

4.5.2 Estudo de interferentes

O efeito de alguns possíveis interferentes na determinação de catecol em amostras de águas naturais foi estudado por amperometria em solução de catecol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) na presença dos possíveis interferentes em potencial na concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados da comparação das correntes na ausência e na presença dos compostos concomitantes (KCl, MgCl_2 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e Na_2CO_3) mostraram uma variação inferior à 4,63% indicando a ausência de interferência significativa.

4.5.3 Aplicação do biossensor proposto na determinação de catecol em amostras de águas naturais e de torneira

A aplicabilidade do biossensor Tyr-CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE proposto na determinação de catecol em amostras de água foi avaliada a partir de estudos de adição e recuperação do analito. Para isto, alíquotas de 920 µL de água natural e 920 µL de água de torneira foram fortificadas com catecol, e 100 µL de cada alíquota foram adicionados na célula contendo 10 mL de solução de tampão fosfato $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) para obter uma concentração de catecol de $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Foram obtidos porcentagens de recuperação de 106 % e 94,8% para as amostras de água natural e água de torneira, respectivamente. Desta forma, mostrou-se que não houve interferência significativa das matrizes de cada amostra sobre a determinação de catecol utilizando o biossensor proposto.

4.6 Comportamento do biossensor de Tyr frente à adição de benzoato de sódio: determinação por inibição enzimática de benzoato de sódio

A resposta voltamétrica do biossensor Tyr–CB–HNO₃ /H₂SO₄ 1:1–DHP/GCE para soluções de benzoato de sódio (NaBz) em concentrações crescentes em uma solução de catecol foi estudada utilizando-se amperometria. Na FIGURA 4.19 apresenta-se o amperograma obtido para a adição de diferentes concentrações de NaBz entre $4,9 \times 10^{-7}$ e $9,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em solução de catecol $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,075 mol L⁻¹ (pH 7,5). A adição da solução de catecol no eletrólito suporte causa um aumento da corrente catódica de redução da *o*-quinona formada na reação do catecol com oxigênio catalisada pela enzima imobilizada no biossensor. À medida que vai sendo adicionada concentrações crescentes de solução de NaBz, a atividade dessa enzima diminui e, conseqüentemente, a concentração de *o*-quinona gerada na reação enzimática diminui, decrescendo assim o sinal analítico, como mostrado na figura. Assim, o NaBz inibi a atividade catalítica da enzima Tyr proporcionalmente a sua concentração, sendo desta forma determinado.

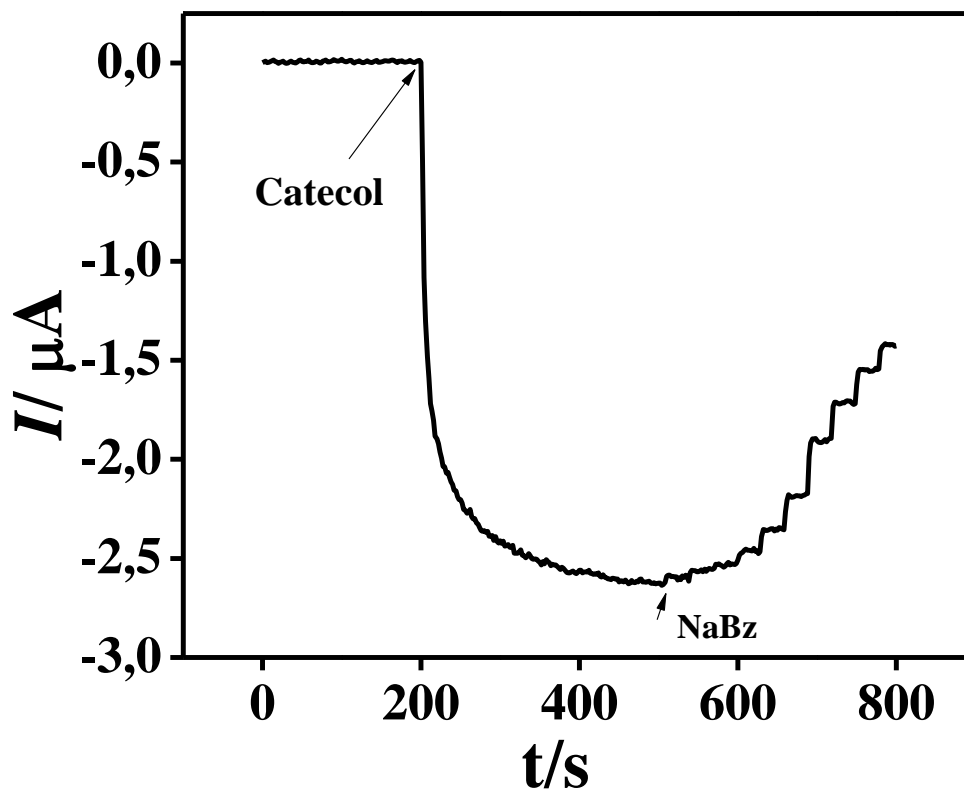


FIGURA 4.19- Amperograma obtido para a adição de diferentes concentrações de NaBz em solução catecol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), potencial aplicado $-0,2\text{V}$, velocidade de agitação 450 rpm. Concentrações de NaBz entre $4,9 \times 10^{-7}$ e $9,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

4.6.1 Estudo do efeito da concentração de catecol e da enzima na determinação de benzoato de sódio

O efeito da concentração da enzima imobilizada no biossensor Tyr-CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE na determinação de NaBz foi estudado utilizando-se amperometria. Na FIGURA 4.20 apresenta-se as porcentagens de inibição na resposta analítica em função da concentração do inibidor NaBz para os biossensores preparados com diferentes concentrações de enzima (30, 60 e 120

Resultados e Discussão

unidades). As curvas foram obtidas para adições de concentração crescente de NaBz em soluções de catecol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5).

Os valores da porcentagem de inibição foram calculados a partir dos dados dos amperogramas (FIGURA 4.20 gráfico inserido) utilizando-se a Equação 5.

$$\% \text{Inibição} = \frac{I_0 - I_{\text{inib}}}{I_0} \times 100 \quad \text{Eq.5}$$

sendo I_0 o valor de corrente na ausência do inibidor e I_{inib} a corrente obtida para a adição de uma concentração conhecida do inibidor²³.

No gráfico inserido da FIGURA 4.20, observa-se um aumento do sinal analítico para a redução de *o*-quinona a catecol com o aumento da concentração da enzima de 30 para 60 unidades. Porém, para concentrações de enzima muito altas (120 unidades) houve uma diminuição do sinal de corrente, a qual pode ser atribuída à formação de filmes espessos que limitam a difusão da *o*-quinona produzida na reação enzimática até a superfície do eletrodo¹⁴.

