

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

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES UTILIZANDO
NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE
OURO**

Bruno Campos Janegitz*

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

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho

* bolsista FAPESP

São Carlos - SP

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

J33db

Janegitz, Bruno Campos.

Desenvolvimento de biossensores utilizando nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro / Bruno Campos Janegitz. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
126 f.

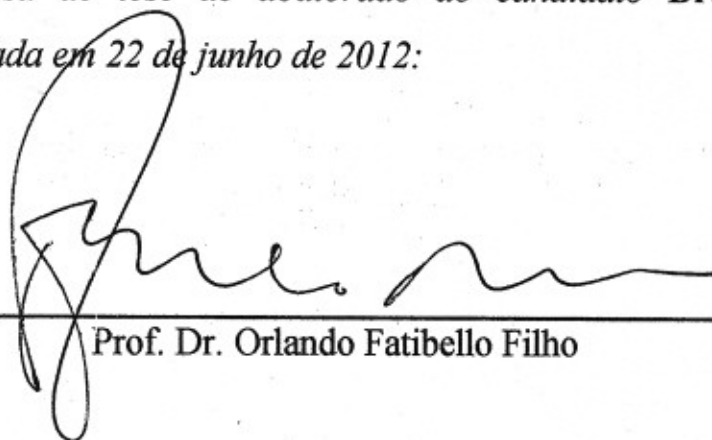
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Química analítica. 2. Biossensores (Biossensores). 3. Nanotubos de carbono. 4. Nanopartículas de ouro. 5. Materiais nanoestruturados. I. Título.


CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

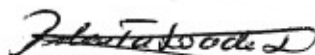
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado do candidato Bruno Campos Janegitz, realizada em 22 de junho de 2012:



Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho



Prof. Dra. Silvia Helena Pires Serrano



Prof. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor



Prof. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni



Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio têm qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa

“Conserve os olhos fixos num ideal sublime, e lute sempre pelo que deseja, pois só os fracos desistem e só quem luta é digno de vida.”

Autor Desconhecido

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

“Nosso cérebro é o melhor brinquedo já criado: nele se encontram todos os segredos, inclusive o da felicidade.”

Charles Chaplin

Dedico este trabalho aos meus pais

Milton e Maria pelo

apoio e amor incondicionais.

A minha irmã Moniki pelo

carinho e companheirismo.

A Déborah pelo amor e compreensão

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo, pois sem ele nada seria concretizado.

Aos meus pais pelo amor, carinho, pelas lições de vida e dedicação e à minha irmã, pelo companheirismo e amor.

A Déborah pelo amor, carinho e compreensão.

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho, pela orientação científica e por todos os conselhos.

Ao Prof Dr. Ronaldo Censi Faria pelo apoio e discussões científicas, além da ótima amizade.

Aos professores José Manuel Pingarrón e Paloma Yañes-Sedeño pela co-orientação durante o período de doutorado sanduíche.

Aos Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira-Filho e Romeu Cardoso Rocha-Filho pelo ensinamentos e conselhos.

Aos Prof.s Drs. Silvia Helena Pires Serrano, Maria del Pilar Taboada Sotomayor, Éder Tadeu Gomes Cavalheiro e Maria Valnice Boldrin pela colaboração, sugestões e discussões na banca de defesa.

Aos meus grandes amigos de Paraguaçu Paulista: Sullivan, Juliana, Berinjela, Gustavo, Renata, Mário, Vagner, Rafaela, Edson e Pardal e Vivi por cerca de 18 anos de convivência.

Ao pessoal do LABBES: Jorge, Marina, Thiago Guerreiro, Luiz (Cyber), Allan, Roberta, Bruna, Lívia, Deborah, Elson, Osmundo e Vagner, pela convivência e discussões científicas que me ajudaram no aprendizado.

Ao pessoal de Madrid pela ótima convivência e aprendizado: Araceli, Maria Pedrero, Elena, Eva, Maria Moreno, Marcos, Reynaldo, Paula, Berta, Felipe, Lourdes, Irene, Judith, Veronica, Vanessa e Rodolfo.

Ao Geiser, Fernando (Avaré), Marcão, Fernando (24), Rafa e Gabi, Enzo, Carol, Jubia, Thiago Grazielle e Gustavo pelas ótimas horas juntos, descontração e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Química, em especial às secretárias da Pós-Graduação: Ariane, Cristina e Luciani pela atenção e colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico por um mês de bolsa de estudo

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, processo nº 233710-0) pela bolsa de doutorado Sanduíche.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2008/09893-0) pela bolsa de estudo concedida.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES UTILIZANDO NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO. No presente trabalho de doutorado foram desenvolvidas novas arquiteturas para biossensores. Para isso foi imobilizada a enzima de interesse sobre diferentes substratos como nanotubos de carbono ou nanopartículas metálicas, objetivando melhorar a resposta analítica.

Primeiramente desenvolveu-se uma nova arquitetura de um biossensor para glicose utilizando-se a enzima glicose oxidase (GOx) imobilizada em nanotubos de carbono funcionalizados (CNTs) e dihexadecil hidrogênio fosfato (DHP) sobre a superfície de carbono vítreo (GCE). Resultados de voltametria cíclica apresentaram um par de picos redox bem definidos, correspondente a transferência eletrônica direta da GOx para o eletrodo, com o potencial formal de -0,418 V (vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)). O biossensor foi aplicado na determinação de glicose, o qual mostrou boas reprodutibilidade, estabilidade e seletividade.

O segundo biossensor desenvolvido foi aquele utilizando-se a enzima tirosinase (Tyr) imobilizada em nanopartículas de ouro sobre a superfície de um eletrodo de diamante dopado com boro. Resultados de voltametria cíclica apresentaram um par de picos redox bem definidos, correspondente à transferência eletrônica direta da Tyr. As determinações de fenol foram realizadas por SWV e o biossensor proposto apresentou um limite de detecção de 0,07 µmol L⁻¹.

Em sequência foi proposto um biossensor para a determinação de pesticidas utilizando-se a enzima acetilcolinesterase imobilizada sobre filme de nanopartículas de ouro e hidrocloreto de polialilamina sobre a superfície de eletrodos de carbono impresso (SPCE). O eletrodo AChE-AuNPs/SPCE apresentou um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para Diuron, além de boa estabilidade e reprodutibilidade para a determinação do pesticida por amperometria.

Por fim foi proposto também um imunossensor usando nanopartículas de ouro eletrodepositadas sobre eletrodos de carbono impresso (AuNPs/SPCEs) para a determinação de prolactina. Os anticorpos antiprolactina biotinizada foram imobilizados em AuNPs/SPCEs modificados com estreptavidina em um imunoenensaio do tipo sanduíche envolvendo o analito e um anticorpo antiprolactina marcado com fosfatase alcalina (AP). O imunossensor proposto apresentou um limite de detecção de 10 ng mL⁻¹ e foi aplicado com sucesso em amostras de soro humano enriquecido com prolactina comprovando a eficácia do procedimento proposto.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF BIOSENSORS USING CARBON NANOTUBES AND GOLD NANOPARTICLES. In this work new architectures for biosensors are presented, which it was used carbon nanotubes or metal nanoparticles with the enzyme of interest, aiming to improve the analytical response.

First, a glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes (CNTs) and glucose oxidase was proposed. Cyclic voltammetry of GOx immobilized onto the surface of CNTs showed a pair of well-defined redox peaks, which corresponds to the direct electron transfer of GOx, with a formal potential of -0.418 V in 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer solution (pH 7.0). An apparent heterogeneous electron transfer rate constant of 1.69 s^{-1} was obtained. The determination of glucose was carried out by square wave voltammetry and the developed biosensor showed good reproducibility and stability.

The second biosensor was a boron-doped diamond electrode modified with AuNPs electrodeposited and Tyrosinase (Tyr). The occurrence of direct electron transfer between the electrode surface and the Tyr active site was verified by cyclic voltammetry, yielding the following parameter values: formal redox potential of 0.115 V . The developed Tyr-AuNPs/BDD biosensor exhibits good sensitivity, stability, and reproducibility for the determination of phenol by SWV.

The third proposed biosensor was developed based on acetylcholinesterase, gold nanoparticles and poly (allylamine hydrochloride) film on the surface of screen printed carbon electrodes (SPCE) for the determination of pesticides using a portable micromachined flow injection system. The AChE-AuNPs/SPCE biosensor presented a limit of detection of $5.0 \times 10^{-8}\text{ mol L}^{-1}$ for Diuron. In addition, the biosensor showed good sensitivity, stability and reproducibility for Diuron determination in water samples.

Finally, a novel electrochemical immunosensor using electrodeposited gold nanoparticles modified-screen-printed carbon electrodes (AuNPs/SPCEs) was developed for the determination of prolactin. The variables involved in the preparation of the immunosensor and the electrochemical detection step were optimized, which presented a limit of detection of 10 ng mL^{-1} . The analytical usefulness of the immunosensor for the analysis of real samples was demonstrated by analyzing human serum spiked with PRL at two different concentration levels.

LISTA DE ABREVIATURAS

ΔE_s - incremento de varredura

ΔE - potencial formal

$\mu\text{C-PFS}$ - bomba microcontrolada de fluxo (*Microcontrolled Pumping Flow System*)

a - amplitude

A - ampère (corrente)

ΔE_s - incremento de corrente

ACh - acetilcolina

AChE - acetilcolinesterase (*Acetylcholinesterase*)

AD - portas analógicas/digitais

antiprolactina-AP – anticorpo antiprolactina marcada com a enzima fosfatase alcalina

AP- enzima fosfatase alcalina

ASCh - acetiltiocolina

AuNPs - nanopartículas de ouro

BDD - eletrodo de diamante dopado com boro (*Boron-Doped Diamond*)

BPPF₆ - hexafluorofosfato de N-butilpiridínio (*BPPF6*)

CEA - antígeno carcinoembriônico

Ch - colina

CIS - cistamina

CNF - nanofibras de carbono (*Carbon Nanofiber*)

CNTs - nanotubos de carbono (*Carbon Nanotubes*)

CPE - eletrodo de pasta de carbono (*Carbon Paste Electrode*)

CPU - unidade de processamento central (*Central Processing Unit*)

CTAB - brometo de acetil trimetilamônio (*Cetyl trimethylammonium bromide*)

CTS - quitosana

CVs – Voltamogramas cíclicos

DET - transferência direta de elétrons

DHP - dihexadecil hidrogênio fosfato (*Dihexadecyl Hydrogen Phosphate*)

DPV – voltametria de pulso diferencial (*Differential Pulse Voltammetry*)

Eap - potencial aplicado para obtenção das nanopartículas de ouro

EC - célula eletroquímica com eletrodo descartável acoplado

EDC - 1etil-3-[3- dimetilaminopropil] carbodiimida

E_{pa} - potenciais de pico anódico

E_{pc} - potenciais de pico catódico

f - frequência

FAD - flavina adenina dinucleotídeo

FIA - Análise por injeção em fluxo (*Flow Injection Analysis*)

FTIR - espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

GA - Glutaraldeído

GCE - eletrodo de carbono vítreo (*Glassy Carbon Electrode*)

GOx - glicose oxidase

hGH - hormônio do crescimento humano (*Human Growth Hormone*)

HRP - peroxidase de raiz forte (*Horseradish Peroxidase*)

IL - líquido iônico (*Ionic Liquid*)

Ig - imunoglobulinas

K_M^{app} - constante cinética aparente de Michaelis-Menten

LCD - Tela de cristal líquido (*Liquid Cristal Liquid*),

log v - Logaritmo da velocidade de varredura linear

MBs - esferas magnéticas (*Magnetic Beads*)

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MPA - ácido 3-mercaptopropiônico:

MWCNTs - nanotubos de carbono de parede múltipla (*Multiwalled Carbon Nanotubes*)

OPs - organofosforados

PAH - hidrocloreto de polialilamina (*Poly(Allylamine Hydrochloride)*)

PANI - polianilina

PDDA - poli(dialildimetilamonio);

PIC - Controlador de Interface periférica (*Peripheral Interface Controller*)

PSS - poli(4-estirenosulfonato de sódio)

PRL – Prolactina

PtNPs - nanopartículas de platina

Nano-HA - nanopartículas de hidroxihapatita;

NHS - N-hidroxisuccinimida

NiHCFNPs - nanopartículas de hexacianoferrato de níquel

RSD - desvio padrão relativo (*Relative Standard Deviation*)

SPCE - eletrodos de carbono impresso (*Screen Printed Carbon Electrode*).

SWCNTs - nanotubos de carbono de parede simples (*Singlewalled Carbon Nanotubes*)

SCGNPs/TH - nanopartículas de ouro encapadas com sulfonato /tionina;

SWV - voltametria de onda quadrada (*Square Wave Voltammetry*)

tac - tempo de acúmulo de nanopartículas de ouro

Tyr - Tirosinase (*Tyrosinase*)

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1. Valores de K_M^{app} para diferentes biossensores contendo glicose oxidase	48
Tabela 3. 2. Estudo de interferência para o eletrodo biossensor GOx–CNTs–DHP/GCE	49
Tabela 3. 3. Determinação de glicose em amostras de soro	49
Tabela 3. 4 Comparação entre alguns biossensores de terceira geração para glicose reportados na literatura e o biossensor proposto nesta tese.....	50
Tabela 4. 1. Variáveis selecionadas e respectivos níveis para a eletrodeposição das AuNPs sobre eletrodo de BDD.....	53
Tabela 4. 2. Respostas do planejamento fatorial 2^2	57
Tabela 4. 3. Valores de K_M^{app} para diferentes biossensores contendo Tyr para fenol	67
Tabela 4. 4. Estudo de interferência para o biossensor Tyr-AuNPs/BDD	68
Tabela 4. 5. Resultados obtidos na determinação de fenol em amostras de águas de torneira fortificadas utilizando o método espectrofotométrico e o método proposto..	68
Tabela 5. 1. Determinação de prolactina em soro humano.....	87
Tabela 6. 1. Determinação de Diuron em amostras de água natural	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1. Esquema de funcionamento de um biossensor de 1ª Geração. Tem-se como exemplo a reação de um biossensor com glicose oxidase, no qual há o consumo de oxigênio e glicose e a formação de H ₂ O ₂ e ácido glicônico.	4
Figura 1. 2. Esquema de funcionamento de um biossensor de 2ª Geração. Como exemplo pode se citar um biossensor contendo β-Ciclodextrina/Tetratiofulvaleno e a enzima glicose oxidase. Com o aumento da concentração de glicose há um aumento da corrente de pico de oxidação do mediador fazendo com que seja possível quantificar o analito de interesse ¹³	5
Figura 1. 3. Esquema de funcionamento de um biossensor de 3ª Geração.....	6
Figura 1. 4. Estrutura de um anticorpo que apresenta duas cadeias idênticas ligadas por pontes de dissulfeto. Região constante apresenta uma cadeia leve e uma cadeia pesada (possui uma grande sequência de aminoácidos). Já a região variável depende e varia de acordo com o antígeno que este anticorpo se liga.	10
Figura 1. 5. Imunossensores do tipo Sanduíche (A). Primeira etapa há ligação do material transdutor ao anticorpo primário, e, em seguida, a adição do antígeno e do anticorpo secundário marcado com uma enzima. Essa enzima reage com um substrato levando este a um produto que se pode quantificar. No imunossensor Competitivo (B), a primeira etapa é semelhante ao do tipo sanduíche, e, a segunda etapa adiciona-se proporções definidas dos antígenos marcados e não marcados com uma enzima, para que haja a quantificação do material de interesse.	12
Figura 1. 6. Desenho esquemático dos diferentes tipos de nanotubos de carbono Multi-wall(A) e Single-wall (B). Os diâmetros médios para os do tipo Multi-wall variam de 10 a 100 nm e do tipo Single-wall variam de 2 a 50 nm.	14
Figura 1. 7. Estrutura molecular do DHP(A) e sua possível forma polimerizada(B) ¹⁴	18
Figura 1. 8. Reação de formação de ácido glicônico e H ₂ O ₂ , além do consumo de glicose e O ₂ na presença da enzima glicose.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 1. 9. Estruturas moleculares de um pesticida carbamato (A), um organofosforado (B) e do pesticida organoclorado diuron (C).....	20
Figura 1. 10. Mecanismo de oxidação de fenóis pela enzima tirosinase.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 1. 11. Imagem de um PIC 16F877A.....	24

Figura 3. 1. Fotografias de frascos contendo CNTs 1 mg mL^{-1} dispersos em água (A) e em solução de DHP (B) por ultrassom durante 2 h.	33
Figura 3. 2. Espectros de FTIR dos nanotubos de carbono não-funcionalizados (figura inserida) e funcionalizados.....	34
Figura 3. 3. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de carbono vítreo (A) e eletrodo de carbono vítreo modificados com filmes contendo 1,0 mg de CNTs e 1,0 (B), 2,0 (C) e 3,0 (D) mg de DHP na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{KCl } 0,1\text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	35
Figura 3. 4. Imagens de MEV de DHP (A) e CNTs/DHP (B) sob superfície de carbono vítreo com o aumento de 40.000 x.	36
Figura 3. 5. Reação de EDC e NHS com os CNTs e a enzima GOx	37
Figura 3. 6. CVs dos eletrodos DHP/GCE (A); CNTs-DHP/GCE (B); CNTs-DHP/GCE na presença de solução de FAD ($1,0\text{ mmol L}^{-1}$) (C); GOx-CNTs-DHP/GCE (D); e FAD-CNTs-DHP/GCE (E) e em tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} em meio saturada com N_2	39
Figura 3. 7. Voltamogramas cíclicos do eletrodo GOx-CNTs-DHP/GCE em diferentes velocidades de varredura em tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) em meio saturado com N_2	40
Figura 3. 8. Potenciais de pico anódico e catódico (E_{pc} vs $\log v(A)$) e ΔE_p vs $\log v$ (B)).	42
Figura 3. 9. Voltamogramas cíclicos do eletrodo GOx-CNTs-DHP/GCE em tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH. Os pHs foram de 8,5, 7,0, 6,0 e 5,0, respectivamente e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	43
Figura 3. 10. Reação de redução eletroquímica do FAD a FADH_2 , e posterior adição de glicose ocorrendo a redução química do FAD a FADH_2 , fazendo com que haja diminuição da corrente de pico de redução e possível quantificação de glicose utilizando o biossensor proposto em meio de tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). ...	43
Figura 3. 11. Voltamogramas de onda quadrada do biossensor GOx-CNTs-DHP/GCE em tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) em N_2 -saturado e nas seguintes concentrações: 0; 0,05; 1,5; 2,5; 4,2; 7,0; 8,6; 11; 15; 18 e 20 mmol L^{-1} de glicose.	46
Figura 3. 12. Curva analítica do biossensor GOx-CNTs-DHP/GCE em tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) em N_2 -saturado na presença de 0,05; 1,5; 2,5; 4,25; 7,0; 8,55; 11; 13; 15; 18 e 20 mmol L^{-1} de glicose. A curva analítica apresenta a equação -	