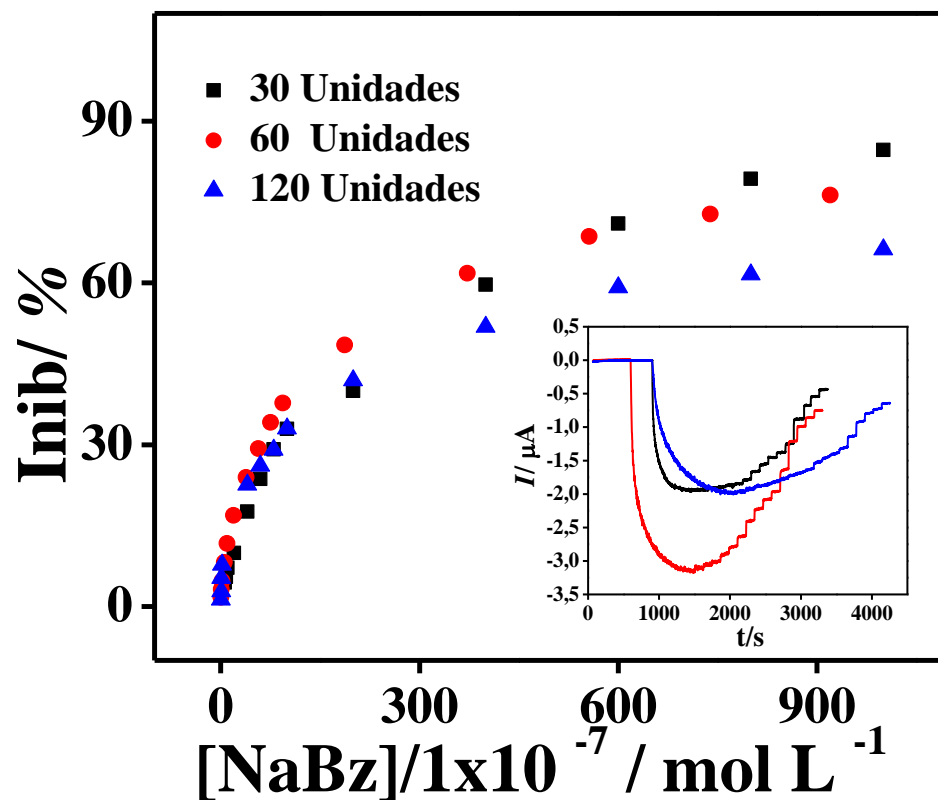


FIGURA 4.20-Estudo do efeito da concentração da enzima. Gráfico inserido: amperogramas obtidos para os biossensores preparados com diferentes concentrações de enzima (30, 60 e 120 unidades) em solução de catecol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), potencial aplicado $-0,2 \text{ V}$ e velocidade de agitação 450 rpm. Faixa de concentração de NaBz para 30 unidades de enzima: $5,8 \times 10^{-6} - 9,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, 60 unidades: $4,9 \times 10^{-7} - 9,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e 120 unidades: $4,9 \times 10^{-7} - 9,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Na TABELA 4.5 são sumarizados alguns parâmetros de desempenho analítico para determinação de NaBz extraídos das curvas apresentadas na FIGURA 4.20, obtidas para os biossensores preparados com diferentes

Resultados e Discussão

concentrações da enzima Tyr. Como pode ser observado, houve um aumento da sensibilidade analítica com o acréscimo da concentração de enzima de 30 para 60 unidades. Todavia, como era de se esperar, para uma concentração de enzima de 120 unidades houve uma diminuição da sensibilidade, atribuída às limitações na difusão tanto da *o*-quinona até a superfície do eletrodo, quanto do NaBz até o sítio ativo da enzima³². Levando-se em consideração estes resultados, selecionou-se para os estudos posteriores uma concentração enzimática de 60 unidades por eletrodo.

TABELA 4.5-. Efeito da concentração de enzima Tyr utilizada para preparação do biossensor sobre os parâmetros analíticos para a determinação de NaBz. Resultados extraídos das curvas da FIGURA 4.20

Concentração de enzima (unidades)	Intervalo Lineal (mol L⁻¹)	Inibição máxima (%)	Sensibilidade (%L mol⁻¹)
30	$5,8 \times 10^{-6} - 9,4 \times 10^{-5}$	84,7	93777
60	$4,9 \times 10^{-7} - 1,9 \times 10^{-5}$	78,3	819657
120	$4,9 \times 10^{-7} - 3,8 \times 10^{-5}$	66,2	475341

Posteriormente, avaliou-se o efeito da concentração do substrato (catecol) sobre a determinação de NaBz utilizando-se o biossensor Tyr–CB–HNO₃/H₂SO₄ 1:1–DHP/GCE preparado com concentração fixa de enzima de 60 unidades por eletrodo. Na FIGURA 4.21 são apresentadas as curvas de inibição obtidas para três concentrações diferentes de catecol ($1,0 \times 10^{-6}$, $5,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) em solução de tampão fosfato 0,075 mol L⁻¹ (pH 7,5).

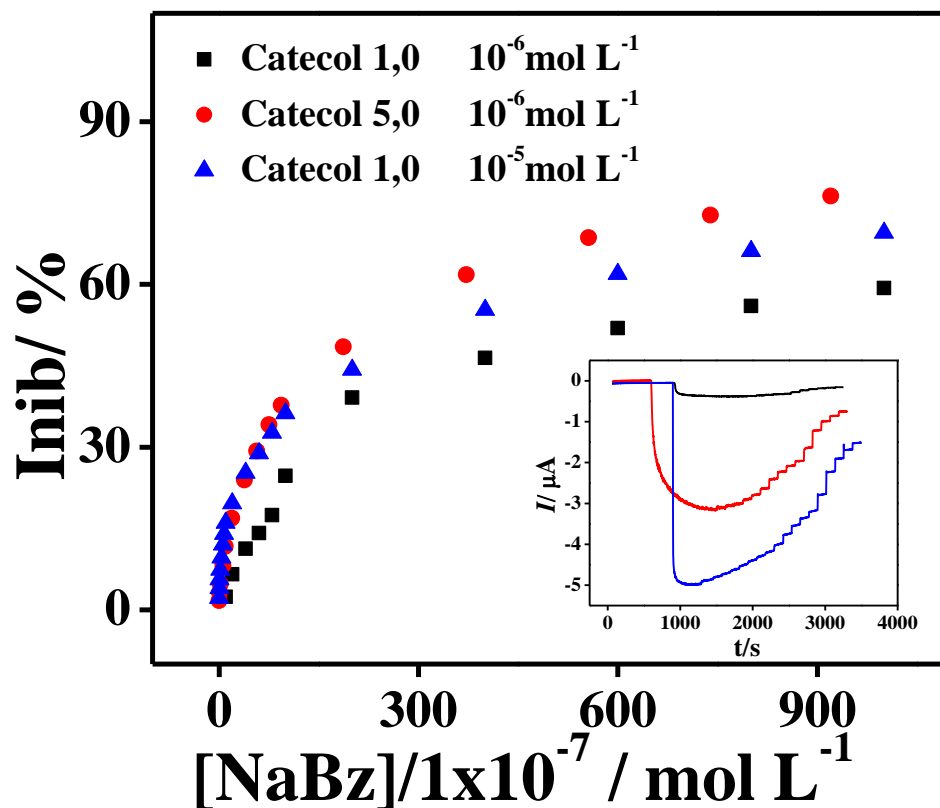


FIGURA 4.21-Estudo do efeito da concentração do substrato. Gráfico inserido: amperogramas obtidos para o biossensor Tyr-CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE preparado com concentração fixa de enzima (60 unidades) em solução de tampão fosfato 0,075 mol L⁻¹ (pH 7,5) contendo catecol em diferentes concentrações (1,0 × 10⁻⁶; 5,0 × 10⁻⁶ e 1,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹), potencial aplicado -0,2 V e velocidade de agitação 450 rpm. Faixa de concentração de NaBz para concentração de catecol de 1,0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹: 9,5 × 10⁻⁵ – 9,2 × 10⁻⁴ mol L⁻¹; 6,0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹: 4,9 × 10⁻⁷ – 9,2 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ e 1,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹: 9,7 × 10⁻⁷ – 9,2 × 10⁻⁴ mol L⁻¹.