ΔI_p (μA) = $0,011 + 30 C$ ($mmol L^{-1}$) com um coeficiente de correlação de 0,994. O limite de detecção obtido foi de $9,0 \mu mol L^{-1}$ com base na relação sinal-ruído.	47
Figura 4. 1. Esquema de fabricação do eletrodo Tyr-AuNPs/BDD.....	54
Figura 4. 2. Imagens de MEV dos eletrodos de BDD (A) e AuNPs/BDD (B) com aumento de 50000x. Potencial de eletrodeposição = $-0,4 V$ e tempo de eletrodeposição = 40 s.	58
Figura 4. 3. Voltamogramas cíclicos obtidos a partir de um eletrodo de BDD e AuNPs/BDD na presença de $[Fe(CN)_6]^{4-}$ $1,0 mmol L^{-1}$ e KCl $0,1 mol L^{-1}$, $v = 100 mV s^{-1}$	59
Figura 4. 4. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos BDD (A); AuNPs/BDD (B); e Tyr-AuNPs/BDD (C) em tampão fosfato $0,1 mol L^{-1}$ (pH 7,0) e velocidade de varredura de $50 mV s^{-1}$. Para o biossensor as reações redox estão relacionadas ao processo redox entre Cu (I) e Cu (II) presentes na enzima tirosinase.....	60
Figura 4. 5. Voltamogramas cíclicos do eletrodo Tyr-AuNPs/BDD em diferentes velocidades de varredura de varredura em tampão fosfato $0,1 mol L^{-1}$ (pH 7,0).....	61
Figura 4. 6. Potenciais de pico anódico e catódico (E_{pc} vs o $\log v$ (A)) e ΔE_p vs $\log v$ (B).	62
Figura 4. 7. Voltamogramas de onda quadrada do biossensor Tyr-AuNPs/BDD em tampão fosfato $0,1 mol L^{-1}$ (1), e na presença de fenol $1,0 \times 10^{-6} mol L^{-1}$ (2). Os parâmetros de voltametria de onda quadrada foram $f=50 Hz$; $a= 20 mV$; $\Delta E=2 mV$. 63	
Figura 4. 8. Voltamogramas de onda quadrada do biossensor Tyr-AuNPs/BDD em tampão fosfato $0,1 mol L^{-1}$, na presença de diversas concentrações: 0; 0,1; 1,0; 2,0; 4,9; 7,0; 9,0 e $11 \mu mol L^{-1}$ de fenol. Os parâmetros de voltametria de onda quadrada foram $f=50 Hz$; $a= 50 mV$; $\Delta E=4 mV$	65
Figura 4. 9. Curva analítica do biossensor Tyr-AuNPs/BDD em tampão fosfato $0,1 mol L^{-1}$ para concentrações de fenol variando de 0,1 a $11,0 \mu mol L^{-1}$. A equação da reta foi de ΔI_p (μA) = $1,42 + 1,8 C$ ($\mu mol L^{-1}$); um coeficiente de correlação de 0,994 e o limite de detecção foi de $0,07 \mu mol L^{-1}$ para fenol	65
Figura 5. 1. Imagem do eletrodo de carbono impresso	73
Figura 5. 2. Desenho esquemático do imunossensor com as etapas e as reações bioquímicas e eletroquímica envolvidas em seu funcionamento.....	74
Figura 5. 3. Reação de hidrólise do 1-naftil fosfato levando a formação de 1-naftol na presença da enzima fosfatase alcalina	Erro! Indicador não definido.

Figura 5. 4. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos AuNPs/SPCEs preparados pela eletrodeposição de AuNPs a partir de soluções de HAuCl_4 0,1 (-); 5,0 (-) e 1,0 mmol L^{-1} (-); em meio de tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} (pH 7,0); $i_{\text{dep}} = -150 \mu\text{A}$ e $t_{\text{dep}}=150 \text{s}$	76
Figura 5. 5. Imagens de MEV do eletrodo AuNPs/SPCE.	77
Figura 5. 6. Voltamogramas de pulso diferencial para os eletrodos AuNPs/SPCE, SPCE e SPAu na presença de naftol 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} (pH 7,0). Velocidade de varredura 10 mV s^{-1} , amplitude de pulso 50 mV.	78
Figura 5. 7. Voltamogramas de pulso diferencial do imunossensor completo e imunossensor na presença e ausência de prolactina em meio de 1-naftil-fosfato 0,05 mol L^{-1}	79
Figura 5. 8. Diagramas de Nyquist para espectroscopias de impedância na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5 mmol L^{-1} em meio de KCl 0,1 mol L^{-1} para SPCE (\blacktriangledown); AuNPs/SPCE (\blacksquare) e estreptavidina/AuNPs/SPCE (\blacktriangle).	80
Figura 5. 9. Estudos de concentração e tempo de incubação para o anticorpo antiprolactina biotinizada, usando 8 μL PRL na concentração de 1,0 mg mL^{-1} e uma diluição de 1:200 de solução antiprolactina-AP.	81
Figura 5. 11. Influencia de concentrações e tempo de incubação da antiprolactina-AP no desenvolvimento do imunossensor proposto.	82
Figura 5. 12. Voltamogramas de pulso diferencial para os imunossensores na presença de 1-naftil fosfato 0,05 mol L^{-1} em meio de tampão Trizma (pH 9,0) com diferentes concentrações de 15; 25; 200; 300; 400; 600; 750; 900 e 1000 ng mL^{-1} de PRL.	84
Figura 5. 13. Curva analítica para os imunossensores em diferentes concentrações de PRL na presença de 1-naftil fosfato 0,05 mol L^{-1} em meio de tampão Trizma (pH 9,0). A equação da reta foi de $I_p (\mu\text{A}) = 0,98 + 0,00367 C (\text{ng mL}^{-1})$; um coeficiente de correlação de 0,995 e o limite de detecção foi de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para PRL.	84
Figura 5. 14. Voltamogramas de pulso diferencial para prolactina, estradiol, progesterona, estriol, hormônio do crescimento humano (hGH) e cortisol.	86
Figura 6.1. O diagrama funcional do sistema microcontrolado de bombeamento (μC -sistema de fluxo microcontrolado) é composto pelas seguintes unidades principais: Tela de LCD (<i>do inglês, Liquid Cristal Display</i>), válvulas solenoides de 3 vias, célula eletroquímica, bomba de ar, chaves de controle, controle de temperatura (sensor de	

temperatura e cooler), compartimento de amostragem. Todas as unidades são controladas por um microcontrolador como unidade de controle central.	91
Figura 6. 2. Esquema do sistema de multicomutação em fluxo utilizando bomba de aquário (P), 2 válvulas solenoides (V1 e V2), conector para confluência (z), compartimentos para amostras (E e S), compartimento para resíduos (W) e célula eletroquímica com eletrodo descartável acoplado (EC).	92
Figura 6. 3. Imagens da célula eletroquímica de fluxo desenvolvida utilizada no sistema de análise por injeção em fluxo.....	93
Figura 6. 4. Preparação das AuNPs em meio de citrato de sódio. Em um balão reacional contendo 150 mL de uma solução aquosa de HAuCl_4 $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $90 \text{ }^\circ\text{C}$, foram adicionados 7,5 mL de uma solução de citrato de sódio $0,3 \text{ mol L}^{-1}$. Essa mistura foi mantida em agitação a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ até o aparecimento de uma cor vermelha. Em seguida, o meio reacional foi rapidamente resfriado até a temperatura ambiente com auxílio de gelo.....	94
Figura 6. 5. Imagem da suspensão das nanopartículas de ouro.....	95
Figura 6. 6. Fabricação do biossensor AChE-AuNPs-PAH/SPCE.....	96
Figura 6. 7. Imagem do sistema μC -PFS desenvolvido	98
Figura 6. 8. Baixo, médio e alto, são os níveis de vazão que o equipamento pode operar. Os valores médios das vazões com seus respectivos desvios foram $1,5 \pm 0,2 \text{ mL}$; $3,0 \pm 0,3 \text{ mL}$ e $4,5 \pm 0,1 \text{ mL}$	99
Figura 6.9. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos SPCE (–) e AuNPs-PAH/SPCE (–) em velocidade de varredura 50 mV s^{-1} , em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$	100
Figura 6. 10. Imagem de MEV das AuNPs (A) e AuNPs-PAH (B).....	101
Figura 6.11. Voltamogramas cíclicos do eletrodo AChE-AuNPs-PAH/SPCE (A) meio de ASCh $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e na presença Diuron $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (B), nas mesmas condições; velocidade de varredura 50 mV s^{-1}	102
Figura 6. 12. Esquema de reação do biossensor AChE-AuNPs/SPCE. No primeiro caso mostra a reação de formação da tiocolina realizada pela enzima AChE imobilizada na superfície do eletrodo AuNPs/SPCE. No segundo caso, há ligação covalente entre o pesticida Diuron e a enzima AChE, fazendo com que haja inibição enzimática e uma diminuição da produção de tiocolina.	103
Figura 6.13. Estudo do tempo de inibição para o biossensor na presença de ASCh $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e Diuron $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	104

Figura 6. 14. Reação da acetilcolina na presença da enzima acetilcolinesterase, e posterior ligação irreversível do centro ativo (serina) da enzima AChE com Diuron onde há inibição da formação de tiocolina e ácido acético. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 6. 15. Amperogramas do biossensor AChE-AuNPs-PAH/SPCE em meio de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), ASCh $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e concentrações de $8,0 \times 10^{-8}$; $2,5 \times 10^{-7}$; $7,1 \times 10^{-7}$; $8,5 \times 10^{-7}$; $9,5 \times 10^{-7}$; $1,05 \times 10^{-6}$; $1,1 \times 10^{-6}$ e $1,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de Diuron. $E_{ap}=0,8 \text{ V}$, vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ e tempo de inibição de 8 min..... 106

Figura 6. 16. Curva analítica do biossensor AChE-AuNPs-PAH/SPCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ASCh $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, e diferentes concentrações de Diuron. A equação da reta foi $-\Delta I/p (\mu\text{A}) = 0,98 + 1,20 \times 10^7 [\text{Diuron}]$ com um coeficiente de correlação de 0,994. O limite de detecção obtido foi de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ 107

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Considerações Gerais.....	2
1.2. Biossensores	2
1.3. Tipos de biossensores	3
1.3.1. Biossensor de 1ª geração	3
1.3.2. Biossensor de 2ª geração	4
1.3.3. Biossensor de 3ª geração	5
1.4. Tipos de imobilização enzimática	6
1.4.1. Oclusão em gel.....	6
1.4.2. Adsorção física	7
1.4.3. Microencapsulação	7
1.4.4. Ligação covalente em suportes.....	7
1.4.4.1. EDC/NHS	8
1.4.4.2. Glutaraldeído	8
1.4.4.3. Cistamina.....	8
1.4.5. Ligação covalente cruzada	9
1.5. Inibição enzimática	9
1.6. Imunossensores.....	10
1.7. Biossensores à base de filmes.....	13
1.8. Nanotubos de carbono.....	13
1.9. Nanopartículas de ouro.....	15
1.10. Eletrodos à base de carbono.....	16
1.11. DHP	17
1.12. Polieletrólitos	18
1.13. Glicose oxidase.....	19
1.14. Acetilcolinesterase e pesticidas	20
1.15. Tirosinase e fenóis	21
1.16. Prolactina	23
1.17. Análise por injeção em fluxo.....	23
1.18. Microcontrolador PIC	24
2. Objetivos gerais.....	27

3. <i>Biossensor de terceira geração para glicose utilizando nanotubos de carbono imobilizados em filme de dihexadecil hidrogênio fosfato (DHP)</i>	29
3.1. <i>Objetivos específicos</i>	29
3.2. <i>EXPERIMENTAL</i>	29
3.2.1. <i>Reagentes</i>	29
3.2.2. <i>Funcionalização (tratamento ácido) dos nanotubos de carbono de parede múltipla</i>	30
3.2.3. <i>Preparação do biossensor GOx-CNTs-DHP/GCE</i>	30
3.2.4. <i>Morfologia</i>	31
3.2.5. <i>Modos de vibração</i>	31
3.2.6. <i>Medidas eletroanalíticas</i>	31
3.2.7. <i>Célula eletroquímica</i>	32
3.2.8. <i>Eletrodos</i>	32
3.3. <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	32
3.3.1. <i>Teste de dispersão</i>	32
3.3.6. <i>Estudo do biossensor GOx-CNTs-DHP/GCE</i>	38
3.3.7. <i>Determinação de glicose por voltametria de onda quadrada</i>	44
3.4. <i>CONCLUSÕES</i>	50
4. <i>Biossensor de terceira geração baseado em um eletrodo de diamante dopado com boro modificado com nanopartículas de ouro e tirosinase</i>	52
4.1. <i>Objetivos específicos</i>	52
4.2. <i>EXPERIMENTAL</i>	52
4.2.1. <i>Reagentes</i>	52
4.2.2. <i>Eletrodeposição das AuNPs em BDD</i>	52
4.2.3. <i>Preparação do biossensor Tyr-AuNPs/BDD</i>	54
4.2.4. <i>Morfologia</i>	54
4.2.5. <i>Medidas eletroanalíticas</i>	55
4.2.6. <i>Célula eletroquímica</i>	55
4.2.7. <i>Eletrodos</i>	55
4.2.8. <i>Amostras</i>	55
4.3. <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	56
4.3.1. <i>Obtenção e caracterização do eletrodo AuNPs/BDD</i>	56
4.3.1.1. <i>Obtenção do eletrodo AuNPs/BDD</i>	56
4.3.1.2. <i>Caracterização do eletrodo AuNPs/BDD</i>	57
4.3.2. <i>Biossensor Tyr-AuNPs/BDD</i>	59

4.3.3. Determinação de fenol por voltametria de onda quadrada.....	63
4.3.4. Estudo de interferentes	67
4.3.5. Aplicação	68
4.4. CONCLUSÕES.....	69
5. Imunossensor para prolactina utilizando eletrodos de carbono impresso modificados com nanopartículas de ouro	71
5.1. Objetivos específicos	71
5.2. EXPERIMENTAL	71
5.2.1. Reagentes e soluções	71
5.2.2. Amostras.....	72
5.2.3. Medidas eletroquímicas.....	72
5.2.4. Eletrodeposição das nanopartículas de ouro.....	73
5.2.5. Preparação do imunossensor.....	73
5.2.6. Determinação de prolactina em amostras de soro	75
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
5.3.1. Preparação do eletrodo AuNPs/SPCE	75
5.3.2. Imunossensor antiprolactina-AP – prolactina – antiprolactina-biotinilada – estreptavidina – AuNPs/SPCE	78
5.3.3. Determinação de prolactina por voltametria de pulso diferencial	83
5.3.4. Estudo de interferentes	85
5.3.5. Determinação de prolactina em amostras de soro	86
5.4. CONCLUSÕES.....	87
6. Determinação em fluxo de Diuron empregando um biossensor descartável contendo acetilcolinesterase e nanopartículas de ouro em um filme de hidróxido de poli(alilamina)	90
6.1. Objetivos específicos	90
6.2. EXPERIMENTAL	90
6.2.1. Reagentes	90
6.2.2. Sistema em fluxo com bombeamento microcontrolado	91
6.2.3. Medidas eletroanalíticas.....	92
6.2.4. Eletrodos.....	93
6.2.5. Síntese das nanopartículas de ouro.....	93
6.2.6. Preparação do filme de AuNPs-PAH/SPCE	95
6.2.7. Preparação do biossensor AChE-AuNPs-PAH/SPCE	95
6.3.1. Desenvolvimento da bomba microcontrolada (μ C-PFS).....	96

6.3.1.1. Projeto da Bomba microcontrolada	96
6.3.1.2. Procedimento de funcionamento do μ C-PFS	98
6.3.2. Caracterização do eletrodo AuNPs-PAH/SPCE	100
6.3.3. Caracterização eletroquímica do biossensor AChE-AuNPs-PAH/SPCE	101
6.3.4. Potencial de trabalho e tempo de inibição.....	104
6.3.5. Efeito dos parâmetros do sistema em fluxo	105
6.3.6. Determinação de Diuron por amperometria	105
6.3.7 Estudo de interferentes.....	108
6.4. CONCLUSÕES.....	109
7. Conclusões gerais e sugestões de trabalhos futuros.....	111
7.1. Conclusões gerais	111
7.2. Perspectivas futuras.....	112
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

A construção de biossensores é uma alternativa na preparação de eletrodos que pode propiciar bons resultados na aplicação em diversas áreas, como por exemplo, em análises clínicas, de alimentos e controle ambiental. As vantagens da aplicação dos biossensores estão relacionadas à facilidade do seu preparo, custo relativamente baixo, versatilidade e seletividade para quantificação dos mais diversos compostos de interesse. Além disso, a miniaturização do sistema de detecção e o desenvolvimento de biossensores descartáveis tem atraído considerável atenção, o que torna os biossensores dispositivos promissores no processo de determinação dos mais diferentes analitos.

Outro fato que tem atraído grande interesse é o desenvolvimento de novas arquiteturas para os biossensores. Neste contexto, os nanotubos de carbono bem como as nanopartículas metálicas são excelentes materiais para o desenvolvimento de biossensores. Juntamente com o material biológico de interesse, estes materiais podem melhorar a resposta analítica em termos da diminuição do sobrepotencial de trabalho, promovendo a transferência de elétrons com maior facilidade.

1.2. Biossensores

Um biossensor consiste de um elemento de biorreconhecimento com alta seletividade, como uma enzima imobilizada, um anticorpo, tecido vegetal ou animal, ou um microorganismo, em contato íntimo com um transdutor que converte a reação de reconhecimento em um sinal eletrônico mensurável^{1,2}. No caso de um biossensor eletroquímico, espécies redox na camada de reconhecimento são oxidadas ou reduzidas, gerando uma corrente que conduz a uma medida de concentração e pode ser utilizada no monitoramento de analitos de interesse ambiental, biológico, farmacêutico, industrial e tecnológico^{1,2}.

Os biossensores eletroquímicos enzimáticos requerem um eletrodo-substrato, no qual a enzima é imobilizada diretamente por adsorção, ligação covalente, ou por encapsulamento dentro de uma camada de revestimento como um polímero

condutor permeável ou reticulado²⁻⁴. A retenção da atividade da enzima imobilizada e ao longo do tempo, com ou sem uso, são igualmente importantes.

A maioria dos biossensores eletroquímicos enzimáticos utiliza um mediador redox que permite a medição dos produtos da reação enzimática sem transferência eletrônica direta à enzima. Por exemplo, a atuação de enzimas oxidases produz peróxido de hidrogênio que pode ser medido diretamente no eletrodo ou indiretamente com o auxílio de um mediador redox. Os estudos recentes têm sido dirigidos para melhorar a estabilidade e a eficiência catalítica dos mediadores redox. Há diversas estratégias de imobilização de enzimas, conduzindo a diferentes arquiteturas: monocamadas^{5,6}; multicamadas⁷; filmes⁸ ou mesmo compósitos⁹.