Na TABELA 4.6 são sumarizados alguns parâmetros de desempenho analítico para determinação de NaBz obtidos a partir das curvas apresentadas na FIGURA 4.21. Assim, foi verificado um aumento da sensibilidade como consequência do aumento da concentração de catecol. Além disso, pode-se

Resultados e Discussão

observar o efeito da concentração do substrato sobre as concentrações mínimas detectáveis do inibidor (analito). Para a menor concentração de catecol estudada ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), a menor concentração de NaBz que ocasionou uma mudança perceptível de corrente foi de $9,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, e este valor é alto em comparação com o obtido para a concentração de catecol de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Este efeito pode ser atribuído à baixa corrente de redução da *o*-quinona obtida para concentrações de catecol baixas (Ver amperogramas apresentados no gráfico inserido da FIGURA 4.21).

Para a concentração de catecol maior ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), a menor concentração de inibidor detectada também foi alta em comparação com o resultado obtido para a concentração de catecol de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Este resultado sugere que concentrações altas do substrato interferem na interação do inibidor com a enzima. Levando-se em consideração os resultados dos estudos de concentração de enzima e substrato, selecionou-se como condição de trabalho uma concentração enzimática de 60 unidades por eletrodo e concentração de catecol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Resultados e Discussão

TABELA 4.6- Efeito da concentração de catecol sobre os parâmetros analíticos para a determinação de NaBz. Resultados extraídos das curvas da FIGURA 4.21

[Catecol] (mol L⁻¹)	Intervalo Lineal (mol L⁻¹)	Inibição máxima (%)	Sensibilidade (% L mol⁻¹)
$1,0 \times 10^{-6}$	$9,5 \times 10^{-6} - 9,4 \times 10^{-5}$	59,3	192415
$5,0 \times 10^{-6}$	$4,9 \times 10^{-7} - 1,9 \times 10^{-5}$	78,3	819657
$1,0 \times 10^{-5}$	$9,7 \times 10^{-7} - 9,5 \times 10^{-6}$	69,5	843209

4.6.2 Estudo cinético e mecanismos de inibição para a determinação de NaBz

É conhecido que a natureza do transdutor de sinal e do tipo de imobilização da enzima pode ter influência sobre o comportamento cinético do inibidor e, conseqüentemente, sobre o mecanismo de inibição²³. O mecanismo de inibição do biossensor Tyr-CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE foi avaliado a partir dos gráficos de Lineweaver-Burk na ausência e na presença do inibidor. Na FIGURA 4.22 são apresentados os gráficos de Lineweaver-Burk obtidos em solução de tampão fosfato 0,075 mol L⁻¹ (pH 7,5) para a adição de concentrações crescentes de catecol na ausência do inibidor e na presença de uma concentração de NaBz de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

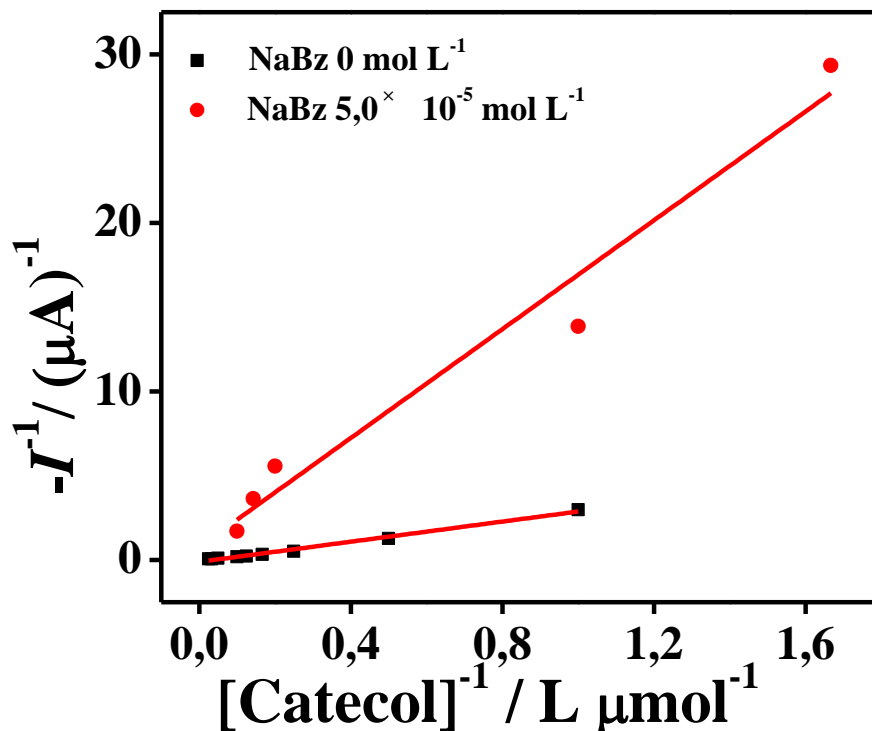


FIGURA 4.22-Gráficos de Lineweaver-Burk obtidos para catecol na ausência e na presença de NaBz em concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5).

Os interceptos e inclinações das retas estão relacionados com os valores de I_{max} e K_M^{app} a partir da equação de Lineweaver-Burk (Equação 4). Quanto maior o coeficiente linear da reta obtida maior o valor da constante e, menor a afinidade da enzima pelo substrato. Observa-se que para este caso não houve mudanças significativas nos interceptos das retas ($1/I_{\text{max}}$), porém, houve um aumento no valor de K_M^{app} como consequência da introdução do inibidor no sistema. Este comportamento corresponde ao esperado para mecanismos de inibição reversível competitiva, onde o substrato e o inibidor competem pelo

Resultados e Discussão

mesmo sítio ativo da enzima e a presença do inibidor diminui a afinidade da enzima pelo substrato⁸⁹.

Os gráficos de Dixon são comumente utilizados para identificar o mecanismo de inibição e estimar o valor das constantes de inibição aparentes (K_i^{app}). Na FIGURA 4.23 apresentam-se os gráficos de Dixon os quais relacionam o comportamento dos recíprocos das correntes em função da concentração do inibidor para duas concentrações diferentes do substrato catecol ($5,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹). Novamente, observou-se o comportamento típico de um processo de inibição enzimática competitiva, o qual envolve a diminuição do coeficiente angular da reta como consequência do aumento na concentração do substrato, indicando que para concentrações do substrato infinitas a inclinação tende a zero e não haverá efeito do inibidor³².

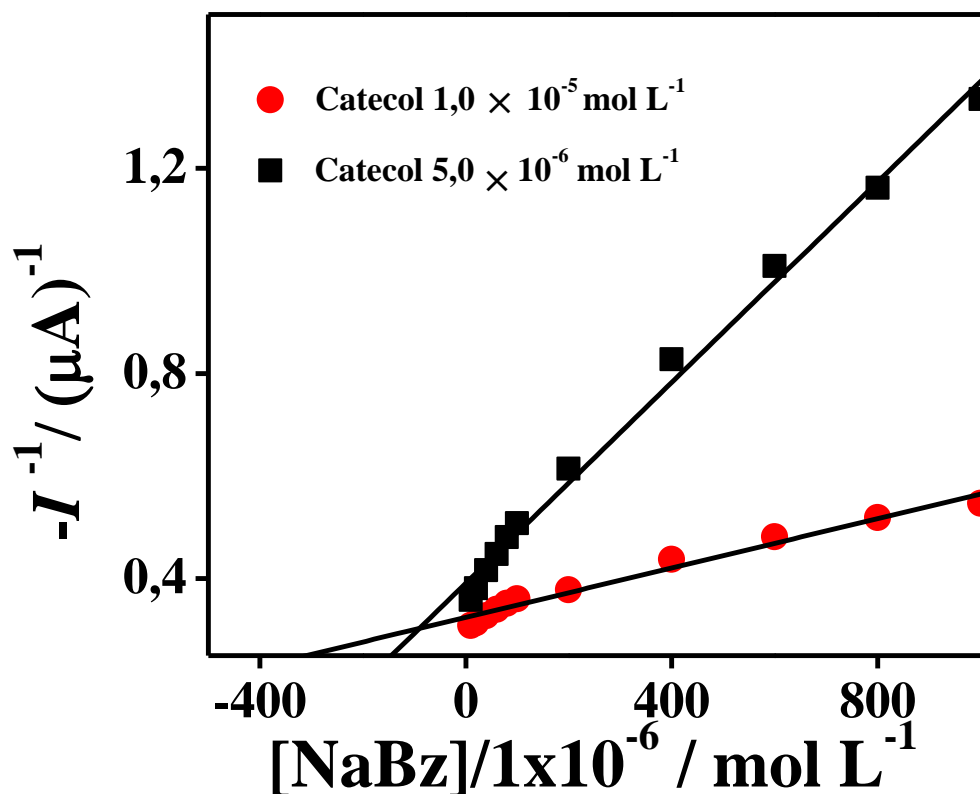


FIGURA 4.23-Gráfico de Dixon obtidos para benzoato de sódio em soluções de catecol de concentração $5,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5).

A constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (constante de inibição aparente K_i^{app}) pode ser estimada a partir do cruzamento entre os gráficos de Dixon. O valor de K_i^{app} obtido neste trabalho foi de $82 \mu\text{mol L}^{-1}$. Na TABELA 4.7 são comparados os valores de K_i^{app} encontrados na literatura para diferentes biossensores de Tyr usados na determinação de ácido benzoico com o resultado obtido neste trabalho. Observa-se que o valor de K_i^{app} encontrado neste trabalho é maior do que relatado na literatura para a determinação de ácido benzoico, podendo

Resultados e Discussão

isto ser atribuído à grande afinidade pelo catecol apresentada pela enzima imobilizada no CB funcionalizado³².

TABELA 4.7- Comparação das constantes de inibição para diferentes biossensores de Tyr utilizados na determinação de ácido benzoico

Biossensor	K_i^{app} (μmolL^{-1})	Referência
Tyr-CB-HNO₃/H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE	82	Este trabalho *
Tyr/nano-CaCO ₃	17	32
Graphite-Teflon-Tyr	16	39
Tyr-PPO-CaHPO ₄	7,2	40

*Determinação de NaBz.

4.7 Determinação amperométrica de NaBz baseada em inibição enzimática

Uma vez encontradas as melhores condições experimentais e identificado o mecanismo de inibição, foi construída a curva analítica para a determinação de NaBz empregando-se amperometria. Na FIGURA 4.24 é apresentado o amperograma obtido para a determinação baseada na inibição enzimática. Observa-se a diminuição do sinal de corrente como consequência da adição do NaBz.

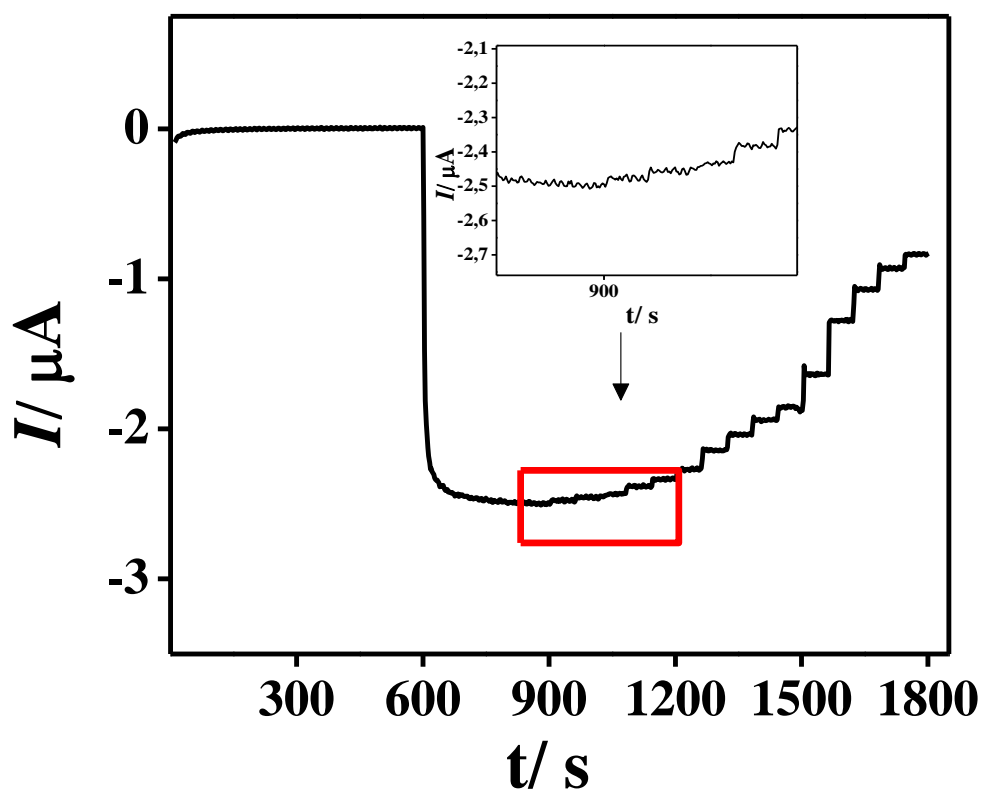


FIGURA 4.24-Amperograma obtido para a adição de diferentes concentrações de NaBz (faixa de concentrações: $4,9 \times 10^{-7} - 9,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Concentração de catecol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), potencial aplicado $-0,2\text{V}$ e velocidade de agitação 450 rpm.

Na FIGURA 4.25 apresenta-se o comportamento da porcentagem de inibição em função da concentração do NaBz, e o gráfico inserido corresponde à curva analítica. A equação que representa a curva analítica é: $\text{Inib}(\%) = 1,27 + 8,19 \times 10^5 \times [\text{NaBz}] (\text{mol L}^{-1})$. O limite de detecção (calculado como sendo três vezes o desvio padrão do intercepto da curva analítica dividido pela sensibilidade da curva)^{1,17,90} foi calculado como $2,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