1.3. Tipos de biossensores

1.3.1. Biossensor de 1ª geração

Os biossensores de 1ª geração são aqueles que se baseiam na obtenção dos sinais amperométricos, produzidos pela oxidação ou redução de um reagente ou produto da reação do substrato e a enzima sobre a superfície do eletrodo¹⁰.

Nesta classe de biossensores, tem-se como exemplo aqueles à base de glicose oxidase, em que pode se monitorar o consumo de O₂ ou a produção de H₂O₂, na reação da oxidação da glicose (substrato) com formação de ácido glicônico e peróxido de hidrogênio (Figura 1.1). O primeiro biossensor que se utilizou desse mecanismo foi o proposto por Clark e Lyons em 1962^{2,11}. Ele tinha como sensor base o eletrodo de oxigênio de Clark, no qual foi realizada a imobilização física da enzima glicose oxidase empregando-se uma membrana de cuprofane (celulose recuperada), e então monitorada a redução de O₂ na presença de glicose.

Existem algumas desvantagens no uso dos biossensores de primeira geração, tais como elevado potencial a ser aplicado ao eletrodo e a necessidade do controle da concentração de O₂, uma vez que a variação da concentração de oxigênio irá afetar a resposta analítica do biossensor.

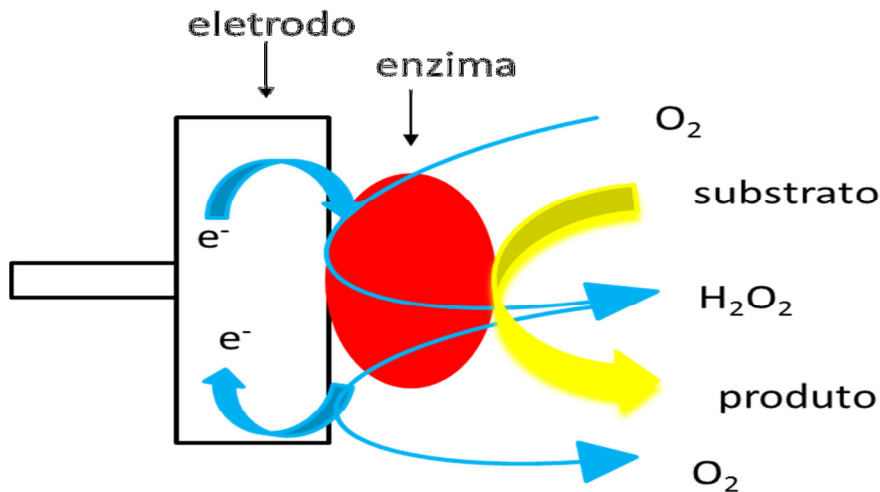


Figura 1. 1. Esquema de funcionamento de um biossensor de 1ª Geração. Tem-se como exemplo um biossensor para glicose contendo glicose oxidase imobilizada na membrana de um eletrodo para O_2 (Eletrodo de Clark). Nesse biossensor, o consumo da concentração de oxigênio ou da produção de peróxido de hidrogênio pode ser monitorado.

1.3.2. Biossensor de 2ª geração

Biossensores de 2ª Geração são aqueles baseados na eletroatividade auxiliada por mediadores de elétrons, sendo o potencial de trabalho uma função do mediador livre em solução ou imobilizado juntamente com a enzima. Os mediadores tem a finalidade de diminuir o potencial de trabalho aplicado (potencial de detecção) aos biossensores eletroquímicos enzimáticos¹² (Figura 1.2).

Porém, quando estes mediadores são utilizados em conjunto com as enzimas eles facilitam não apenas a transferência de elétrons entre o eletrodo e a enzima, mas também várias outras reações paralelas, que poderiam acarretar em interferência nas medidas de interesse. Como exemplos de mediadores pode se citar os hexacianoferratos, derivados do ferroceno, derivados de sais orgânicos e quinonas, moléculas pequenas com potenciais redox ativos, que podem reagir com o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo, realizando a mediação de elétrons entre a enzima e o eletrodo .

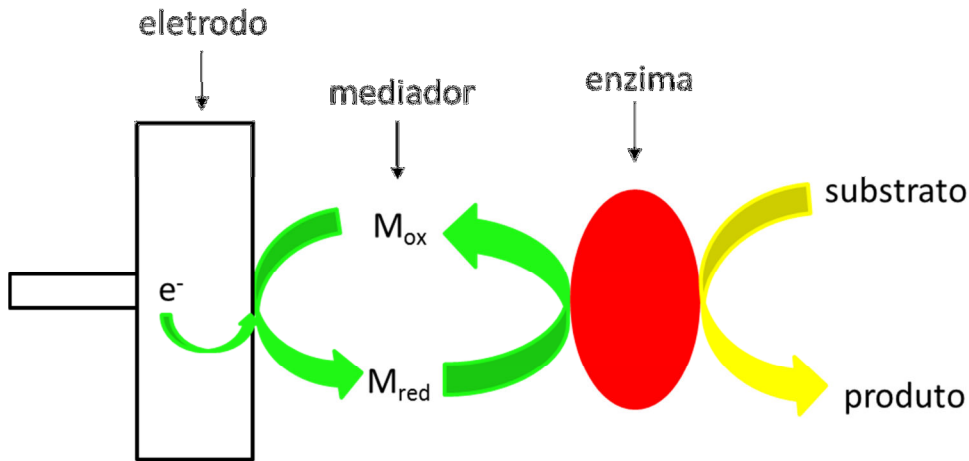


Figura 1. 2. Esquema de funcionamento de um biossensor de 2ª Geração. Como exemplo pode se citar um biossensor contendo β -Ciclodextrina/Tetratiofulvaleno e a enzima glicose oxidase. Com o aumento da concentração de glicose, há um aumento da corrente de pico de oxidação do mediador fazendo com que seja possível quantificar o analito de interesse¹³.

1.3.3. Biossensor de 3ª geração

Os biossensores de 3ª Geração são também chamados de biossensores com transferência direta de elétrons (DET) entre o par redox do centro ativo da biomolécula e a superfície do eletrodo (Figura 1.3). Nos biossensores de terceira geração a transferência de elétrons está associada, ou ocorre durante a transformação catalítica do substrato para o produto^{2,12,14}. O centro ativo da enzima age como um eletrocatalisador, facilitando a transferência de elétrons entre o eletrodo e a molécula de substrato não envolvendo nenhum mediador neste processo. Assim, este tipo de biossensor geralmente oferece melhor seletividade, porque são capazes de operar em uma faixa menor de potenciais e, conseqüentemente, os torna menos expostos às reações de interferência.

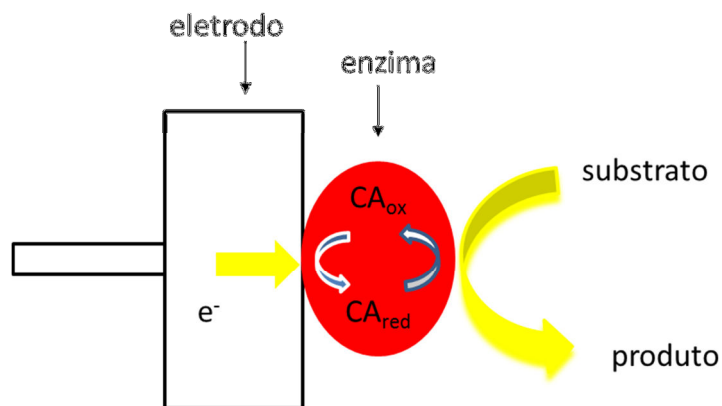


Figura 1. 3. Esquema de funcionamento de um biossensor de 3ª Geração

1.4. Tipos de imobilização enzimática

Como relatado por Marques e Yamanaka¹⁵ e Fatibello-Filho e Capelato², o tipo de imobilização de uma enzima em um suporte pode alterar a resposta analítica do biossensor. Cada método de imobilização pode apresentar vantagens ou desvantagens, sendo que cada tipo de imobilização deve ser estudado levando-se em consideração o tempo de vida, exatidão, precisão, reprodutibilidade, sensibilidade, LD ou LQ do biossensor desenvolvido. Os tipos de imobilização mais conhecidos são oclusão em gel, adsorção física, encapsulação, ligação covalente e ligação covalente cruzada.

1.4.1. Oclusão em gel

O tipo de imobilização por oclusão são aqueles baseados no confinamento da enzima dentro de espaços intersticiais de um gel, permitindo a difusão de substratos e dos produtos pelo polímero e a reação enzimática de interesse. Há vários materiais que são utilizados para oclusão das enzimas, tais como géis de álcoois polivinílicos, de poliácridamida, de grupos aniônicos e catiônicos, entre outros. Uma desvantagem do método de oclusão está relacionada à possível perda da atividade enzimática por lixiviação.

1.4.2. Adsorção física

O tipo de imobilização utilizando adsorção física da enzima é uma das maneiras mais simples de imobilização. Ela se baseia nas interações físicas entre a enzima e a matriz de interesse, onde apresenta as vantagens de apresentar baixo custo e facilidade da imobilização. Já, como desvantagens, pode-se citar a falta de controle da temperatura, pH e força iônica que pode levar ao desprendimento (lixiviação) da enzima do suporte.

1.4.3. Microencapsulação

Esse tipo de imobilização se baseia no aprisionamento da enzima em uma membrana localizada na superfície do eletrodo. Esta retém a enzima, apresentando determinada porosidade que permite a difusão do substrato e dos produtos formados na reação. Como exemplos de membranas tem-se o Nylon, quitosana, acetato de celulose e policarbonatos. A principal desvantagem está relacionada ao impedimento dos fenômenos de transferência de massa do substrato e aos produtos da reação ocasionada pela membrana a ser selecionada.

1.4.4. Ligação covalente em suportes

A ligação covalente é o tipo mais utilizado no processo de imobilização enzimática, que se dá por ligações entre os determinados grupos funcionais da enzima e a superfície do material presente no transdutor. Este tipo de imobilização ocorre a partir de grupos não funcionais da enzima (parte não essencial para a atividade catalítica) e grupos reativos do material de suporte (hidroxilas, carbonilas, aminas, grupos fenólicos, imidazólicos e tióis). Dentre os materiais de suporte mais utilizados estão polímeros insolúveis (quitosana, celulose, dextrana, sefaroze, entre outros) O hidrocloreto de 1-etil-3-[3- dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), epícloridrina, glicoxal, amonotióis e o glutaraldeído são exemplos de agentes de ligação covalente utilizados na construção de biossensores.

1.4.4.1. EDC/NHS

O 1-etil-3-(dimetilaminopropil) (EDC) é amplamente conhecido por imobilizar biomoléculas com ligações covalentes¹⁶. O EDC é uma molécula que promove a formação de ligações amida. Além de reagir com carboxilatos, o EDC sozinho forma um complexo estável com grupos aminoácidos expostos. O objetivo da adição de N-hidroxisuccinimida (NHS) às reações EDC é aumentar a estabilidade do intermediário ativo e aumentar o número de ligações de moléculas carboxiladas com grupamentos amino expostos das enzimas de interesse¹⁷⁻¹⁹.

1.4.4.2. Glutaraldeído

O método de imobilização covalente em suporte com glutaraldeído é um dos métodos mais utilizados até os dias de hoje, no qual os grupos amino da enzima podem se ligar covalentemente, ou mesmo produzir uma rede rígida, com os grupos amino do material de suporte de interesse^{20,21}. Esse método confere boa estabilidade frente às variações de pH, força iônica e temperatura, além deste reagente possuir baixo custo.

1.4.4.3. Cistamina

A cistamina (2,2-diaminoetildissulfeto) é um amino-sulfeto orgânico de cadeia curta muito utilizada para a preparação de camadas auto-organizadas. Os átomos de enxofre dessa molécula se ligam fortemente a superfícies de ouro, introduzindo a este, grupamentos amino que estão do lado oposto aos sulfetos²². Os eletrodos modificados com amino-grupos por sua vez podem fornecer sítios para ligação covalente com várias moléculas, como por exemplo, o glutaraldeído que pode fazer a ligação covalente cruzada entre a enzima e o suporte como descrito no item 1.4.4.2.

1.4.5. Ligação covalente cruzada

Ligação covalente cruzada é um método de imobilização que se baseia na elaboração de uma grande rede rígida entre o agente de reticulação e a enzima^{2,15}. Este método tem como vantagem a ligação direta entre o transdutor e a enzima através do agente de ligação covalente ou do agente de reticulação. Por outro lado, a desvantagem é que esta ligação (transdutor/enzima) pode introduzir barreiras dificultando o processo de difusão, o que ocasiona um aumento no tempo de resposta do biossensor. Outra desvantagem pode ser a perda da atividade enzimática devido a possíveis mudanças das conformações do centro ativo enzimático.

1.5. Inibição enzimática

A inibição enzimática está relacionada ao processo em que determinada substância é capaz de interferir de maneira eficiente e específica, em uma reação enzimática, podendo desacelerar ou diminuir a especificidade desta reação. Há duas formas de inibição enzimática conhecidas, a inibição reversível e a inibição irreversível, as quais apresentam como principais diferenças as formações de complexos entre a enzima e o inibidor e, que podem ou não serem reversíveis, dependendo de cada processo envolvido¹⁵. Os inibidores que são reversíveis produzem um complexo entre o inibidor e a enzima em um determinado sistema reacional, no qual a enzima apresenta um grau definido de inibição, que é dependente das concentrações do inibidor, de seu substrato e da enzima, sendo constante a partir de um determinado espaço de tempo. Na inibição irreversível, o inibidor liga-se ao centro ativo da enzima de maneira irreversível, geralmente por ligações covalentes, promovendo a destruição de grupos funcionais essenciais para a enzima. Outro fator importante é que essa inibição é progressiva, a qual aumenta com o tempo, até atingir seu valor máximo.

1.6. Imunossensores

As Imunoglobulinas (Ig) ou anticorpos são glicoproteínas sintetizadas e excretadas por células plasmáticas derivadas dos linfócitos B. Elas estão presentes no plasma, tecidos e secreções, onde atacam proteínas estranhas ao corpo, chamadas de antígenos, realizando assim a defesa do organismo. Os anticorpos possuem duas cadeias idênticas ligadas por pontes de dissulfeto.

Os anticorpos apresentam duas regiões: uma constante e uma variável. A região constante que apresenta 2 tipos de cadeia: a pesada (que se diferenciam pela sequência de aminoácidos presente em cada anticorpo) e a leve que está ligada covalentemente a cadeia pesada por pontes de dissulfeto. A outra região é variável, pois depende de qual antígeno este anticorpo se ligará. O esquema de um anticorpo é apresentado na Figura 1.4.

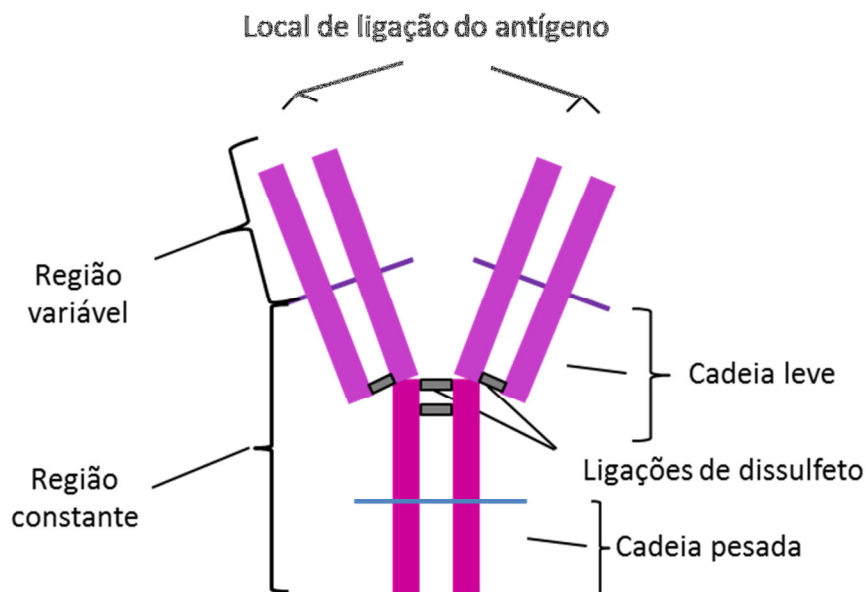


Figura 1. 4. Estrutura de um anticorpo que apresenta duas cadeias idênticas ligadas por pontes de dissulfeto. Região constante apresenta uma cadeia leve e uma cadeia pesada (possui uma grande sequência de aminoácidos). Já a região variável depende e varia de acordo com o antígeno que este anticorpo se liga.

Os imunossensores são aqueles que podem fazer a transdução das interações antígeno-anticorpo diretamente em sinais físicos. O desenho e preparação de uma interface ideal entre o biomaterial e o detector é parte fundamental no desenvolvimento dos imunossensores. Para que possa ser acompanhada a determinação do antígeno de interesse utilizam-se de anticorpos ou antígenos marcados afim de investigar a formação de complexos antígeno-anticorpo. Os imunossensores apresentam algumas vantagens importantes, tais como, uma alta velocidade de resposta e simplicidade de operação. São conhecidos dois tipos de imunossensores: os do tipo “sanduíche” e os do tipo competitivo, como observados nas Figuras 1.5 A e 1.5 B.

Nos imunossensores do tipo sanduíche dois anticorpos são ligados ao antígeno sendo que um deles é marcado e reage com o substrato levando a um produto de interesse²³. Primeiramente, há ligação do anticorpo primário ao material transdutor. Em seguida, adiciona-se o antígeno e finalmente o anticorpo marcado com alguma enzima que reage com o substrato levando ao produto.

Já para os imunossensores do tipo competitivo, há uma competição entre o antígeno marcado e o não marcado com determinada substância de interesse que reage com o substrato levando a um produto²⁴. Neste caso, primeiramente, há a ligação do anticorpo primário ao material transdutor e, por conseguinte, há adição do antígeno marcado com uma enzima de interesse que reage com determinado substrato, ou do antígeno não marcado. A quantificação nesse caso se dá pela adição controlada de diferentes proporções do antígeno marcado e o não marcado.