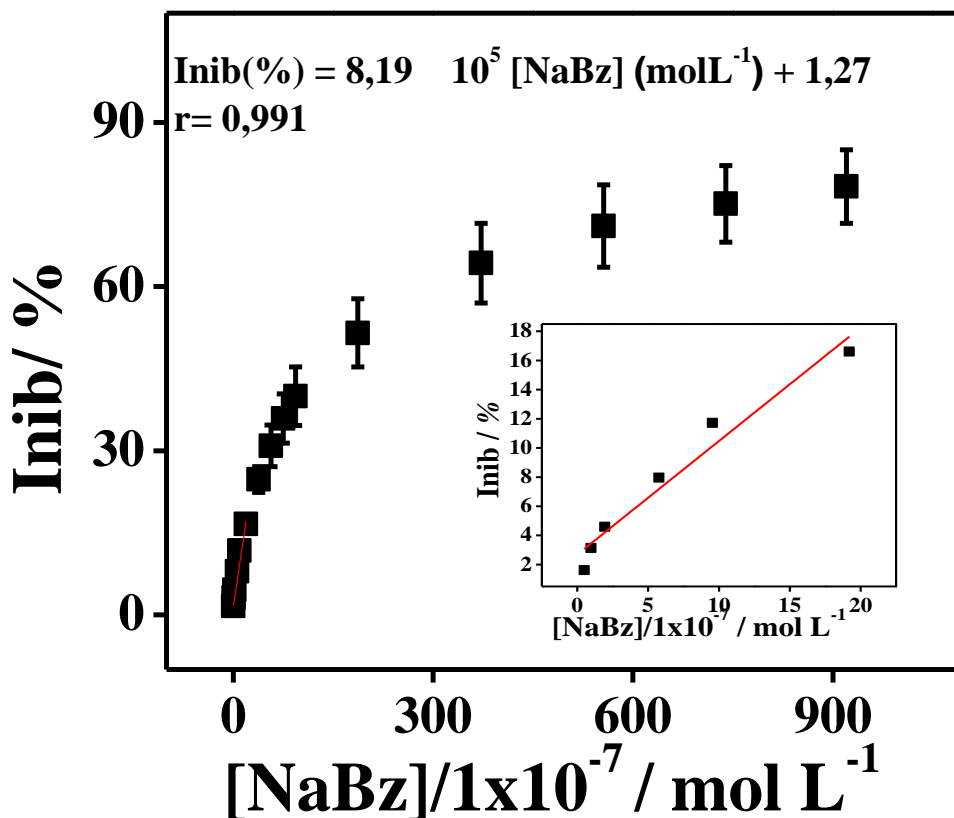


FIGURA 4.25-Relação entre a porcentagem de inibição e a concentração de NaBz. Gráfico inserido: curva analítica.

Na TABELA 4.8 é apresentada uma comparação entre os parâmetros analíticos obtidos para o biossensor de Tyr e CB funcionalizado e os encontrados na literatura para diversos biossensores de Tyr dedicados à determinação de ácido benzoico. Esta comparação é realizada levando em consideração que nas condições nas quais foram realizados estes trabalhos (pH entre 6,0 e 7,5) a espécie dominante em solução é o NaBz e não o ácido benzoico. Por exemplo, em solução com pH igual a 6,0; 98,6% das espécies se encontram na forma de NaBz considerando-se o

Resultados e Discussão

pK_a do ácido benzoico igual a 4,20. Observa-se que o biossensor Tyr–CB–HNO₃/H₂SO₄ 1:1–DHP/GCE apresentou um limite de detecção inferior ao obtido para o biossensor a base de Tyr imobilizada em uma matriz de grafite e Teflon³⁹, e o limite de detecção foi maior em comparação com os outros biossensores. Pode-se atribuir isto à grande afinidade entre o substrato catecol e o biossensor de Tyr e CB funcionalizado, e este e outros parâmetros do método podem ser melhorados a partir da utilização de substratos que apresentem menor afinidade pelo dispositivo³². Ademais, o biossensor proposto tem vantagens em termos de custo e facilidade de preparação frente aos outros dispositivos encontrados na literatura.

TABELA 4.8- Comparação dos parâmetros analíticos para diferentes biossensores de tirosinase na determinação de benzoato de sódio

Biossensor	Intervalo linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
Graphite–Teflon– tyrosinase	1–40	0,90	39
Tyr–CB–HNO₃/H₂SO₄ 1:1–DHP/GCE	0,49–19	0,21	Este trabalho
Tyr/nano–CaCO ₃	0,56–92	0,08	32
Tyr–PPO–CaHPO ₄	0,030–3,0	0,03	40

Finalmente, a aplicabilidade do biossensor proposto na determinação de NaBz em amostras de cebolas em conserva foi avaliada a partir de estudos de adição e recuperação do analito. Para isto, uma alíquota de 950 μL de água de conserva foi fortificada com NaBz e 100 μL foram adicionados na célula contendo

Resultados e Discussão

10 mL de solução de tampão fosfato $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) e uma concentração de catecol de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para obter uma concentração de benzoato de sódio de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A concentração de NaBz foi determinada três vezes e a média e o desvio padrão foram calculados. Foi obtida uma porcentagem de recuperação de 91,2%, desta forma, mostrou-se que não houve interferência significativa da matriz da amostra sobre a determinação de NaBz utilizando o método proposto.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho o CB Vulcan XC-72R foi funcionalizado mediante a aplicação de diferentes tratamentos de oxidação. Como consequência da funcionalização foram observadas mudanças nas propriedades físicas do material (como hidrofiliabilidade e grau de desordem) as quais tiveram uma influência significativa nas suas propriedades eletroquímicas. Os estudos mostraram uma vantagem do uso do CB funcionalizado com a mistura de ácido nítrico e sulfúrico 1:1 v/v para aplicações em eletroanálises, e esta vantagem vê-se refletida principalmente no incremento da sensibilidade.

O melhor tratamento de funcionalização foi selecionado para a construção do biossensor Tyr-CB-HNO₃ /H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE, e este foi aplicado na determinação de catecol utilizando-se amperometria. Foram obtidos melhores resultados (em termos de limite de detecção e sensibilidade) aos encontrados na literatura para outros biossensores de Tyr preparados utilizando materiais mais custosos. O biossensor foi aplicado na determinação de catecol em amostras de água obtendo-se bons resultados.

Finalmente, foram realizados estudos do comportamento cinético do benzoato de sódio frente ao biossensor Tyr-CB-HNO₃ /H₂SO₄ 1:1-DHP/GCE, encontrando-se que a inibição segue o mecanismo reversível competitivo conforme ao encontrado na literatura para o ácido benzoico. O biossensor foi aplicado na determinação de benzoato de sódio e observaram-se respostas lineares na faixa de $4,90 \times 10^{-7}$ a $1,92 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e limite de detecção de $2,1 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Estes resultados mostram a possibilidade de utilizar o CB funcionalizado na preparação de biossensores enzimáticos para a determinação tanto de substratos quanto de