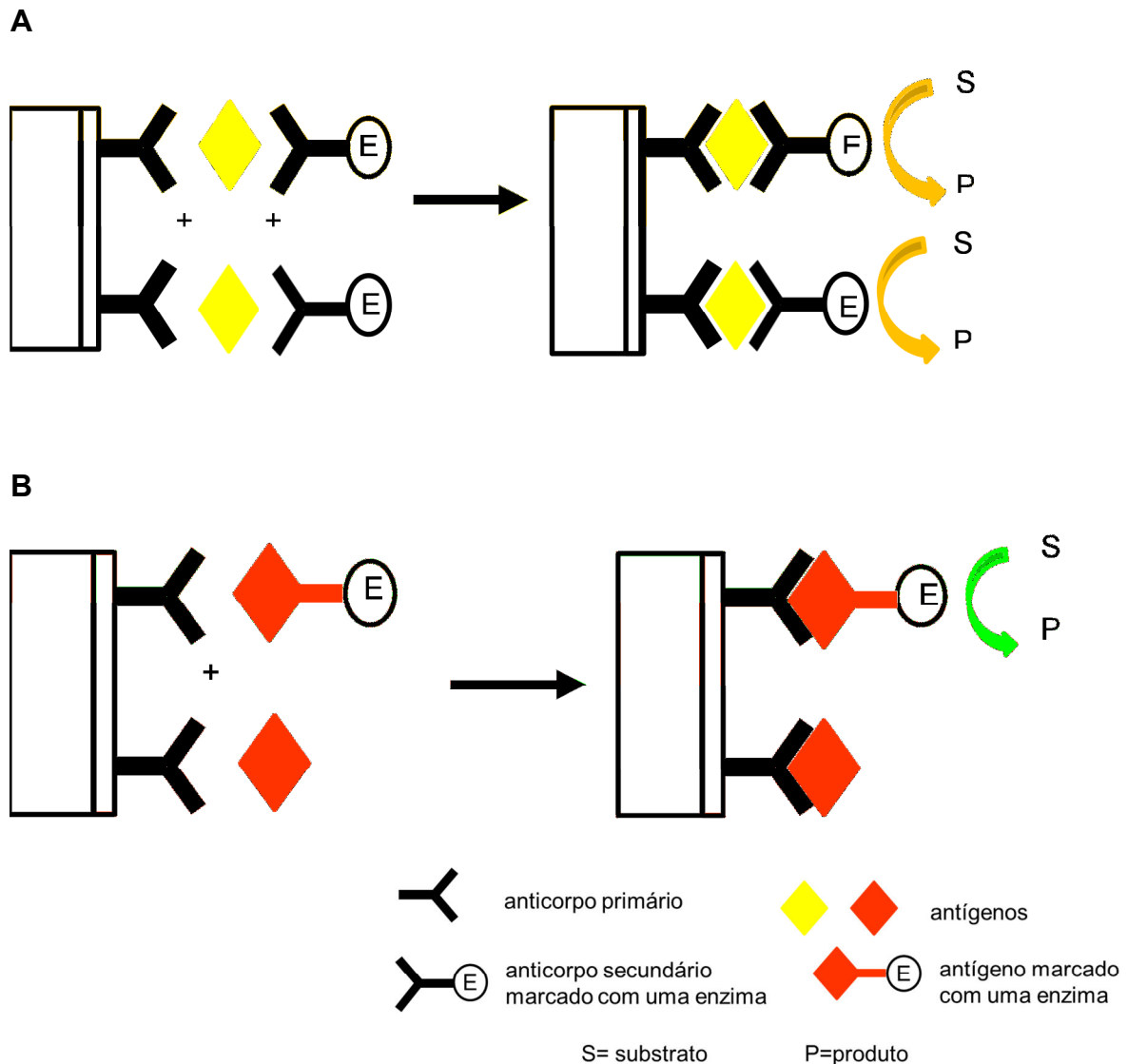


Figura 1. 5. Imunossensores do tipo Sanduíche (A). Primeira etapa há ligação do material transdutor ao anticorpo primário, e, em seguida, a adição do antígeno e do anticorpo secundário marcado com uma enzima. Essa enzima reage com um substrato levando este a um produto que se pode quantificar. No imunossensor Competitivo (B), a primeira etapa é semelhante ao do tipo sanduíche, e, a segunda etapa adiciona-se proporções definidas dos antígenos marcados e não marcados com uma enzima, para que haja a quantificação do material de interesse.

1.7. Biossensores à base de filmes

Há diversas estratégias de imobilização de enzimas nos eletrodos tais como pasta, compósitos e filmes. Dentre os biossensores à base de filmes tem-se os do tipo casting, layer by layer, Langmuir Blodget, Spin Coating e eletrodeposição. Um biossensor na forma de filme necessita boa estabilidade, boa aderência ao eletrodo de trabalho e não impedir a transferência eletrônica da interface eletrodo/solução. Dentre os eletrodos mais utilizados temos os eletrodos de carbono vítreo, de platina, grafite, ouro e diamante dopado com boro. Já os materiais que vem sendo utilizados para este tipo de biossensor são grafeno, nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas e polímeros condutores.

1.8. Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono (*do inglês Carbon Nanotubes*, CNTs) têm sido amplamente utilizados para o desenvolvimento de sensores e biossensores modificados fornecendo propriedades, como por exemplo, o aumento da área eletroativa, e diminuição do sobrepotencial de trabalho²⁵. Eles têm sido utilizados na fabricação de biossensores eletroquímicos enzimáticos²⁵⁻³¹ e desde sua descrição por Iijima³² em 1991, houve um aumento acentuado de estudos sobre as propriedades físicas e químicas destes materiais^{31,33,34}.

Os nanotubos de carbono apresentam estruturas tubulares na ordem de nanômetros e comprimentos de micrometros, tendo uma área superficial muito maior quando comparada com o seu volume. Eles podem ser de parede simples (*em inglês Single-wall Carbon Nanotubes* (SWCNTs)) ou de parede múltipla (*em inglês Multi-wall Carbon Nanotubes* (MWCNTs)) com até dezenas de cilindros concêntricos com um espaçamento entre eles de 0,3-0,4 nm (Figura 1.6). A dopagem dos CNTs ou a sua funcionalização, por exemplo, com enzimas, proteínas redox, pode mudar as suas propriedades químicas e/ou mecânicas e apresentam aplicações diversas em várias áreas de interesse³³. Os CNTs podem ser utilizados para modificar a superfície de eletrodos, melhorando as propriedades de detecção destes dispositivos eletroquímicos³⁵⁻³⁹.

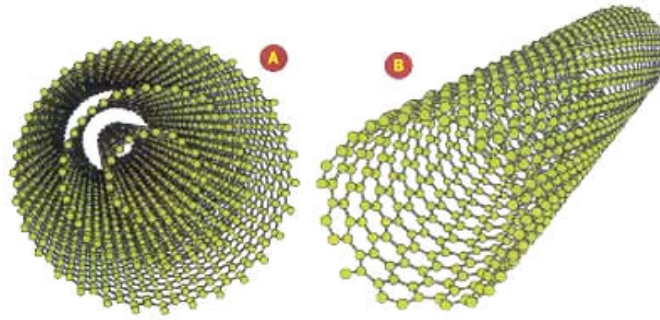


Figura 1. 6. Desenho esquemático dos diferentes tipos de nanotubos de carbono Multi-wall(A) e Single-wall (B). Os diâmetros médios para os do tipo Multi-wall variam de 10 a 100 nm e do tipo Single-wall variam de 2 a 50 nm.

A condução dos CNTs depende de vários fatores, o que lhe dá características de um metal ou mesmo de um semiconductor. A forma como ele foi obtido, tratado ou mesmo como é sua conformação para a formação do tubo pode influenciar. Por exemplo a direção do plano da folha de grafeno e seu diâmetro pode dar diferentes estruturas morfológicas aos CNTs. No caso dos MWCNTs, pode se observar as estruturas nos formatos do tipo “tubo oco”, “espinha de peixe” e “bambu”. Além disso, as extremidades dos tubos podem apresentar duas formas, o plano basal e o plano de borda. Acredita-se que o plano de borda é o maior responsável pela condução eletrônica dos CNTs^{30,40}.

A tratamento ácido dos CNTs é assunto de várias revisões^{28,41}. Como as paredes dos CNTs possuem baixa reatividade, a funcionalização é utilizada para a geração de grupos funcionais (por exemplo, - COOH, - OH, - C=O ou C-NH₂) na superfície e/ou extremidades do material. Com isto, os CNTs podem ser utilizados para a imobilização de moléculas pequenas ou moléculas biologicamente ativas, por exemplo, enzimas, além de poder ser modificado com polímeros sobre sua parede.

O uso dos CNTs para aplicações eletroanalíticas se deve ao fato deste material promover a transferência de elétrons com maior eficiência³⁷, diminuindo o valor de sobrepotencial de trabalho para vários substratos eletroativos⁴², aumentando a reatividade eletroquímica dos produtos enzimáticos. A redução do sobrepotencial aumenta a seletividade do biossensor, uma vez que diminui a possibilidade de que os potenciais de eletrólise de espécies interferentes sejam atingidos^{34,43}. A semelhança em escalas de comprimento entre os nanotubos de

carbono e enzimas, bem como a funcionalização com soluções ácidas, que criam sítios ativos como os grupos carboxílicos^{21,44}, sugere interações que podem ser favoráveis para aplicações em biossensores,. A área superficial e os grupos funcionais podem oferecer oportunidades especiais para a adsorção, ligação e aprisionamento de moléculas biológicas.

1.9. Nanopartículas de ouro

Como relatado por Welch e Compton, eletrodos modificados com nanopartículas metálicas apresentam algumas vantagens perante aos macroeletrodos, tais como grande área de contato, aumento do transporte de massa e promoção da eletrocatalise⁴⁵. Com isso, o uso de nanopartículas para a eletroanálise está em constante expansão⁴⁶.

Os materiais nanoestruturados como nanopartículas metálicas apresentam propriedades interessantes como compatibilidade com materiais biológicos, boa resistência mecânica e alta condutividade elétrica, características que favorecem o uso destes materiais na preparação de sensores e biossensores^{47,48}. Neste contexto, muitos trabalhos foram desenvolvidos empregando materiais nanoestruturados em eletroanalítica. Além disso, a grande área superficial das nanopartículas depositadas pode proporcionar melhor desempenho analítico da técnica eletroquímica (limite de detecção inferior, maior sensibilidade e menor potencial de trabalho), em comparação aos eletrodos convencionais^{45,49-51}.

Entre as nanopartículas mais utilizadas podem-se destacar as de ouro, platina, paládio, rutênio, cobre e níquel⁴⁶. Para cada metal há um modo de preparo, estocagem e aplicação direcionados para o uso em informática⁵², medicina⁵³, cosmetologia⁵⁴ e indústrias têxteis⁵⁵.

Estudos mostram que as nanopartículas, quando em sistemas ideais são capazes de formar arranjos tridimensionais, que por sua vez possuem propriedades diferentes das nanopartículas isoladas e de eletrodos convencionais^{56,57}. Tais propriedades podem ser amplamente exploradas na busca de sensores eletroquímicos com maior sensibilidade e seletividade para determinadas espécies de interesse.

No campo da eletroquímica tem sido discutido, nos últimos anos, que os arranjos de nanopartículas metálicas podem formar nanoeletrodos⁵⁸. Esta

afirmação consiste na hipótese de cada nanopartícula funcionar como um eletrodo, o que melhora consideravelmente o transporte de massa devido à contribuição da difusão radial e à diminuição da razão sinal/ruído, devido à baixa resistência interna. Desta forma, o desempenho dos nanoeletrodos (eletrodos construídos com nanopartículas) vem sendo satisfatoriamente demonstrado em procedimentos eletroanalíticos⁵⁹⁻⁶¹.

As nanopartículas de ouro (AuNPs) apresentam propriedades eletrônicas, ópticas e químicas muito atraentes para várias aplicações tecnológicas nas áreas de desenvolvimento da nanoeletrônica, sensores, ótica e catálise⁶². Particularmente, as enzimas, possuem dimensões semelhantes às AuNPs, de modo que, nos últimos anos considerável atenção tem sido dada ao uso combinado de AuNPs e biomoléculas⁴⁸. Há vários trabalhos com AuNPs relatados na literatura. Li e colaboradores propuseram um biossensor contendo AuNPs depositadas em um eletrodo de carbono vítreo modificado com ácido azul de toluidina, resultando em um imunossensor amperométrico para determinação do antígeno carcinoembriônico (CEA)⁶³. Em outro trabalho, Ding *et al.* propuseram um eletrodo contendo AuNPs eletrodepositadas em um eletrodo de pasta de carbono preparado com grafite e líquido iônico hexafluorofosfato de N-butilpiridínio (BPPF₆) para a construção de um imunossensor para a determinação de AFP⁶⁴. Yuan *et al.* desenvolveram um imunossensor para a determinação CEA utilizando nanopartículas de hexacianoferrato de níquel (NiHCFNPs) e um eletrodo de carbono vítreo modificado com AuNPs eletrodepositadas⁶⁵.

1.10. Eletrodos à base de carbono

Os eletrodos de carbono, no geral, são bastante utilizados na eletroanálise. Esses possuem propriedades mecânicas bastante interessantes, apresentam faixa ampla de potencial de trabalho, são razoavelmente inertes quimicamente e suas superfícies podem ser facilmente modificadas. Existem vários tipos desse material que estão sendo utilizados como eletrodos; dentre estes estão o carbono vítreo, carbono pirolítico, pasta de carbono, diamante dopado com boro, e eletrodo de carbono impresso. Estes eletrodos tem sido utilizados extensivamente como

substratos para a deposição de nanopartículas de ouro para aplicação em eletroanálise⁶⁶. Neste contexto, o uso de eletrodos de diamante dopado com boro, de carbono impresso e carbono vítreo abre novas oportunidades para bioanalítica.

O carbono vítreo é um material obtido por meio da carbonização de resinas termorrígidas, a pelo menos 1000 °C. Ele possui excelentes valores de condutividades elétrica, térmica, biocompatibilidade, além de uma ampla janela de potencial, fatos que possibilitam a aplicação deste em eletroquímica⁶⁷.

O desenvolvimento de sensores descartáveis, elimina a necessidade de regeneração da superfície. Com base nessa idéia, vem sendo empregada com grande sucesso a tecnologia “screen-printing” ou “silk-screen” para a fabricação de eletrodos^{10,68}. O uso desta técnica possibilita a produção em massa de eletrodos a um custo extremamente baixo, com grande simplicidade, e pode ser praticada em qualquer laboratório, sendo assim apropriada para a produção em larga escala¹⁰.

Os eletrodos de diamante dopado com boro (BDD) tem apresentado propriedades bastante interessantes para eletroanalítica, como por exemplo, corrente de fundo relativamente baixa, alta estabilidade eletroquímica e robustez mecânica de aplicação^{69,70}. Neste contexto, alguns grupos foram motivados a desenvolver novos métodos para a preparação de nanopartículas metálicas sobre eletrodos de diamante dopado com boro⁷¹⁻⁷⁶.

Portanto, os eletrodos de carbono são plataformas extremamente úteis para o desenvolvimento de biossensores e uma alternativa interessante para a interface eletrodo/solução.

1.11. DHP

O dihexadecil hidrogênio fosfato (*do inglês dihexadecyl hydrogen phosphate*, DHP) é um surfactante, que possui uma parte central polar e duas pontas apolares¹⁴. Este pode ser disperso em água por agitação ultrassônica e sua dispersão pode formar uma película estável na superfície do eletrodo após a evaporação da água e tem sido utilizado no desenvolvimento de sensores^{77,78} e biossensores⁷⁹. Na evaporação do solvente, o DHP se polimeriza formando um filme

uniforme contendo aprisionado nos interstícios nanomateriais, como nanotubos de carbono e enzimas, formando assim biossensores estáveis e permitindo a transferência eletrônica de forma efetiva. A Figura 1.7 apresenta a estrutura molecular do DHP(A) e sua possível forma polimerizada (B).

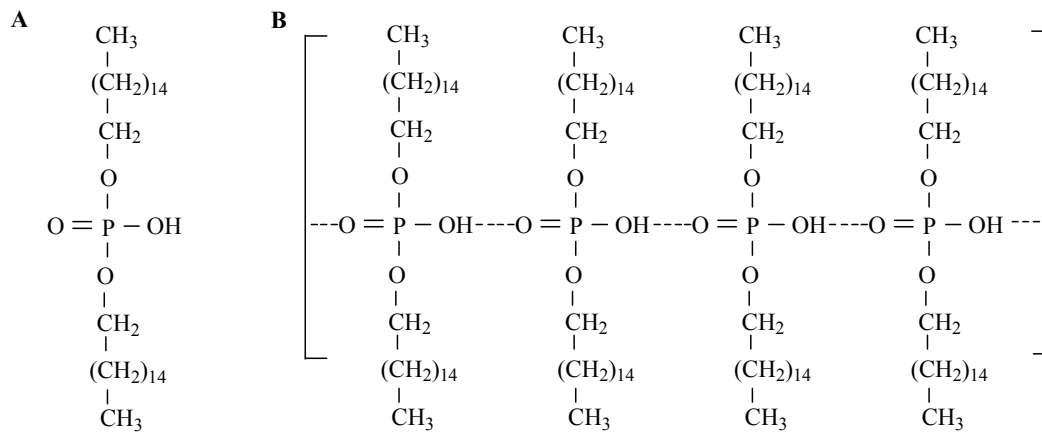


Figura 1. 7. Estrutura molecular do DHP(A) e sua possível forma polimerizada(B)¹⁴.

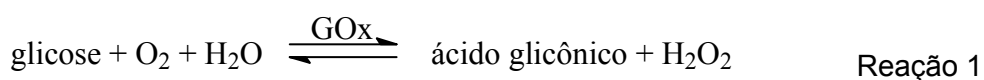
1.12. Polieletrólitos

Polieletrólitos são macromoléculas de cadeia longa, obtidos por uma combinação de monômeros simples, e quando dissolvidos em solventes polares, especialmente em água, adquirem cargas positivas ou negativas. Eles são comumente utilizados para a construção de materiais híbridos, materiais nanoestruturados e camadas auto-organizadas⁸⁰. O hidrocloreto de polialilamina (PAH), bem como outros polieletrólitos, é utilizado para várias aplicações, por exemplo, a formação de filmes finos usados em sensores, em diferentes temperaturas, pHs e solventes⁸⁰.

1.13. Glicose oxidase

A transferência eletrônica direta de enzimas com eletrodos pode ser aplicada no estudo de reações catalisadas em sistemas biológicos, para a investigação da estrutura enzimática, dos mecanismos de transformações redox de moléculas enzimáticas e processos metabólicos que envolvem transformações redox³³. No entanto, as enzimas normalmente apresentam estruturas complexas, e os centros redox estão geralmente no interior da molécula da enzima, dificultando assim a troca de elétrons do centro ativo à superfície do eletrodo. Esta dificuldade pode ser ultrapassada pelo emprego de mediadores de elétrons para promover a transferência eletrônica entre o centro ativo da enzima e a superfície do eletrodo⁸¹.

Biossensores à base de glicose oxidase (GOx) tem sido amplamente utilizados para monitorar os níveis de glicose no sangue em diabéticos, sendo que o seu centro ativo, flavina adenina dinucleotídeo (FAD), está localizado no interior da molécula (há uma blindagem de resíduos de aminoácidos), o que dificulta a transferência eletrônica direta entre o centro ativo da enzima e o eletrodo⁸². Alguns trabalhos têm sido realizados para entender a comunicação entre o sítio ativo e o eletrodo⁸³: Wu e Hu desenvolveram um biossensor para glicose utilizando o compósito Au-DHP⁷⁹; Zhao *et al.* Mostraram a transferência direta de elétrons entre as moléculas de glicose oxidase e um microeletrodo de nanotubos de carbono⁸²; Cai e Cheng relataram a transferência de elétrons direta da glicose oxidase promovida por nanotubos de carbono dispersos em brometo de acetil trimetilamônio (CTAB)⁸¹; enquanto Liu *et al.* relataram a transferência eletrônica direta da glicose oxidase baseada em um biossensor compósito de nanotubos de carbono em matriz de quitosana⁸³. A reação de oxidação da glicose pelo oxigênio molecular catalisada pela glicose oxidase com formação de ácido glicônico e peróxido de hidrogênio é mostrada na Reação 1.



1.14. Acetilcolinesterase e pesticidas

Os pesticidas constituem um sério problema dentro do contexto atual, e devido ao grande uso irracional e inadequado, eles estão contaminando os leitos dos rios ou mesmo os alimentos de forma geral⁸⁴. Um dos produtos da hidrólise da acetilcolina na presença da enzima acetilcolinesterase (AChE) é a tiocolina. Por sua vez a atividade da AChE pode ser inibida por pesticidas organofosforados, organoclorados e carbamatos⁸⁵, e com isso é possível monitorar a concentração destes analitos. Biossensores à base de acetilcolinesterase imobilizada em nanotubos de carbono tem sido fabricados para o monitoramento de pesticidas em diferentes matrizes⁸⁶.

Os pesticidas organofosforados (OPs) são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiosfosfórico ou do ácido ditiosfosfórico. Os pesticidas organofosforados contêm, sem exceção, um átomo central de fósforo pentavalente ao qual está ligado um átomo de oxigênio ou enxofre mediante dupla ligação⁸⁷⁻⁸⁹. O modelo de inseticidas baseados em carbamatos é semelhante ao dos organofosforados, diferenciado pela presença de um átomo de carbono ao invés de um átomo de fósforo em sua constituição. Já os pesticidas organoclorados são moléculas orgânicas que possuem átomos de cloro ligados a ela. Os pesticidas são conhecidos por induzir diferentes tipos lesão no DNA^{90,91}, e algumas são tão persistentes que podem estar presentes durante a etapa de replicação do DNA resultando em alterações mutagênicas. A Figura 1.8 apresenta as estruturas gerais de um pesticida carbamato, de um organofosforado e do pesticida organoclorado diuron.

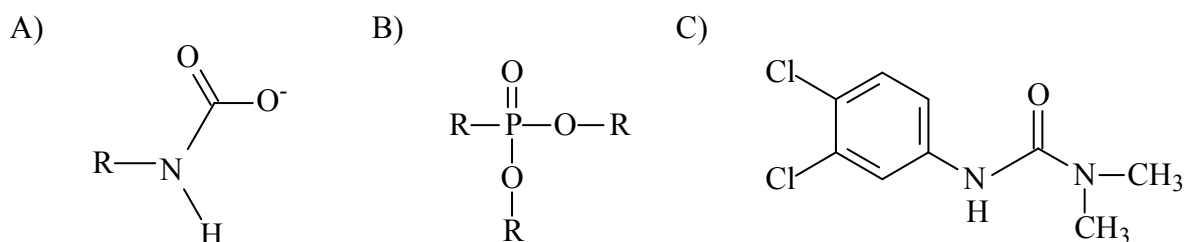


Figura 1. 8. Estruturas moleculares de um pesticida carbamato (A), um organofosforado (B) e do pesticida organoclorado diuron (C)

Dentre os vários poluentes orgânicos e inorgânicos, pesticidas organoclorados, amplamente utilizados na agricultura, são muito perigosos e nocivos por causa de sua natureza tóxica⁹², atribuída à inibição irreversível da enzima acetilcolinesterase (AChE)⁹². Acetilcolinesterase (AChE) é uma serina esterase que está ligada às membranas pós-sinápticas, que converte rapidamente o neurotransmissor acetilcolina (ACh) à colina (Ch) e acetato após a transmissão do impulso nervoso^{84,92}.

Nos últimos anos, várias estratégias eletroquímicas têm sido desenvolvidas para a detecção de compostos organofosforados⁹³. Uma abordagem comum envolve a medida da corrente de oxidação de tiocolina produzida a partir da hidrólise enzimática da acetiltiocolina (ASCh) pela AChE. Na presença de um composto organofosforado, a função da enzima é inibida limitando a produção de tiocolina. O grau de inibição é, portanto, correlacionado com a diminuição relativa da corrente de oxidação da tiocolina (oxidada) em relação a corrente medida na ausência de um inibidor.

Os métodos tradicionais como a espectrofotometria no UV-Vis e colorimetria são normalmente utilizados para determinar a atividade enzimática baseada na inibição de pesticidas⁹⁴⁻⁹⁶. No entanto, os métodos eletroquímicos de análise destes compostos surgem como alternativas de baixo custo e com o uso mínimo de reagentes para a determinação destes analitos em campo com boa precisão.

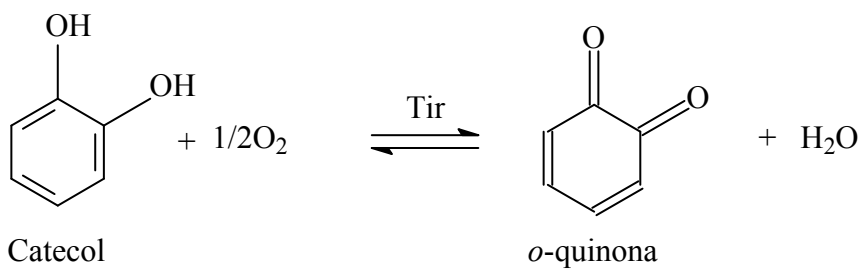
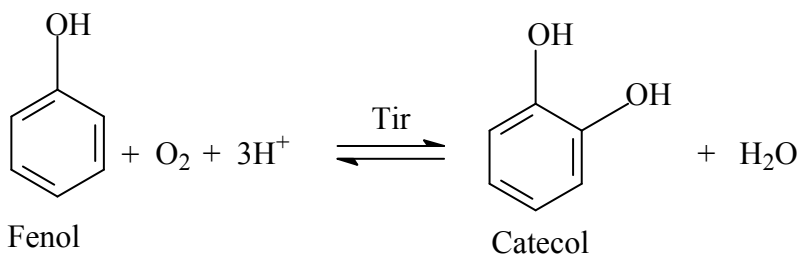
1.15. Tirosinase e fenóis

A contaminação de solo e água por fenóis é preocupante, pois são compostos tóxicos, que podem causar várias doenças, entre elas o câncer⁹⁷⁻⁹⁹. Eles foram extensamente usados na indústria madeireira, de tecidos e agrotóxicos, os quais, mesmo em baixas concentrações são nocivos à saúde. Muitos eletrodos têm sido propostos para determinação de fenóis em águas, entre eles biossensores baseados em tirosinase que têm provado ser uma boa ferramenta para este propósito¹⁰⁰⁻¹⁰⁴. Neste contexto, a proposição de novos biossensores, principalmente os de terceira geração, pode ser uma alternativa para determinar a concentração de fenóis. de maneira bastante satisfatória e confiável.

A Tirosinase (Tyr) é uma enzima que possui átomos de cobre como centro ativo. Por ser uma polifenol oxidase, esta catalisa a oxidação do fenol em duas

reações: a orto-hidroxilação formando o catecol, e, posterior oxidação do catecol para orto-quinona, ambas na presença de oxigênio molecular, como observado nas Reações 2 e 3. Há poucos trabalhos na literatura que relatam a transferência direta de elétrons da tirosinase¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. O fenol em baixas concentrações pode ser detectado através do aumento da corrente que ocorre associado à transferência direta de elétrons (DET), e neste sentido, a construção de biossensores adequada é muito importante para obter uma boa resposta entre a superfície do eletrodo e as enzimas. Há vários métodos para imobilização da Tyr relatados na literatura tais como adsorção física¹⁰⁵, ligação covalente cruzada¹⁰⁶ incorporação à pasta de carbono^{108,109}, imobilização em filmes polimérica^{110,111}, em compósitos¹¹²⁻¹¹⁴, imobilização covalente na superfície do eletrodo^{115,116}, e aprisionamento em matriz de sol-gel^{117,118}.

A enzima Tyr contém no seu centro eletroativo átomos de cobre que podem propiciar a transferência de elétrons. Portanto, essencialmente, as reações redox da Tyr, que são enzimas tetraméricas, estão relacionadas ao processo redox entre átomos de Cu (I) e Cu (II) presentes no centro ativo da enzima e coordenados com histidinas¹¹⁹.



1.16. Prolactina

A Prolactina (PRL) é um hormônio polipeptídico envolvido em vários processos biológicos importantes, como a estimulação da lactação, as funções reguladoras do crescimento e diferenciação da glândula mamária na reprodução¹²⁰. A PRL circula no soro em múltiplas formas de diferentes tamanhos moleculares, sendo a prolactina monomérica sua principal forma (85 a 95 %). As concentrações de PRL em mulheres adultas, não grávidas, que não estão amamentando, variam no intervalo de 4 a 20 ng mL⁻¹. Em grávidas e em lactação os níveis são normalmente de 100 a 200 ng mL⁻¹¹²¹. A determinação de prolactina em mulheres é necessária em caso de distúrbios menstruais, galactorréia, hipogonadismo, infertilidade entre outras doenças. Quando a hiperprolactinemia é confirmada (> 20 ng mL⁻¹ de PRL), a possibilidade de um prolactinoma deve ser investigada¹²². Imunoensaios colorimétricos têm sido relatados para a determinação de PRL em leite¹²³ e plasma¹²², no entanto, poucos imunossensores foram descritos na literatura para a determinação de PRL.

O primeiro imunossensor para a determinação de PRL consistiu em uma configuração multianálito tendo anticorpos diferentes para a determinação de folitropina, gonadotrofina coriônica humana e PRL em amostras de soro humano¹²⁴, com detecção fluorimétrica da reação a partir dos anticorpos biotinizados imobilizados e estreptavidina marcada com R-ficoeritrin. Recentemente, um imunossensor eletroquímico foi proposto utilizando a imobilização de anticorpos antiprolactina em estreptavidina funcionalizadas e esferas magnéticas (*do inglês, magnetic beads MBs*)²³ para a determinação de PRL em amostras de soro humano.

1.17. Análise por injeção em fluxo

Procedimentos automáticos alternativos baseados na técnica de injeção em fluxo com detectores amperométricos e voltamétricos têm sido amplamente sugeridos na indústria farmacêutica, de alimentos, e nas ciências forenses e clínicas¹²⁵. Análise por injeção em fluxo (FIA) é um sistema analítico bem estabelecido para análise de rotina e controle de qualidade¹²⁶. Em testes de controle de qualidade, procedimentos FIA podem facilmente e efetivamente substituir complicados e caros métodos de separação cromatográficos desde que o composto

ativo a ser medido normalmente exista em altas concentrações e os excipientes comuns não causem interferências graves. Além disso, outras vantagens dos sistemas FIA são melhor repetibilidade, alta frequência de amostragem, redução do risco de contaminação durante a etapa de análise, combinada com boa precisão e sensibilidade elevada, bem como relativo baixo custo da instrumentação^{126,127}.

1.18. Microcontrolador PIC

Um *Microcontrolador PIC* (do inglês, *Peripheral Interface Controller*) é um compacto e reduzido circuito integrado que é capaz de realizar várias funções de controle como um microcomputador. Neste, uma unidade de memória, uma unidade de processamento central, portas analógicas/digitais (AD), um relógio e um conversor analógico-digital são encontrados. Na Figura 1.9 é apresentada a imagem do microcontrolador PIC 16F877A.



Figura 1. 9. Imagem de um PIC 16F877A

Todas as funções do microcontrolador são realizadas por códigos binários e hexadecimais, os quais são introduzidos na memória do microcontrolador por meio de um programa escrito em linguagem de baixo nível, que pode ser assembler ou linguagem C. Além disso, uma vez criado o programa em linguagem C, um instrumento microcontrolado é capaz de tomar decisões e realizar monitoramento e controle de qualquer processo sem a intervenção do homem ou de um microcomputador, ou seja, capaz de gerar um sistema autosuficiente, bastando para isso apenas introduzir seus comandos previamente. Por causa dessas características, microcontroladores são utilizados como unidade de processamento central (CPU) em instrumentos aplicados na detecção de parâmetros físico-

químicos^{128,129}, parâmetros biológicos^{130,131}, com aplicação também nas áreas de computação e engenharia eletrônica¹³².

O uso de microcontroladores em química favorece a redução do tempo e do custo por análise e com isso surge a possibilidade de desenvolver sistemas miniaturizados, devido ao seu pequeno tamanho, baixo consumo de energia e características multifuncionais.

Geralmente, como os equipamentos para análise em fluxo empregam bombas peristálticas como unidade de propulsão, estas comumente não podem ser levadas a campo para realização de análises *in situ*, pois são operados em rede elétrica convencional (110 V ou 220 V). Então, surge como alternativa a proposição de bombas de fluxo que sejam portáteis e que possam ser de alimentação à bateria para serem utilizadas em análises em campo.

OBJETIVOS

CAPÍTULO 2

2. Objetivos gerais

Os objetivos deste trabalho de tese foram o desenvolver e caracterizar de novas arquiteturas de biossensores eletroquímicos enzimáticos, utilizando nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro que possam ser operados em potenciais menos elevados (positivo ou negativo), diminuindo assim as interferências de concomitantes. Já, em um segundo momento, aplicar tais biossensores adequadamente na determinação de cada analito específico escolhidos para interagir com cada eletrodo.

**BIOSENSOR DE TERCEIRA GERAÇÃO PARA GLICOSE UTILIZANDO
NANOTUBOS DE CARBONO IMOBILIZADOS EM FILME DE DIHEXADECIL
HIDROGÊNIO FOSFATO (DHP)**

CAPÍTULO 3

3. Biossensor de terceira geração para glicose utilizando nanotubos de carbono imobilizados em filme de dihexadecil hidrogênio fosfato (DHP)

3.1. Objetivos específicos

Desenvolver um biossensor utilizando glicose oxidase (GO_x) imobilizada em nanotubos de carbono funcionalizados (CNTs) e um filme de dihexadecil hidrogênio fosfato (DHP) cobrindo a superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) para a determinação de glicose

3.2. EXPERIMENTAL

3.2.1. Reagentes

Glicose oxidase (de *Aspergillus niger*) tipo II, D (+ glicose), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (sal dissódico, 96%) e dihexadecil hidrogênio fosfato (DHP) foram obtidos da Sigma. Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (20-30 nm de diâmetro, 1-2 nm de espessura de parede e 0,5-2 µm de comprimento, com a pureza de 95%), 1 (3-dimetil-aminopropil)-3-hidrocloreto etilcarbodiimida 98% e N-hidroxisuccinimida 98% foram adquiridos da Aldrich. Todos os outros produtos químicos foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura Milli-Q. As soluções de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, utilizadas como eletrólito suporte foram preparadas a partir de Na₂HPO₄ e NaH₂PO₄.

3.2.2. Funcionalização (tratamento ácido) dos nanotubos de carbono de parede múltipla

Foram utilizados 500 mL de solução dos ácidos sulfúrico e nítrico concentrados na proporção 3:1 v/v respectivamente para cada 1 g de nanotubos de carbono de parede múltipla. Essa mistura foi refluxada a temperatura ambiente durante 12 h¹³³. Após esse tempo, lavou-se com água os nanotubos de carbono até atingir um pH entre 6,5-7,0. A separação entre água e os nanotubos de carbono foi realizada com o auxílio de uma centrífuga. Após a separação por centrifugação, a porção de água sobrenadante foi retirada utilizando uma bomba peristáltica. Finalizando-se o processo, os nanotubos funcionalizados foram secos por 6 h em uma estufa²¹ a 120 °C.

3.2.3. Preparação do biossensor GOx-CNTs-DHP/GCE

O eletrodo de carbono vítreo (do inglês *Glassy Carbon Electrode*, GCE) de 3 milímetros de diâmetro foi polido seqüencialmente com papel abrasivo metalográfico (No. 6) e com suspensões de alumina 0,3 e 0,05 µm para a obtenção de uma superfície do eletrodo espelhada. Em seguida, lavou-se com água ultrapura, sonicou-se com etanol absoluto e água deionizada por cerca de 1 min, respectivamente.

Uma massa de 1,0 mg de DHP foi adicionada à 1mL uma solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e homogeneizada com o auxílio de ultrassom por 2 h. Então, 1 mg de nanotubos de carbono foi dispersado na solução de DHP 1mg mL⁻¹ com o auxílio de ultrassom por mais 2 h, afim de formar uma suspensão estável. Em seguida, 200 µL de uma solução contendo EDC 1,0 mmol L⁻¹ e NHS 20 mmol L⁻¹ foram adicionados à suspensão para reação de ativação do grupos carboxílicos disponíveis após a funcionalização dos nanotubos de carbono por 2 h sob agitação magnética. Por fim, misturou-se a suspensão de CNTs a 3,0 mg (45 kU) de GOx com o auxílio de agitação magnética por 2 h. Com isso a GOx ligou-se covalentemente à superfície de nanotubos de carbono, através dos grupos carboxílicos dos CNTs funcionalizados. Então, 8 µL da mistura foram gotejados na superfície de um

eletrodo de GCE com o auxílio de uma micropipeta, deixando secar em dessecador por 12 h em um refrigerador a 4 °C. Quando não em uso, o biossensor era armazenado em refrigerador nas mesmas condições supramencionadas. O mesmo procedimento foi utilizado para fabricar o CNTs-DHP/GCE e FAD-CNTs-DHP/GCE.

3.2.4. Morfologia

A superfície dos filmes contendo nanotubos de carbono foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de alta resolução, utilizando um equipamento modelo FEG XL30 da Phillips®.

3.2.5. Modos de vibração

Verificaram-se os modos de vibração por espectroscopia na região do infravermelho, em pastilhas. Prepararam-se as pastilhas com KBr (Aldrich) de grau espectroscópico na proporção de 1:100 (amostra/KBr). As análises foram realizadas em espectrofotômetro BOMEM®, modelo MB-102 com transformada de Fourier. A massa dos nanotubos de carbono funcionalizados e não-funcionalizados empregada foi de 1,0 mg por pastilha.

3.2.6. Medidas eletroanalíticas

As medidas eletroanalíticas foram executadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT12® (Eco Chemie) gerenciado pelo programa computacional GPES 4.9. A determinação dos valores de pH das soluções foram realizadas em um pHmetro digital ORION®, modelo EA 940.

3.2.7. Célula eletroquímica

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula de compartimento único de 15 mL, confeccionada em vidro Pyrex, sempre adicionando uma alíquota de 10 mL de eletrólito suporte para a realização das medidas eletroquímicas.