Conclusões

inibidores enzimáticos, com vantagens frente aos materiais geralmente utilizados em termos de custo e/ou simplicidade de preparação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OLIVEIRA, T. M. B. F.; FÁTIMA BARROSO, M.; MORAIS, S.; DE LIMA-NETO, P., CORREIA, A. N.; OLIVEIRA, M. B. P. & DELERUE-MATOS, C. "Biosensor based on multi-walled carbon nanotubes paste electrode modified with laccase for pirimicarb pesticide quantification". *Talanta*, **106**: 177-143, 2013.
 2. TURNER, A. P. F. "Biosensors: sense and sensibility". *Chem. Soc. Rev.*, 42 (8): 3184-3196, 2013.
 3. FATIBELLO-FILHO, O. & CAPELATO, M. D. "Biossensores". *Quim. Nova*, **15**: 28-39, 1992.
 4. ARDUINI, F. Development of the Analytical Methods Based on Cholinesterase Inhibition for Environmental and Food Analysis. Roma, university of Rome Tor Vergata, 2007. Tese de doutorado, 15 p.
 5. MOHANTY, S.P & KOUGIANOS, A.E. "Biosensors: a tutorial review". *Potentials. IEEE*, 25 (2): 35-40, 2006.
 6. RAMANATHAN, K & DANIELSSON, B. "Principles and applications of thermal biosensors". *Biosens. Bioelectron.*, 16 (6): 417-423, 2001.
 7. BOHUNICKY, B & MOUSA, S.A. "Biosensors: the new wave on cancer diagnosis". *Nanotechnol. Sci. Appl.*, **4**: 1-10, 2011.
 8. SASSOLAS, A; BLUM, L. J. & LECA-BOUVIER, B.D. "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors". *Biotechnol. Adv.*, 30 (3): 489-511, 2012.
 9. CLARK, L. C. & LYONS, C. "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery". *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 102 (1): 29-45, 1962.
 10. AMINE, A.; ARDUINI F.; MOSCONE, D. & PALLESCHI, G. "Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition." *Biosens. Bioelectron.* **76**:180-194, 2015.
 11. PUNDIR, C. S. & CHAUHAN, N. "Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review". *Anal. Biochem.*, 429 (1):19-31, 2012.
 12. GUILBAULT, G. G.; KRAMER, D. N. & CANNON Jr. P. L. "Electrical determination of organophosphorous compounds". *Anal. chem.*, 34, (11): 1437-1439, 1962.
 13. BARQUERO-QUIRÓS, M.; DOMÍNGUEZ-RENEDO, O.; ALONSO-LOMILLO, M. A. & ARCOS-MARTÍNEZ, M. J. "Acetylcholinesterase inhibition-based biosensor for Aluminum (III) chronoamperometric determination in aqueous media". *Sensors*, 14 (5): 8203-8216, 2014.
-

Referências Bibliográficas

14. DE ALBUQUERQUE, Y. D. T. & FERREIRA, L. F. “Amperometric biosensing of carbamate and organophosphate pesticides utilizing screen-printed tyrosinase-modified electrode”. *Anal. Chim. Acta*, 596 (2):210-221, 2007.
 15. SIMA, V. H.; PATRIS, S.; AYDOGMUS, Z.; SARAQBI, A.; SANDULESCU, R. & KAUFFMANN, J. M. “Tyrosinase immobilized magnetic nanobeads for the amperometric assay of enzyme inhibitors: Application to the skin whitening agents”. *Talanta*, 83(3): 980-987, 2011.
 16. ARDUINI, F.; FORCHIELLI, M.; AMINE, A.; NEAGU, D.; CACCIOTTI, I.; NANNI, F. & PALLESCHI, G. “Screen-printed biosensor modified with carbon black nanoparticles for the determination of paraoxon based on the inhibition of butyrylcholinesterase”. *Microchim. Acta* 182 (3-4): 643-651, 2015.
 17. OLIVEIRA, T. M.; BARROSO, M. F.; MORAIS, S.; ARAÚJO, M.; FREIRE, C.; DE LIMA-NETO, P. & DELARUE-MATOS, C. “Laccase–prussian blue film–graphene doped carbon paste modified electrode for carbamate pesticides quantification”. *Biosens. Bioelectron.* **47**: 292-299, 2013.
 18. VIDAL, J. C.; ESTEBAN, S.; GIL, J. & CASTILLA, J. R. “A comparative study of immobilization methods of a tyrosinase enzyme on electrodes and their application to the detection of dichlorvos organophosphorus insecticide”. *Talanta*, 68 (3): 791-799, 2006.
 19. AMINE, A.; MOHAMMADI, H.; BOURAIS, I. & PALLESCHI, G. “Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring”. *Biosens. Bioelectron.*, 21 (8): 1405-1423, 2006.
 20. OLIVEIRA, A. C & MASCARO, L. H. “Evaluation of acetylcholinesterase biosensor based on carbon nanotube paste in the determination of chlorphenvinphos”. *Int. J. Anal. Chem.*, 1-6, 2011.
 21. DING, J.; ZHANG, H.; JIA, F.; Qin, W. & DU, D. “Assembly of carbon nanotubes on a nanoporous gold electrode for acetylcholinesterase biosensor design”. *Sens. Actuators. B Chem.*, **199**: 284-290, 2014.
 22. SHAMAGSUMOVA, R. V.; SHURPIK, D. N.; PADNYA, P. L.; STOIKOV, I. I. & EYEVTUGYN, G. A. “Acetylcholinesterase biosensor for inhibitor measurements based on glassy carbon electrode modified with carbon black and pillar [5] arene”. *Talanta*, **144**: 559-568, 2015.
 23. ARDUINI, F.; AMINE, A.; MOSCONE, D. & PALLESCHI, G. “Reversible enzyme inhibition–based biosensors: Applications and analytical improvement through diagnostic inhibition”. *Anal. Lett.*, 42 (9):1258-1293, 2009.
 24. MAHBOUBIFAR, M.; SOBHANI, Z.; DEHGHANZADEH, G. & JAVIDNIA, K. “A comparison between UV spectrophotometer and high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in food products”. *Food Anal. Methods*, 4 (2): 150-154, 2011.
-

Referências Bibliográficas

25. BAHREMAND, N & ESKANDARI, S. "Determination of Potassium Sorbate and Sodium Benzoate in "Doogh" by HPLC and Comparison with Spectrophotometry". *Int. J. Bio-Inorg. Hybd. Nanomat*, 2 (3): 429-435, 2013.
 26. CIGIC, I. K.; PLAVEC, J.; MOZINA, S. S. & ZUPANCIC-KRALJ, L. "Characterisation of sorbate geometrical isomers". *J. Chromatogr. A*, 905 (1): 359-366, 2001.
 27. Scientific committee on consumer products opinion on: benzoic acid and sodium benzoate 107 Adopted by the SCCP during the 4rd plenary meeting of 21 June 2005. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_015.pdf. Acesso em: Novembro de 2015.
 28. HANNUKSELA, M. & HAAHTELA, T. "Hypersensitivity reactions to food additives". *Allergy*, 42 (8): 561-575, 1987.
 29. SAAD, B.; BARI, M. F.; SALEH, M. I., AHMAD, K. & TALIB, M. K. M. "Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. A.*, 1073 (1): 393-397, 2005.
 30. LABAT, L.; KUMMER, E.; DALLET, P. & DUBOST, J. P. "Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the determination of parabens in a cosmetic product". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 23 (4): 763-769, 2000.
 31. DONG, C.; MEI, Y. & CHEN, L. "Simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in food dressing by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography". *J. Chromatogr. A.*, 1117 (1): 109-114, 2006.
 32. SHAN, D.; MOUSTY, C. & COSNIER, S. "Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors". *Anal. Chem.*, 76 (1): 178-183, 2008.
 33. KOCHANA, J.; KOZAK, J.; SKROBISZ, A. & WOZNIAKIEWICZ, M. "Tyrosinase biosensor for benzoic acid inhibition-based determination with the use of a flow-batch monosegmented sequential injection system". *Talanta*, **96**: 147-152, 2012.
 34. SÁNCHEZ-FERRER, Á.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; GARCÍA-CÁNOVAS, F. & GARCÍA-CARMONA, F. "Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism". *Biochim. Biophys. Acta*, 1247 (1): 1-11, 1995.
 35. STREFFER, K.; KAATZ, H.; BAUER, C. G.; MAKOWER, A.; SCHULMEISTER, T.; SCHELLER, F. W. & WOLLENBERG, U. "Application of a sensitive catechol detector for determination of tyrosinase inhibitors". *Anal. Chim. Acta.*, 362 (1): 81-90, 1998.
 36. CHANG, T-S. "An updated review of tyrosinase inhibitors". *Int. J. Mol. Sci.*, 10 (6): 2440-2475, 2009.
-