3.2.8. Eletrodos

Utilizou-se um sistema de três eletrodos, sendo que, o eletrodo de trabalho foi o biossensor, além dos eletrodos de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e o de platina como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Teste de dispersão

Os nanotubos de carbono são insolúveis na maioria dos solventes¹³⁴⁻¹³⁶ e, em especial em água. É relatado, no entanto, que a dispersão pode ser melhorada utilizando algumas soluções, tais como poli (*p*-fenileno vinileno)^{137,138}, CTAB⁸¹ ou Nafion¹³⁹. Quando os nanotubos de carbono foram submetidos ao ultrassom por 2h com solução de DHP, ocorreu uma distribuição homogênea formando uma suspensão estável em meio de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

A dispersão dos nanotubos de carbono em solução surfactante é claramente observada na Fig. 3.1, que mostra fotografias de frascos contendo nanotubos de carbono em água (Figura 1A) e em 1mg mL⁻¹ de DHP (Figura 1B). A suspensão homogênea, bem distribuída de nanotubos é observada em DHP e em solução aquosa sequer houve a formação de uma suspensão, ficando água e nanotubos de carbono separados.

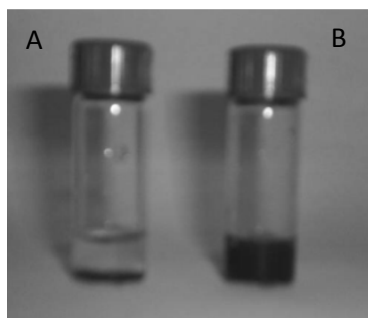


Figura 3. 1. Fotografias de frascos contendo CNTs 1mg mL^{-1} dispersos em água (A) e em solução de DHP (B) por ultrassom durante 2 h.

3.3.2. Caracterização dos CNTs

A Figura 3.2 mostra os espectros de infravermelho (FTIR) dos CNTs não-funcionalizados (figura inserida) e nanotubos de carbono funcionalizados (após tratamento ácido), exibindo uma absorção intensa em 1645 cm^{-1} , que corresponde aos grupos carboxílicos. Os espectros FTIR apresentaram um aumento significativo na intensidade de picos de nanotubos de carbono tratados com mistura de ácido nítrico e sulfúrico comparados com os nanotubos de carbono não tratados. Esta variação na intensidade dos picos pode ser relacionada com o aumento dos grupos carboxílicos indicando a funcionalização dos nanotubos de carbono, sendo estes resultados concordantes com os da literatura⁴¹.

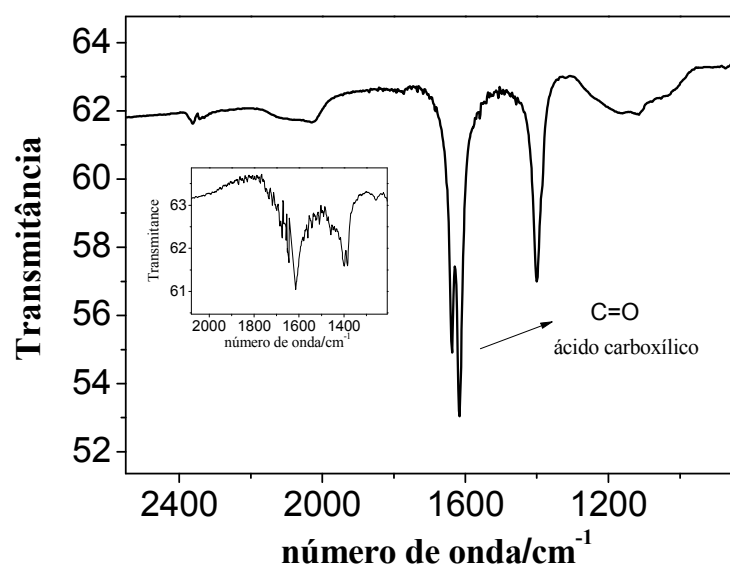


Figura 3. 2. Espectros de FTIR dos nanotubos de carbono não-funcionalizados (figura inserida) e funcionalizados.

3.3.3. Estudo da composição dos filmes

Primeiramente estudou-se a composição de DHP e CNTs no filme proposto, sendo os voltamogramas deste estudo obtidos em KCl 0,1 mol L⁻¹ na presença de [Fe(CN)₆]⁴⁻ 1,0 mmol L⁻¹. Para o estudo da proporção de DHP fixou-se a massa de CNTs em 1,0 mg (modo de preparo está descrito na secção 3.2.3). Estudou-se então diferentes filmes obtidos, contendo 1, 2, 3 e 5 mg de DHP, onde a massa de 1,0 mg, proporcionou um filme mais estável, permanecendo aderente ao eletrodo de carbono vítreo após mais de 100 medidas. A Figura 3.3 apresenta os ciclovoltagemogramas para os eletrodos com diferentes proporções de DHP. Nas demais proporções, o filme se desprendia da superfície do carbono vítreo após poucas varreduras utilizando a voltametria cíclica. Portanto mesmo apresentando menor corrente de pico a massa de 1,0 mg de DHP foi selecionada para estudos posteriores.

Por conseguinte, estudou-se a proporção de CNTs no filme com a massa de 1,0 mg de DHP. Massas de 1,0 a 3,0 mg foram estudadas, sendo

que o filme contendo 1,0 mg de CNTs apresentou melhor estabilidade e aderência. Portanto apesar dos filmes contendo 2,0 e 3,0 mg apresentarem maiores correntes de pico, o filme de 1,0 mg foi escolhido por ser mais aderente e permitir um maior número de medidas sem se desprender do eletrodo de carbono vítreo

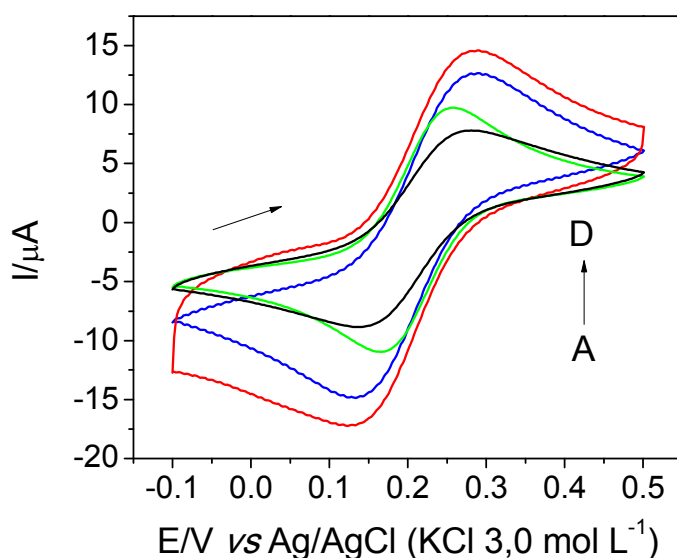


Figura 3. 3. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de carbono vítreo (A) e eletrodo de carbono vítreo modificados com filmes contendo 1,0 mg de CNTs e 1,0 (B), 2,0 (C) e 3,0 (D) mg de DHP na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1,0 mmol L⁻¹ e KCl 0,1 mol L⁻¹, velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

3.3.4. Área ativa e MEV

Empregando-se a equação de Randles-Sevcik^{81,140}, a área eletroativa do GCE e CNT/DHP/GCE foi estimada utilizando a voltametria cíclica em diversas velocidades de varredura, em KCl 0,1 mol L⁻¹ na presença de 1,0 mmol L⁻¹ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ como apresentado a seguir:

$$I_p = 2.69 \times 10^5 AD^{1/2} n^{3/2} v^{1/2} C \quad \text{Eq. 1}$$

no qual I_p é a corrente de pico (A), A é a área eletroativa (cm²), D é o coeficiente de difusão da molécula em solução (cm² s⁻¹), n é o número de

elétrons envolvidos na reação redox, ν é a velocidade de varredura ($V s^{-1}$), e C é a concentração de $[Fe(CN)_6]^{4-}$ em solução ($mol cm^{-3}$). Para $1,0 mmol L^{-1}$ $[Fe(CN)_6]^{4-}$, o coeficiente de difusão (D) é $6,2 \times 10^{-6} cm^2 s^{-1}$.

Assim, as áreas eletroativas dos eletrodos CNTs-DHP/GCE, DHP/GCE e GCE apresentaram valores de 0,10, 0,05 e 0,04 cm^2 , respectivamente. Como previsto, os nanotubos de carbono aumentaram a área ativa do eletrodo em comparação com o eletrodo de carbono vítreo.

Para a caracterização dos filmes de DHP e CNTs-DHP utilizou-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de alta resolução. A Figura 3.4 mostra as imagens MEV da DHP e CNTs-DHP na superfície do eletrodo GCE. Observa-se que há um enovelamento dos nanotubos com o DHP e uma distribuição uniforme, tanto do DHP quanto do CNTs-DHP sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo.

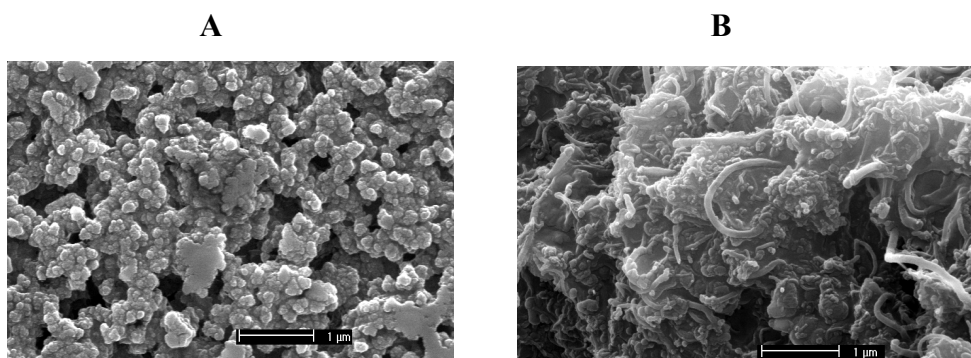


Figura 3. 4. Imagens de MEV de DHP (A) e CNTs/DHP (B) sob superfície de carbono vítreo com o aumento de 40.000 x.

3.3.5. Processo de imobilização enzimática

O processo de imobilização enzimática da glicose oxidase em nanotubos de carbono sobre filme de DHP foi realizado com o auxílio do EDC e o NHS, onde ambos favorecem a reação dos grupos carboxílicos dos CNTs com os grupos amino da enzima como observado na Figura 3.5 abaixo:

O EDC e o NHS são ótimos agentes de reticulação. Eles realizam a conjugação entre grupos carboxílicos ($-COOH$) e aminas primárias ($-NH_2$), sem se tornar parte da moléculas-alvo (há formação de uma amida)¹⁴¹. Por isso eles

são chamados de agentes de reticulação de comprimento zero. Como as enzimas e proteínas possuem grupos carboxílicos e aminas, estas reações químicas são amplamente utilizadas em procedimentos de imobilização enzimática e para a preparação de imunoenaios. As reações de reticulação de EDC e NHS devem ser realizadas em condições desprovidas de grupos carboxílicos e aminas que não sejam os de interesse. Tanto um quanto o outro formam intermediários reativos. O NHS é reativo e pode ser adicionado após a ativação dos grupos carboxílicos de uma molécula de interesse com EDC. O NHS forma um éster ativo capaz de reagir com aminas primárias e produzir ligações amida estáveis, saindo das moléculas de interesse sem deixar qualquer vestígio. Portanto, pode-se utilizar o EDC e o NHS sem que haja interferência na ligação entre as moléculas de interesse, no caso aqui apresentado, os nanotubos de carbono e a enzima glicose oxidase.

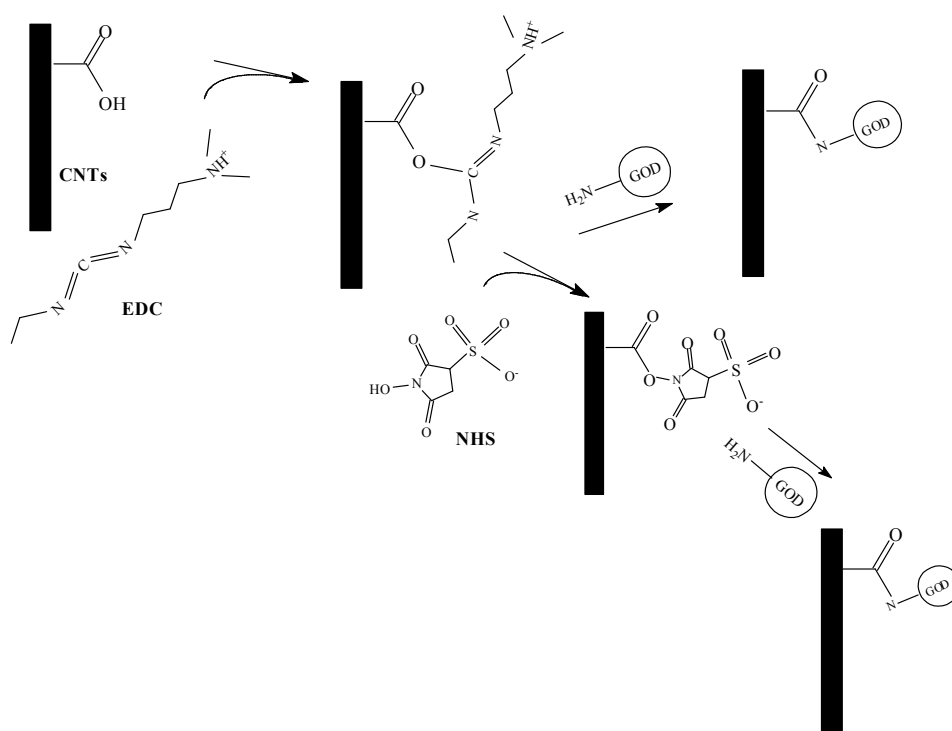


Figura 3. 5. Reação de EDC e NHS com os CNTs e a enzima GOx

3.3.6. Estudo do biossensor GOx-CNTs-DHP/GCE

A Figura 3.6 mostra a diferença entre os ciclovoltagemogramas (CV) obtidos em tampão fosfato (pH 7,0) contendo FAD 0,1 mmol L⁻¹ (somente GCE), e os eletrodos GOx-CNTs-DHP/GCE, FAD-CNTs-DHP/GCE em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) saturada com N₂. Observou-se que não há diferença no perfil dos ciclovoltagemogramas do DHP/GCE (A) e CNTs-DHP/GCE (B) indicando que não há problemas na transferência de elétrons entre os CNTs e o GCE que poderiam ser atribuídos a interface eletrodo/solução, como por exemplo, aumento da resistividade ou diminuição da condução eletrônica.

O eletrodo FAD-CNTs-DHP/GCE exibiu um CV bem definido (Figura 3.6 C), com um potencial de meia onda ($E_{1/2}$) de -450 mV (vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)) e de maneira semelhante o biossensor com GOx ligada aos nanotubos de carbono pelo acoplamento EDC/NHS (Figura 3.6 D) correspondente a redução e oxidação do FAD. Comportamento semelhante também foi obtido com o eletrodo CNTs/DHP/GCE para solução de FAD 1 mmol L⁻¹ (Figura 3.6 E).

Os ciclovoltagemogramas (CVs) obtidos para os eletrodos de CNTs ligados a GOx e FAD indicam que o CGE teve pouca ou nenhuma influência sobre o comportamento eletroquímico. Além disso, o CVs do FAD e GOx ligados aos CNTs indicam que há ligação dos nanotubos de carbono com a GOx com a obtenção da transferência direta de elétrons, do centro ativo da enzima e o eletrodo de carbono vítreo via nanotubos de carbono.

O biossensor GOx-CNTs-DHP/GCE apresentou um par de picos redox bem definidos e quase simétricos. O potencial de pico anódico e catódico do biossensor observado na Figura 3.6 D é - 405 e - 432 mV (a 50 mV s⁻¹), respectivamente. O potencial formal (E_M), que foi definido como a média de potencial de pico anódico e catódico foi - 418 mV para uma velocidade de varredura de 50 mVs⁻¹ com as correntes de pico catódicas e anódicas apresentando magnitudes semelhantes. O potencial de meia onda ($E_{1/2}$) calculado foi de -355 mV, obtido a partir da multiplicação do $E_M \times 0,85$, o que corresponde a 85% do valor do potencial formal.

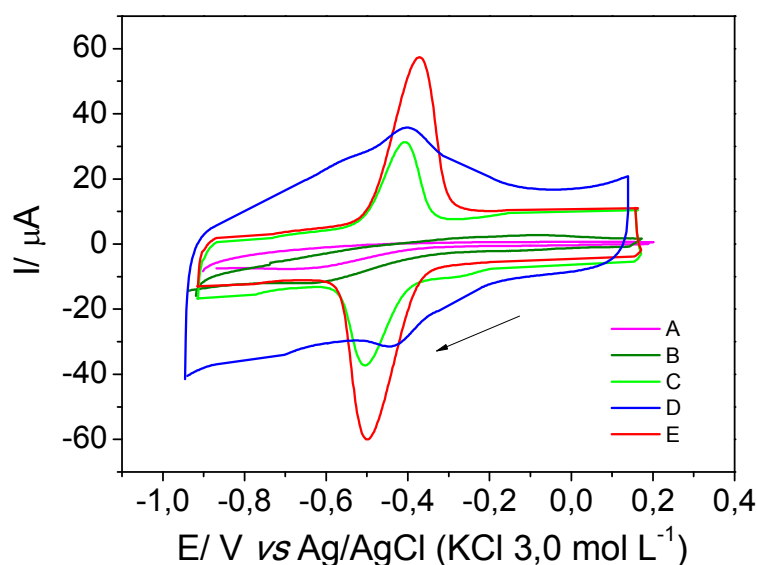


Figura 3. 6. CVs dos eletrodos DHP/GCE (A); CNTs-DHP/GCE (B); CNTs-DHP/GCE na presença de solução de FAD ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) (C); GOx-CNTs-DHP/GCE (D); e FAD-CNTs-DHP/GCE (E) e em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} em meio saturada com N_2 .

O estudo do biossensor em diferentes velocidades de varredura de potencial mostrou que a reação não é controlada por difusão das espécies, mas sim pela superfície (enzima imobilizada na superfície do eletrodo), como esperado para sistemas com enzimas imobilizadas. A Figura 3.7 apresenta esses resultados para o biossensor contendo glicose. Observa-se com o aumento da velocidade de varredura um aumento das correntes catódica e anódica, além do aumento da separação dos picos. As correntes de pico anódica e catódica são linearmente proporcionais à velocidade de varredura variando de 20 a 400 mV s^{-1} , indicando que a reação do eletrodo ocorre na monocamada redox^{79,140}. A partir das equações de Laviron¹⁴² pode-se obter informações como coeficiente de transferência e constante de transferência heterogênea para eletrodos com essas características.

$$E_{pc} = E^0 + \frac{2.3RT}{\alpha nF} \left\{ \log \frac{\alpha nF}{RTk_s} + \log \nu \right\} \quad \text{Eq.2}$$

$$E_{pa} = E^0 - \frac{2.3RT}{(1-\alpha)nF} \left\{ \log \frac{(1-\alpha)nF}{RTk_s} + \log v \right\} \quad \text{Eq.3}$$

$$\Delta E_p = \frac{2.3RT}{\alpha(1-\alpha)nF} \left\{ \alpha \log(1-\alpha) + (1-\alpha) \log \alpha - \log \frac{RTk_s}{nF} + \log v \right\} \quad \text{Eq. 4}$$

onde E_{pa} , e o E_{pc} são potenciais de pico anódico e catódico, respectivamente. $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$, α é o coeficiente de transferência, v é a velocidade de varredura ($V s^{-1}$), k é a constante de transferência heterogênea de elétrons (s^{-1}).