Referências Bibliográficas

37. CONRAD, J. S.; DAWSON, S. R.; HUBBARD, E. R.; MEYERS, T. E. & STROTHKAMP, K. G. "Inhibitor binding to the binuclear active site of tyrosinase: temperature, pH, and solvent deuterium isotope effects". *Biochemistry*, 33 (19): 5739-5744, 1994.
 38. SERRA, B.; JIMÉNEZ, S.; MENA, M. L.; REVIEJO, A. J. & PINGARRÓN J. M. "Composite electrochemical biosensors: a comparison of three different electrode matrices for the construction of amperometric tyrosinase biosensors". *Biosens. Bioelectron.*, 17 (3): 217-226, 2002.
 39. MORALES, M. D.; MORANTE, S.; ESCARPA, A.; GONZALES, M. C.; REVIEJO, A. J. & PINGARRÓN, J. M. "Design of a composite amperometric enzyme electrode for the control of the benzoic acid content in food". *Talanta*, 57 (6): 1189-1198, 2002.
 40. LÓPEZ, M. & LÓPEZ-RUIZ, B. "Inhibition biosensor based on calcium phosphate materials for detection of benzoic acid in aqueous and organic media". *Electroanalysis*, 23 (1): 264-271, 2011.
 41. ALIPOUR, E.; MAJIDI, M. R.; SAADATIRAD, A.; GOLABI, S.M. & ALIZADEH, A. M. "Simultaneous determination of dopamine and uric acid in biological samples on the pretreated pencil graphite electrode". *Electrochim. Acta*. **91**:36-42, 2013.
 42. LIU, T.; XU, M.; YIN, H.; AI, S.; QU, X. & ZONG, S. "A glassy carbon electrode modified with graphene and tyrosinase immobilized on platinum nanoparticles for sensing organophosphorus pesticides". *Microchim. Acta*, 175 (1-2): 129-135, 2011.
 43. FRIEDENSTEIN, H.; DAVIS, B. & EPEL, C. "Literature of carbon black". IN: *Literature of Chemical Technology*. SMITH, J. (Ed). Washington, DC, American Chemical Society, 1968. p. 515.
 44. JIANG, Z.; JIN, J.; XIAO, C. & LI, X. "Effect of surface modification of carbon black (CB) on the morphology and crystallization of poly (ethylene terephthalate)/CB masterbatch". *Colloids. Surfaces. A. Physicochem. Eng. Asp.* **395**: 105-115, 2012.
 45. VOLL, M. & KUHNER, G. "Manufacture of carbon black". IN: *Carbon Black: Science and Technology*. DONNET, J., BANSAL, R. & WANG, M. (Eds). New York, Marcell Dekker, Inc., p.1-39, 1993.
 46. BISCOE, J. & WARREN, B. E. "An X-Ray Study of Carbon Black". *J. Appl. Phys*, 13 (6): 364-371, 1942.
 47. NIEDERMEIER, W.; RAAB, H.; STIERSTORFER, J.; KREITMEIER, S. & GORITZ, D. "The microstructure of carbon black investigated by atomic force microscopy". *Kaut. Gummi. Kunstst*, **47**: 799-805, 1994.
-

Referências Bibliográficas

48. HARRIS, P. J. F. “New perspectives on the structure of graphitic carbons”. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.*, 30 (4): 235-253, 2005.
 49. ACCORSI, J. & YU, M. “Carbon black”. IN: *Plastics Additives: An A-Z Reference Vol. 1*. PRITCHARD, G. (Ed). Bristol, Chaoman and Hall, 1998. p. 153–162.
 50. BANSAL, R. & DONNET, J-B. “Surface groups on carbon black”. IN: *Carbon Black: Science and Technology*. DONNET, J-B., BANSAL, R. & WANG, M. (Eds). New York, Marcell Dekkerr, Inc., 1993.p.175–2015.
 51. BOEHM, H. P. “Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks and other carbons”. *Carbon*, 32 (5): 759-769, 1994.
 52. PURI, B. R. & BANSAL, R. C. “Studies in surface chemistry of carbon blacks. Part I. High temperature evacuations”. *Carbon*, 1 (4): 451-455, 1964.
 53. PENA, J. M.; ALLEN, N. S.; EDGE, M.; LIAUW, C. M.; VALANGE, B. & SANTAMARÍA, F. “The use of microwave and FTIR spectroscopy for the characterisation of carbon blacks modified with stabilisers”. *Polym. Degrad. Stab.* 74 (1): 1-24, 2001.
 54. BORAH, D.; SATOKAWA, S.; KATO, S. & KOJIMA, T. “Characterization of chemically modified carbon black for sorption application”. *Appl. Surf. Sci.*, 254 (10): 3049-3056, 2008.
 55. KIM, S & PARK, S-J. “Effects of chemical treatment of carbon supports on electrochemical behaviors for platinum catalysts of fuel cells”. *J.Power. Sources*. 159 (1): 42-45, 2006.
 56. CARMO, M; LINARDI, M & POCO, J.G.R. “Characterization of nitric acid functionalized carbon black and its evaluation as electrocatalyst support for direct methanol fuel cell applications”. *Appl. Catal. A. Gen.*, 355 (1): 132-138, 2009.
 57. PARK, S-J & KIM, J-S. “Modifications produced by electrochemical treatments on carbon blacks: Microstructures and mechanical interfacial properties”. *Carbon*, 39 (13): 2011-2016, 2001.
 58. ALCÁNTARA, R.; JIMÉNEZ-MATEOS, J. M.; LAVELA, P. & TIRADO, J. L. “Carbon black: a promising electrode material for sodium-ion batteries”. *Electrochem. commun.*, 3 (11): 639-642, 2001.
 59. GUO, Y.; ZHENG, Y. & HUANG, M. “Enhanced activity of PtSn/C anodic electrocatalyst prepared by formic acid reduction for direct ethanol fuel cells”. *Electrochim. Acta.*, 53 (7): 3102-3108, 2008.
 60. ARDUINI, F.; AMINE, A.; MAJORANI, C.; DI GIORGIO, F.; DE FELICIS, D.; CATALDO, F. & PALLESCHI, G. “High performance electrochemical sensor based on modified screen-printed electrodes with cost-effective
-

Referências Bibliográficas

- dispersion of nanostructured carbon black”. *Electrochem. Commun.*, 12 (3): 346-350, 2010.
61. ARDUINI, F.; GIORGIO, F. D.; AMINE, A.; CATALDO, F.; MOSCONE, D. & PALLESCHI, G. “Electroanalytical characterization of carbon black nanomaterial paste electrode: development of highly sensitive tyrosinase biosensor for catechol detection”. *Anal. Lett.*, 43 (10-11): 1688-1702, 2010.
62. ARDUINI, F.; DI NARDO, F.; AMINE, A.; MICHELI, L.; PALLESCHI, G. & MOSCONE, D. “Carbon black-modified screen-printed electrodes as electroanalytical tools” *Electroanalysis*, 24 (4): 743-751, 2012.
63. TALARICO, D.; ARDUINI, F.; CONSTANTINO, A.; DEL CARLO, M.; COMPAGNONE, D.; MOSCONE, D. & PALLESCHI, G. “Carbon black as successful screen-printed electrode modifier for phenolic compound detection”. *Electrochem. Commun.*, **60**: 78-82, 2015.
64. NADIFIYINE, S.; HADDAM, M.; MANDLI, J.; CHADEL, S.; BLANCHARD, C. C.; MARTY, J. L., & AMINE, A. “Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized on to a carbon black paste electrode for phenol determination in olive oil”. *Anal. Lett.*, 46 (17): 2705-2726, 2013.
65. PORTACCIO, M.; DI TUORO, D.; ARDUINI, F.; MOSCONE, D.; CAMMAROTA, M.; MITA, D. G. & LEPORE, M. “Laccase biosensor based on screen-printed electrode modified with thionine–carbon black nanocomposite, for bisphenol A detection”. *Electrochim. Acta.*, **109**: 340-347, 2013.
66. VICENTINI, F. C.; RAVANINI, A. E.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C., INIESTA, J.; BANKS, C. E. & FATIBELLO-FILHO, O. “Imparting improvements in electrochemical sensors: evaluation of different carbon blacks that give rise to significant improvement in the performance of electroanalytical sensing platforms” . *Electrochim. Acta*, **157**: 125-133, 2015.
67. STONEHART, P. & WHEELER, D. “Phosphoric acid fuel-cells (PAPCs) for utilities: electrocatalyst cristallyte desing, carbon support and matrix material challenge” IN: *Modern Aspects of Electrochemistry*, Number 38. CONWAY, B.; WAYENAS, C.; WHITE, R. & GAMBOA-ADELCO, M. (Eds). New York, Springer Science & Busines Media, Inc., 2005. p. 407.
68. LÁZARO, M.; CALVILLO, L.; CELORRIO, V.; PARDO, J. I.; PERATHONER, S. & MOLINER, R. “Study and application of carbon black Vulcan XC-72R in polymeric electrolyte fuel cells”. IN: *Carbon Black: Production, Properties and Uses*. SANDERS, I. J & PEETEN, T.L. (Ed). New York, Nova Science Publishers, Inc., 2011.p.1–28.
-

Referências Bibliográficas

69. FRYSZ, C. A. & CHUNG, D. D. L. "Improving the electrochemical behavior of carbon black and carbon filaments by oxidation". *Carbon*, 35 (8): 1111-1127, 1997.
70. VICENTI, F. C.; RAVANINI, A. E.; SILVA, T. A.; JANEGITZ, B. C.; ZUCOLOTTI, V. & FATIBELLO-FILHO, O." A novel architecture based upon multi-walled carbon nanotubes and ionic liquid to improve the electroanalytical detection of ciprofibrate". *Analyst*, 139 (16): 3961-3967, 2014.
71. HESS, W.M & HERD, C. "Microstructure, morphology and general physical properties". IN: *Carbon Black: Science and Technology*. DONNET, J., BANSAL, R. & WANG, M. (Eds). New York, Marcell Dekker, Inc. 1993.p.107.
72. DONGIL, A. B.; BACHILLER-BAEZA, B.; GUERRERO-RUIZ, A.; RODRÍGUEZ-RAMOS, I.; MARTÍNEZ-ALONSO, A.; & TASCÓN, J. M. D. "Surface chemical modifications induced on high surface area graphite and carbon nanofibers using different oxidation and functionalization treatments". *J. Colloid. Interface. Sci.*, 355 (1): 179-189, 2011.
73. PLONSKA-BRZEZINSKA, M. E.; DUBIS, A. T.; LAPINSKI, A.; VILLALTA-CERDAS, A. & ECHEGOYEN, L. "Electrochemical properties of oxidized carbon nano-onions: DRIFTS-FTIR and raman spectroscopic analyses". *Chem. Phys. Chem*, 12 (14): 2659-2668, 2011.
74. WONG, C. H A.; AMBROSI, A.; PUMERA, M. "Thermally reduced graphenes exhibiting a close relationship to amorphous carbon". *Nanoscale*, 4 (16): 4972-4977, 2012.
75. PAVESE, M.; MUSSO, S.; BIANCO, S.; GIORCELLI, M. & PUGNO, N. "An analysis of carbon nanotube structure wettability before and after oxidation treatment". *J. Phys. Condens. Matter.*, 20 (47): 474206, 2008.
76. SEKIYAMA, M & KIRINO, T. "Surface-Modified Carbon Black and Dispersion Thereof". U.S. Patent Application No 12/085,623, 8 Dic. 2006.
77. KIRINO, T. & SEKIYAMA, M. "Dispersible surface-modified carbon black". U.S. Patent No 8,026,319, 27 Sept. 2011.
78. FIGUEIREDO-FILHO, L. C.; BROWNSON, D. A.; GÓMEZ-MINGNOT, M.; INIESTA, J.; FATIBELLO-FILHO, O. & BANKS, C. E. "Exploring the electrochemical performance of graphitic paste electrodes: graphene vs. graphite". *Analyst*, 138 (21): 6354-6364, 2013.
79. TSAI, Y-C. CHIU, & C-C. "Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-Nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds". *Sens. Actuators. B Chem.* 125 (1): 10-16, 2007.
80. SARTORI, E, R.; VICENTINI, F.C & FATIBELLO-FILHO, O. "Indirect determination of sulfite using a polyphenol oxidase biosensor based on a glassy
-

Referências Bibliográficas

- carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles within a poly (allylamine hydrochloride) film”. *Talanta*, **87**: 235-242, 2011.
81. VICENTINI, F. C.; JANEGITZ, B. C.; BRETT, C. M. & FATIBELLO-FILHO, O. “Tyrosinase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and 1-butyl-3-methylimidazolium chloride within a dihexadecylphosphate film”. *Sens. Actuators. B Chem.*, **188**: 1101-1108, 2013.
82. CHEN, L.; GU, B.; ZHU, G.; WU, Y.; LIU, S. & XU, C. “Electron transfer properties and electrocatalytic behavior of tyrosinase on ZnO nanorod”. *J. Electroanal. Chem.*, 617 (1): 7-13, 2008.
83. OZONER, S. K.; YALVAC, M. & ERHAN, E. “Flow injection determination of catechol based on polypyrrole–carbon nanotube–tyrosinase biocomposite detector”. *Curr. Appl. Phys*, 10 (1), 323-328, 2010.
84. KHEIRI, F.; SABZI, R. E.; JANNATDOUST, E. & SEDGHI, H. “Acetone extracted propolis as a novel membrane and its application in phenol biosensors: the case of catechol *J. Solid State Electrochem.* 15 (11-12): 2593-2599, 2011.
85. BORISOVA, B.; RAMOS, J.; DÍEZ, P.; SÁNCHEZ, A.; PARRADO, C.; ARAQUE, E. & PINGARRÓN, J. M. “A layer-by-layer biosensing architecture based on polyamidoamine dendrimer and carboxymethylcellulose-modified graphene oxide”. *Electroanalysis*, 27 (9): 2131-2138, 2015.
86. LEE, J. M.; XU, G. R.; KIM, B. K.; CHOI, H. N. & LEE, W. Y. “Amperometric Tyrosinase Biosensor Based on Carbon Nanotube-Doped Sol-Gel-Derived Zinc Oxide–Nafion Composite Films”. *Electroanalysis*, 23 (4): 962-970, 2011.
87. SMITH, J. L. & KRUEGER, R. “Separation and purification of the phenolases of the common mushroom”. *J. Biol. Chem.*, **237**: 1121-1128, 1962.
88. KIRALP, S.; TOPPARE, L. & YAĞCI, Y. “Immobilization of polyphenol oxidase in conducting copolymers and determination of phenolic compounds in wines with enzyme electrodes”. *Int. J. Biol. Macromol.*, 33 (1): 37-41, 2003.
-