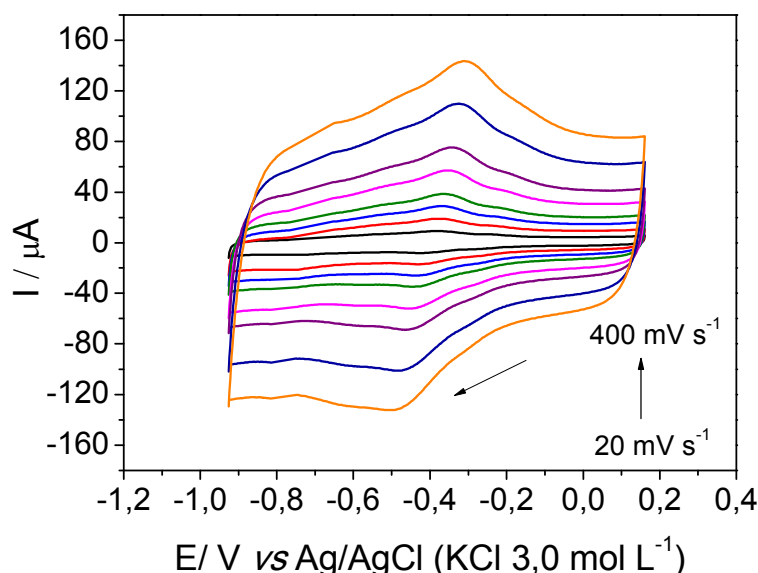


Figura 3. 7. Voltamogramas cíclicos do eletrodo GOx-CNTs-DHP/GCE em diferentes velocidades de varredura em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) em meio saturado com N_2 .

Utilizando-se então a equação da reta do gráfico de potenciais de pico catódicos vs. $\log v$ (Figura 3.8 A), pode se substituir os valores na Eq. 2, que por sua vez pode ser rearranjada matematicamente para:

$$y = \underbrace{\quad a \quad}_{\quad} + \underbrace{\quad bx \quad}_{\quad}$$

$$E_{pc} = \left(E^0 + \frac{2,3RT}{\alpha nF} \log \frac{\alpha nF}{RTk_s} \right) + \frac{2,3RT}{\alpha nF} \log v$$

Observa-se que o valor da inclinação (b) é igual ao termo $\frac{2,3RT}{\alpha nF}$, No qual, R é a constante universal dos gases perfeitos (8,314 J mol⁻¹ K⁻¹), T é a temperatura em Kelvin (298,15 K), n é o número de elétrons envolvidos na equação (2) e F a constante de Faraday (96485 C mol⁻¹).

Portanto, de acordo com o processo catódico e um coeficiente angular de 0,062, o valor calculado de α foi de 0,48.

De maneira semelhante, utilizou-se a Eq. 4, a partir do valor de α e do coeficiente linear (0,22) do gráfico ΔE_p vs. $\log v$ (Figura 3.8. B) calculou-se o valor de k_s que foi de 1,69 s⁻¹. Esse valor de k_s encontrado está em consonância com os valores encontrados na literatura para GOx imobilizada em nanotubos de carbono^{82,143}.

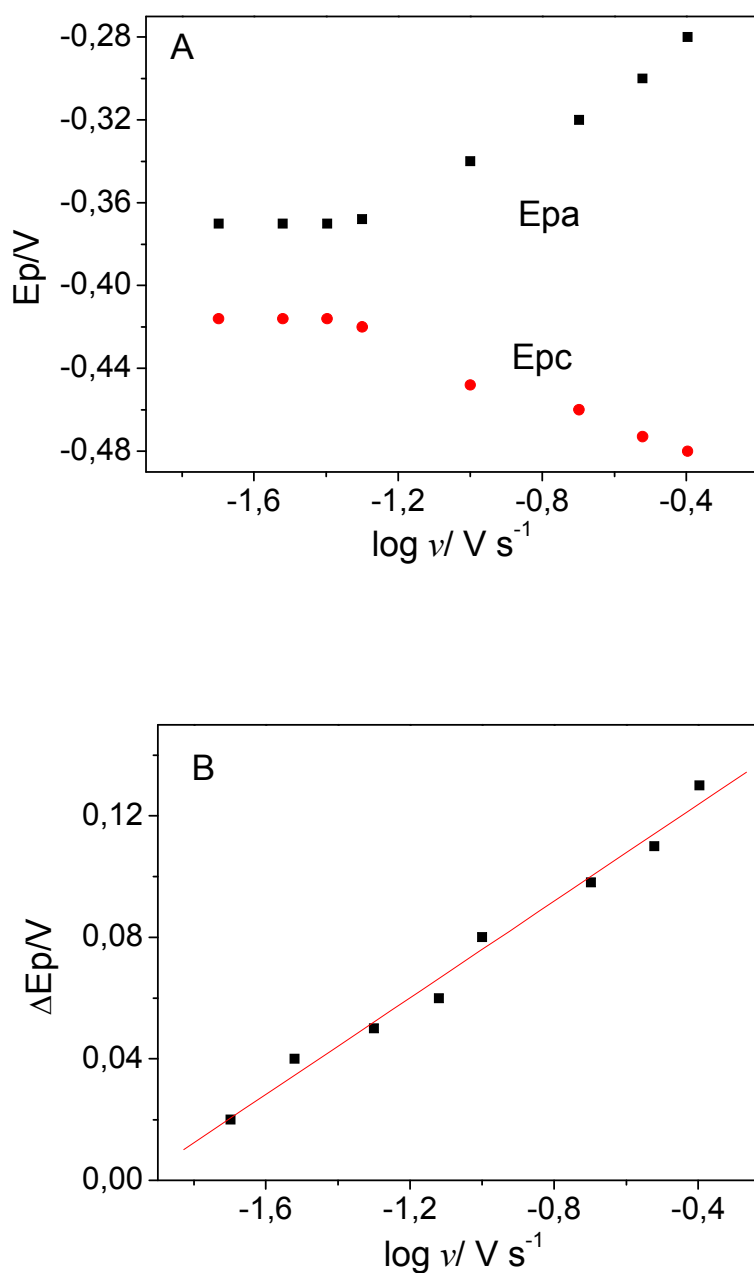


Figura 3. 8. Potenciais de pico anódico e catódico (E_{pc} vs $\log \nu$ (A)) e ΔE_p vs $\log \nu$ (B)).

A resposta eletroquímica da GOx imobilizada na superfície do biossensor é relacionada à reação redox do FAD^{143} , que está presente na molécula da enzima, sendo que sua reação envolve a participação de dois elétrons e dois prótons ($FAD/FADH_2$) (ver reação 4). Assim, a dependência da resposta do biossensor com o pH nos potenciais de pico anódico e catódico da

GOx imobilizada foi estudada. O aumento do pH da solução de 5,0 a 8,5 levou a uma diminuição do potencial de pico, tanto o anódico como o catódico. A inclinação da reta, mostrada na inserção da Figura 3.9, de E_{pc} vs. pH apresentou um valor de $-61,0$ mV/pH, valor próximo ao encontrado na literatura ($-58,6$ mV/pH) a 22 °C para sistemas reversíveis com o mesmo número de prótons e elétrons.

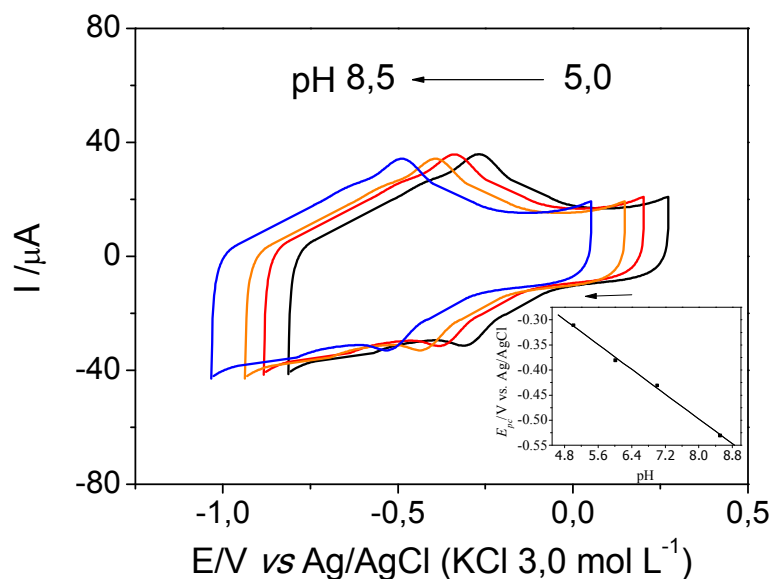
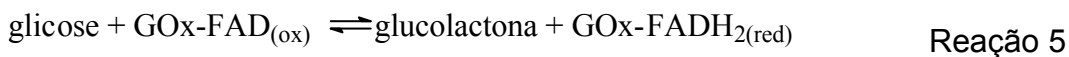
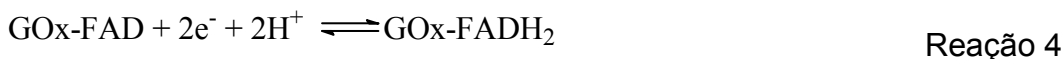


Figura 3. 9. Voltamogramas cíclicos do eletrodo GOx-CNTs-DHP/GCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH. Os pHs foram de 8,5, 7,0, 6,0 e 5,0, respectivamente e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

O estudo de pH e os picos bem definidos observados para o biossensor GOx-CNTs-DHP/GCE corresponde a reação GOx-FAD com $2e^-$ (como observado nas reações presentes na Figura 3.10, o que sugere que os CNTs podem facilitar a comunicação eletrônica. Na solução saturada de N_2 , o processo de reação pode ser expresso pelas reações 4 e 5 abaixo:

Primeiramente há a reação de redução eletroquímica do FAD a FADH_2 , e posterior adição de glicose ocorrendo a redução química do FAD a FADH_2 , fazendo com que haja diminuição da corrente de pico de redução e possível quantificação de glicose utilizando o biossensor proposto em meio de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) como observado nas reações 4 e 5.



3.3.7. Determinação de glicose por voltametria de onda quadrada

Utilizou-se então a voltametria de onda quadrada (SWV) para a quantificação de glicose empregando-se o biossensor proposto. O efeito dos parâmetros de SWV (voltametria realizada no sentido catódico) foi investigado utilizando 1,0 mmol L⁻¹ de glicose em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). A frequência de onda quadrada (f) influencia a intensidade do sinal analítico e, por sua vez, a sensibilidade. Observou-se que a frequência aumentou até 40 Hz, o qual foi selecionado para estudos posteriores. A amplitude de pulso (a), que também influencia fortemente o sinal SWV foi estudada de 10 a 70 mV, a qual aumentou linearmente até 50 mV e atingiu um platô em a = 60 mV, assim, um valor a de 50 mV foi selecionado para estudos posteriores. O incremento de varredura (ΔEs) influencia a velocidade de varredura de potencial (o produto da frequência e ΔEs.). Aqui, ΔI_p aumentou significativamente para os valores ΔEs até 4 mV, em seguida, manteve-se constante para valores superiores, assim o incremento de varredura de 4 mV foi selecionado.

A resposta do biossensor SWV GO_x-CNTs-DHP/GCE para glicose foi estudada empregando-se as condições selecionadas, em N₂-saturado solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), onde FAD é reduzido a FADH₂ (no biossensor). Quando a glicose é adicionada, ocorre a formação de FADH₂ (nas proximidades da superfície do biossensor), levando a uma diminuição do pico catódico como observado na Figura 3.10. A relação entre a diminuição da corrente de pico de redução e a concentração de glicose foi então analisada. A diminuição do pico catódico, em potencial de -0,432 V, foi linearmente

proporcional à concentração de glicose de 0,02 a 15 mmol L⁻¹ (Figura 3.11), seguindo a equação $-\Delta I_p \text{ (mA)} = 0,011 + 30 C \text{ (mmol L}^{-1}\text{)}$ com um coeficiente de correlação de 0,994. O limite de detecção obtido foi de 9,0 μmol L⁻¹ com base na relação sinal-ruído.

O limite de detecção (LD) foi calculado pelo método da relação sinal-ruído. Para determinar a relação sinal-ruído, é realizada uma comparação entre a medição dos sinais de uma solução de referência (solução de glicose 1,0 mmol L⁻¹ devidamente diluída em 10 mL de eletrólito suporte na célula eletroquímica) em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse e um branco (matriz isenta do composto de interesse, neste caso foi utilizado o eletrólito suporte). Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser detectada, na qual a relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1. Neste trabalho a relação foi de 3 vezes o sinal ruído para o cálculo do LD¹⁴⁴.

O biossensor GOx-CNTs-DHP/GCE mostrou boa precisão com um desvio padrão relativo de 3,2% para 10 medidas sucessivas para um mesmo biossensor na presença de 1,0 mmol L⁻¹ de glicose. Além disso, um desvio padrão relativo de 4,1% foi obtido para as medições de glicose 1,0 mmol L⁻¹ usando-se dez biossensores diferentes preparados da mesma maneira. O biossensor GOx-CNTs-DHP/GCE foi mantido a 4 °C e a sua estabilidade foi verificada sistematicamente medindo-se a sua resposta analítica para solução de glicose 1,0 mmol L⁻¹ sendo então comparada com aquela resposta inicial. Após 30 dias (ou 120 determinações) resposta do biossensor foi 89,0 % da resposta inicial.

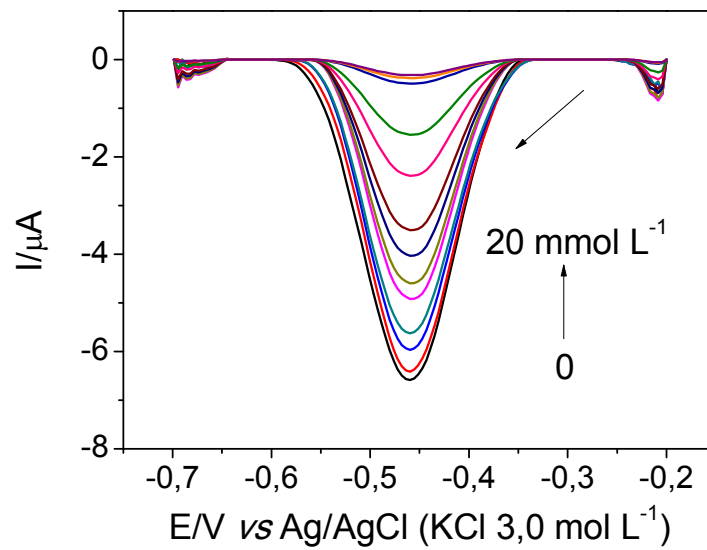


Figura 3. 10. Voltamogramas de onda quadrada do biossensor GOx-CNTs-DHP/GCE em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) em N₂-saturado e nas seguintes concentrações: 0; 0,05; 1,5; 2,5; 4,2; 7,0; 8,6; 11; 15; 18 e 20 mmol L⁻¹ de glicose.

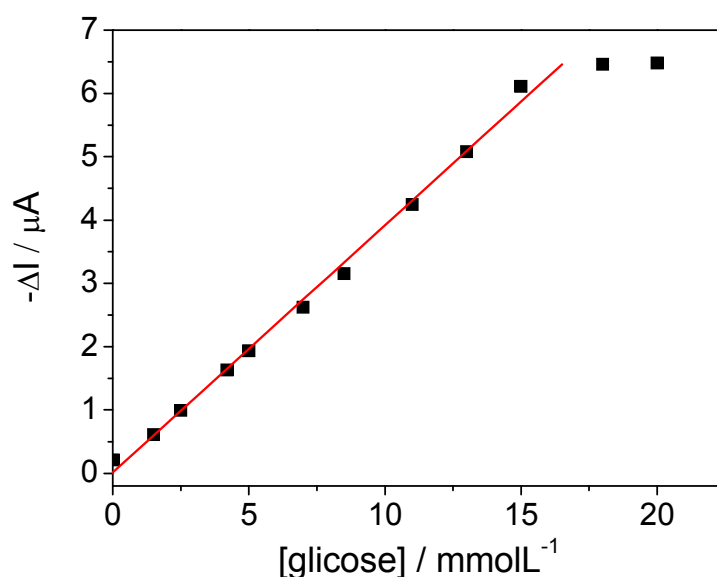


Figura 3. 11. Curva analítica do biossensor GOx–CNTs–DHP/GCE em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) em N₂-saturado na presença de 0,05; 1,5; 2,5; 4,25; 7,0; 8,55; 11; 13;15; 18 e 20 mmol L⁻¹ de glicose. A curva analítica apresenta a equação $-\Delta I_p \text{ (mA)} = 0,011 + 30 C \text{ (mmol L}^{-1}\text{)}$ com um coeficiente de correlação de 0,994. O limite de detecção obtido foi de 9,0 μmol L⁻¹ com base na relação sinal-ruído.

Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Menten estudaram a relação entre o substrato e a enzima, e postularam que o centro ativo da enzima e o substrato estão em equilíbrio até a formação do produto. Um valor estimado da taxa de afinidade entre a enzima e o substrato sem mudança de substrato para o produto pode ser fornecido pela constante cinética aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app})¹⁰⁶. Portanto, a probabilidade de formação de produto por ligação entre o centro ativo da enzima e o substrato é inversamente proporcional à K_M^{app} . O valor da K_M^{app} pode ser obtido pela análise de regressão linear usando a Eq. 7 de Lineweaver-Burk^{106,145}. Portanto, a K_M^{app} pode ser simplesmente obtida multiplicando a inclinação pela I_{max} , resultando em um valor de K_M^{app} de 11,0 mmol L⁻¹ para glicose.

$$I_p^{-1} = I_{\text{max}}^{-1} + K_M^{\text{app}} I_{\text{max}}^{-1} [\text{glicose}]^{-1} \quad \text{Eq. 7}$$

A Tabela 3.1 apresenta os valores K_M^{app} relatados na literatura para diversos biossensores para glicose. O valor K_M^{app} obtidos neste trabalho é semelhante a vários trabalhos apresentados na literatura, indicando uma alta afinidade do sítio ativo FAD imobilizado no biossensor pela glicose.

Tabela 3. 1.Valores de K_M^{app} para diferentes biossensores contendo glicose oxidase

Biossensor*	K_M^{app} (mmol L⁻¹)	Referência
GOx/ZnO/GOx/CNTs/GCE	2,5	146
ZnO/(PSS/PDDA)/GOx	3,1	147
GOx/AuNPs/PtNPs/CNTs/Au	11	148
GOx/SnS ₂ /Nafion/GCE	7,6	149
Au/MPS/TH/(SCGNPs/TH)/GOx/HRP	1,2	150
GOx/grafeno-CTS/GCE	4,4	151
(GOx/AuNPs/CNTs)/Pt	15	152
GOx-CNTs-DHP/GCE	11	Este trabalho

PSS- poli(4-estirenosulfonato de sódio); PDDA poli(dialildimetilamonio); PtNPs- nanoartículas de platina; SCGNPs/TH- nanopartículas de ouro encapadas com sulfonato /tionina; HRP-peroxidase de raiz forte; CTS- quitosana.

As possíveis interferências de espécies como L-ascorbato, cisteína e acetaminofenol em concentrações 10 vezes maiores que a de glicose 1,0 mmol L⁻¹ foram investigadas, sendo que as interferências foram inferiores a ± 5 %. A Tabela 3.2 apresenta os valores de interferência para o biossensor Gox-CNTs-DHP/GCE.

Tabela 3. 2. Estudo de interferência para o eletrodo biossensor GOx–CNTs–DHP/GCE

Interferente	Interferência (%)
L-ascorbato	+4,5
Cisteína	-1,8
Acetaminofenol	-3.8

O teor de glicose em amostras de soro humano foi determinado pelo método da adição de padrão como apresentado na Tabela 3.3. A concentração de glicose foi determinada em amostras de soro e o valor de recuperação de glicose variou entre 96% e 104%.

Tabela 3. 3. Determinação de glicose em amostras de soro

Amostra	Soro (mmol L ⁻¹)	Biossensor (mmol L ⁻¹)	Recuperação(%)	RSD
A	5,0	5,2	104	±0,2
B	5,0	4,9	98	±0,1
C	5,0	4,8	96	±0,5

n=3

O limite de detecção obtido neste trabalho foi comparável aqueles biossensores para glicose de terceira geração, mostrando um bom desempenho analítico e compatível com os biossensores descritos na literatura como pode ser observado na Tabela 3.4.

Tabela 3. 4 Comparação entre alguns biossensores de terceira geração para glicose reportados na literatura e o biossensor proposto nesta tese

Biossensor	Faixa Linear (mmol L ⁻¹)	Limite de detecção (μmol L ⁻¹)	Referência
CNTs@SnO ₂ -Au _{nano} /GOx	4,0 a 12,0	5,0	Li et al ¹⁵³
GOx-Au _{nano} -DHP/GCE	5,0 a 9,3	100	Wu and Hu ⁷⁹
GOx/CNTs-PCD/GCE	0,5 a 8,0	NA	Xue et al ¹⁵⁴
GOx/Tm ₂ O ₃ /Nafion/GCE	1,0 a 7,0	NA	Li et al ¹⁵⁵
GOx-CNT-DHP/GCE	0,020 a 15,0	9,0	Este trabalho

Au_{nano}-nanopartículas de ouro; PCD- ácido cítrico e sorbitol; SnO₂- Dióxido de estanho; Tm₂O₃- óxido de Túlio; NA = Não apresentado

3.4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, um biossensor eletroquímico foi construído modificando-se um eletrodo de carbono vítreo com GOx e nanotubos de carbono funcionalizados em filme de DHP. O eletrodo apresentou boa bioatividade da GOx em CNTs e DHP formando um compósito estável e uniforme. Resultados de voltametria cíclica mostraram dois picos bem definidos, um de redução e outro de oxidação correspondente a reação redox FAD/FADH₂, atribuído a transferência eletrônica direta da GOx. O gráfico da dependência de E_{pc} vs. pH indicou que a transferência de elétrons direta da GOx para o eletrodo se deu pelo mesmo número prótons e elétrons. Outro fato importante é que o método apresentado pode ser usado para a imobilização de outras enzimas. Além disso, o biossensor desenvolvido poder ser aplicado para a determinação de glicose sem a presença de oxigênio nas amostras de soro humano a partir da voltametria de onda quadrada.

**BIOSENSOR DE TERCEIRA GERAÇÃO BASEADO EM UM ELETRODO DE
DIAMANTE DOPADO COM BORO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE
OURO E TIROSINASE**

CAPÍTULO 4

4. Biossensor de terceira geração baseado em um eletrodo de diamante dopado com boro modificado com nanopartículas de ouro e tirosinase

4.1. Objetivos específicos

O objetivo deste procedimento é o desenvolvimento de um biossensor utilizando tirosinase (Tyr) imobilizada em nanopartículas de ouro (AuNPs) sobre a superfície de um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) para a determinação de fenol em amostras de águas.

4.2. EXPERIMENTAL

4.2.1. Reagentes

Tirosinase (extraída de cogumelos) 15 KU mg⁻¹, HAuCl₄, fenol foram obtidos da Aldrich. Glutaraldeído 25% (GA) e cistamina (CIS) foram obtidos da Sigma. Todos os outros produtos químicos foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura Milli-Q. As soluções de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) utilizadas como eletrólito suporte foram preparadas a partir de Na₂HPO₄ e NaH₂PO₄. A solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ foi utilizada como eletrólito suporte para a eletrodeposição das AuNPs.

4.2.2. Eletrodeposição das AuNPs em BDD

A eletrodeposição de nanopartículas metálicas é uma ótima metodologia para a modificação de eletrodos, na qual a taxa de deposição pode ser facilmente

controlada pelo potencial ou densidade de corrente¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Para a eletrodeposição de nanopartículas com tamanho e forma controlada é importante ter conhecimento da cinética da reação e do mecanismo de formação da nanopartícula. A eletrodeposição de nanopartículas metálicas pode ser alcançada com sucesso em diversos tipos de materiais eletródicos¹⁵⁹.

Um eletrodo de filme de diamante dopado com boro (BDD) fabricado pelo *Centre Suisse de Electronique et de Microtechnique SA* (CSEM), em Neuchâtêl, Suíça, com um teor de boro de 8000 ppm foi utilizado como substrato para construção do biossensor. Antes da eletrodeposição das AuNPs, este eletrodo foi pré-tratado catodicamente^{69,160} em uma solução H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ aplicando $-0,5 \text{ A cm}^{-2}$ durante 300 s (estudos preliminares com um pré-tratamento anódico indicaram baixo rendimento na eletrodeposição das AuNPs).

A eletrodeposição das nanopartículas de ouro foi realizada em uma solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando uma concentração fixa de HAuCl_4 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. A deposição eletroquímica de nanopartículas de ouro na superfície do BDD (AuNPs / BDD) foi realizada por amperometria pela aplicação de um potencial ao eletrodo de BDD. A eletrodeposição foi otimizada através de um planejamento fatorial de dois níveis, no qual as variáveis foram o potencial de redução ($-0,2 \text{ V}$ e $-0,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$)) e o tempo de eletrodeposição (20 s ou 40 s) no processo de obtenção das respostas (tamanho das AuNPs) para eletrodeposição de nanopartículas de ouro (Tabela 4.1). A morfologia e o tamanho das nanopartículas de Au eletrodepositadas foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um microscópio Supra 35-VP, Carl Zeiss, Alemanha, com a energia do feixe de elétrons de 20 keV.

Tabela 4. 1. Variáveis selecionadas e respectivos níveis para a eletrodeposição das AuNPs sobre eletrodo de BDD

Variável	Nível	
	+1	-1
Potencial de eletrodeposição/ V	-0,4	-0,2
Tempo de eletrodeposição / s	40	20

4.2.3. Preparação do biossensor Tyr-AuNPs/BDD

Particularmente, as enzimas, possuem dimensões semelhantes às AuNPs, de modo que, nos últimos anos considerável atenção tem sido dada ao uso combinado de AuNPs e biomoléculas¹⁶¹, o que motivou a construção de um biossensor utilizando AuNPs, a enzima Tyr e o eletrodo de BDD.

O eletrodo AuNPs/BDD foi modificado imergindo-o em uma solução aquosa de cistamina (CIS) 10,0 mmol L⁻¹ por 2 h em temperatura ambiente. Por conseguinte, o eletrodo foi lavado com solução tampão fosfato (pH 7,0) abundantemente. Então, AuNPs/BDD foi imerso em GA 2,5% por 2 h e novamente lavado com tampão fosfato. Finalmente, o eletrodo foi imerso em uma solução contendo 1,0 mL de solução de tampão fosfato com 0,10 mg de tirosinase 15 kU (1500 U) por 2 h e, em seguida, cuidadosamente lavado com solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,0). O processo de fabricação é apresentado na Figura 4.1. O biossensor Tyr-AuNPs/BDD, quando não utilizado foi armazenado em solução tampão fosfato (pH 7,0) a 4 °C.

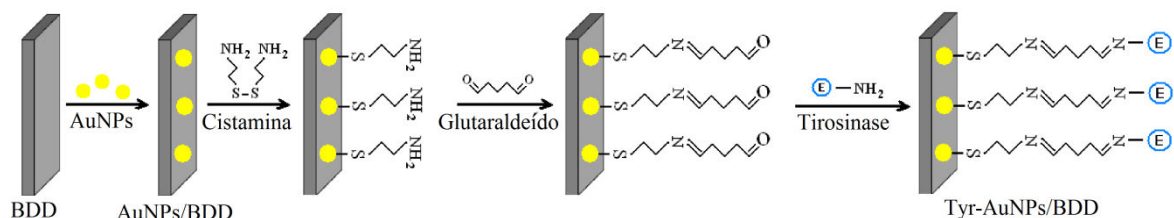


Figura 4. 1. Esquema de fabricação do eletrodo Tyr-AuNPs/BDD.

4.2.4. Morfologia

As superfícies dos eletrodos BDD e AuNPs/BDD foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de alta resolução, utilizando um equipamento modelo FEG XL30 da Phillips®.

4.2.5. Medidas eletroanalíticas

As medidas eletroanalíticas foram executadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT12[®] (Eco Chemie) gerenciado pelo programa computacional GPES 4.9. A determinação dos valores de pH das soluções foi realizada com um pHmetro digital ORION[®], modelo EA 940.

4.2.6. Célula eletroquímica

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula de compartimento único de 15 mL, confeccionada em vidro Pyrex, sempre adicionando uma alíquota de 10 mL de eletrólito suporte para a realização das medidas eletroquímicas.

4.2.7. Eletrodos

Utilizou-se um sistema de três eletrodos, sendo que, o eletrodo de trabalho foi o biossensor, um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e outro de platina como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente.

4.2.8. Amostras

Prepararam-se as amostras de água de torneira retiradas do Laboratório de Analítica, Bioanalítica, Biossensores, Eletroanalítica e Sensores da Universidade Federal de São Carlos. Essa água é proveniente de um poço artesiano, sendo adicionada a ela solução de hipoclorito. A essas amostras adicionaram-se alíquotas de uma solução padrão de fenol 1,0 mmol L⁻¹.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Obtenção e caracterização do eletrodo AuNPs/BDD

4.3.1.1. Obtenção do eletrodo AuNPs/BDD

Eletrodos à base de carbono ao lado dos eletrodos de nanopartículas de ouro, têm sido extensivamente utilizados como substratos para eletroanálise¹⁵⁹. Neste contexto, o uso de eletrodos de diamante abre novas oportunidades para a bioanalítica. Os eletrodos de diamante dopado com boro (BDD) apresentam propriedades bastante interessantes para eletroanalítica, como por exemplo, corrente de fundo relativamente baixa, alta estabilidade eletroquímica e robustez mecânica de aplicação, ampla janela de potencial e baixa sensibilidade por oxigênio dissolvido em solução⁶⁶. Neste contexto, alguns grupos de pesquisa foram motivados a desenvolver novos métodos para a preparação de nanopartículas metálicas sobre eletrodos de diamante dopado com boro⁷⁰. Portanto, eletrodos BDD/AuNPs são promissores para o desenvolvimento de biossensores e uma alternativa interessante para a interface do eletrodo.

Inicialmente estudaram-se os efeitos dos parâmetros eletroquímicos como tempo e potencial de eletrodeposição sobre o tamanho do AuNPs usando planejamento fatorial. A Tabela 4.2 mostra o planejamento fatorial e os resultados obtidos para o tamanho do AuNPs/BDD. Estes indicaram que ambos os parâmetros possuem uma influência significativa sobre o tamanho das AuNPs formadas no eletrodo de BDD. A melhor condição experimental (menor tamanho das AuNPs) foi obtida com o experimento 4 (potencial de eletrodeposição mais negativo (-0,4 V) e maior tempo de eletrodeposição (40 s)), sendo estes parâmetros selecionados para experimentos posteriores. Para o caso do eletrodo de diamante dopado com boro utilizou-se um potencial constante para a obtenção das nanopartículas de ouro, pois se trabalhou com um eletrodo de referência. No caso do Capítulo 5 as nanopartículas foram eletrodepositadas com corrente constante já que o eletrodo de referência utilizado foi um pseudo-referência de prata, podendo haver pequena variação de potencial entre os eletrodos de referência.

Tabela 4. 2. Respostas do planejamento fatorial 2^2

Ordem	Potencial de eletrodeposição/V	Tempo de eletrodeposição/s	Tamanho das AuNPs/nm
1	-1	-1	102
2	-1	1	77
3	1	-1	89
4	1	1	33

$E_{ap} -1 = -0,2 \text{ V}$ $E_{ap} 1 = -0,4 \text{ V}$ $t_{ac} -1 = 20 \text{ s}$ $t_{ac} 1 = 40 \text{ s}$

4.3.1.2. Caracterização do eletrodo AuNPs/BDD

A preparação de nanopartículas eletrodepositadas sobre um substrato envolve dois processos básicos: a nucleação e o crescimento das partículas. Uma vez que estes processos podem muitas vezes acontecer simultaneamente, então, o número de partículas sintetizadas, o tamanho das mesmas e sua distribuição dependem em grande parte da concorrência entre nucleação e crescimento. Neste trabalho, as AuNPs foram depositadas diretamente sobre a superfície do eletrodo de BDD usando a deposição eletroquímica. A Figura 4.2 mostra uma típica imagem de MEV da superfície do BDD (A) e AuNPs sobre uma superfície BDD (B), onde observa-se que as AuNPs foram depositadas com sucesso sobre a superfície do eletrodo, com uma forma quase esférica e uma distribuição simétrica.

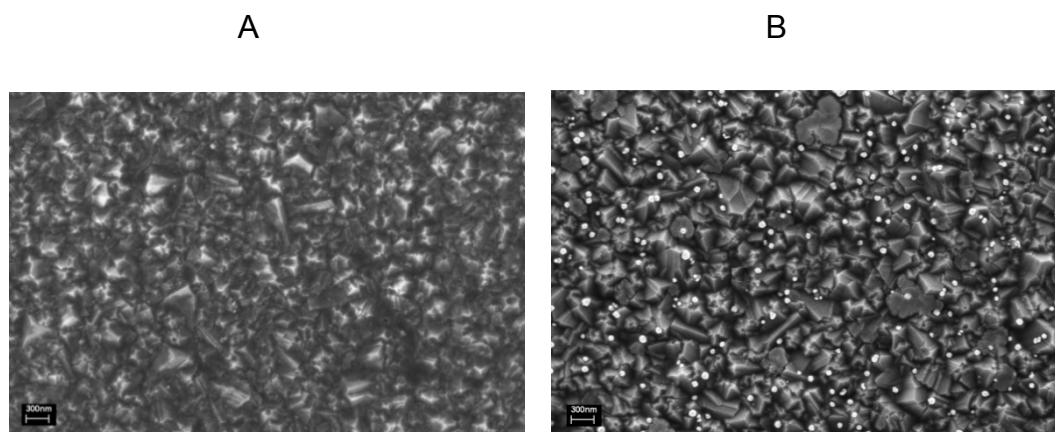


Figura 4. 2. Imagens de MEV dos eletrodos de BDD (A) e AuNPs/BDD (B) com aumento de 50000x. Potencial de eletrodeposição = -0,4 V e tempo de eletrodeposição = 40 s.

A área eletroativa dos eletrodos de BDD e AuNPs/BDD foram estimadas empregando-se a equação (Eq 1) de Randles-Sevcik apresentada na secção 3.3.4. utilizando a voltametria cíclica em diversas velocidades de varredura, em KCl 0,1 mol L⁻¹ na presença de 1,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]⁴⁻.

Assim, as áreas eletroativas dos eletrodos BDD e AuNPs/BDD apresentaram valores de 0,30 e 0,26 cm², respectivamente. A confirmação destes resultados pode ser observada na Figura 4.3, onde o eletrodo de BDD apresentou correntes de pico ligeiramente maiores que aquelas obtidas empregando-se o eletrodo AuNPs/BDD. Portanto, não se observou nenhuma diferença significativa entre as áreas eletroativas determinadas. Esses resultados estão em consonância com aqueles obtidos por Chikae e colaboradores¹⁶² sobre a eletrodeposição de nanopartículas metálicas de platina e ouro sobre a superfície de eletrodo de carbono impresso. Uma hipótese para a menor área eletroativa é que as nanopartículas de ouro possam estar eletrodepositadas sobre os átomos de boro presentes no eletrodo de BDD. Um estudo sistemático com eletrodos de BDD com diferentes níveis de dopagem seria necessário para confirmar esse pressuposto.

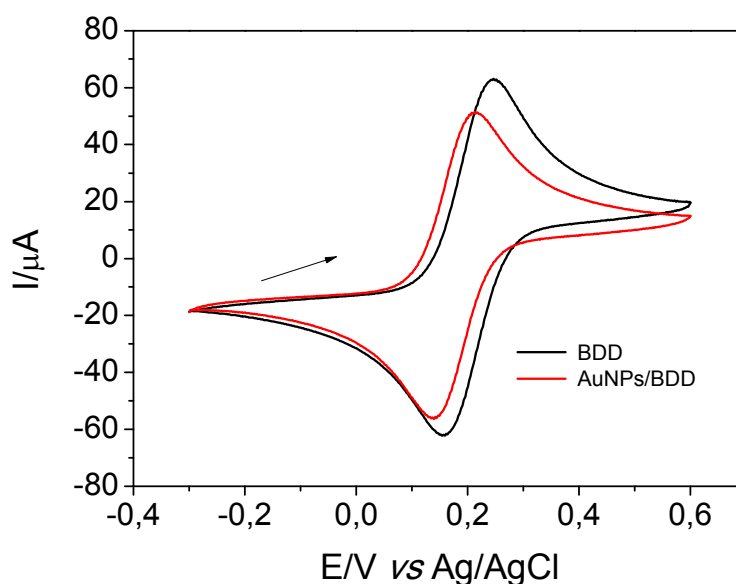


Figura 4. 3. Voltamogramas cíclicos obtidos a partir de um eletrodo de BDD e AuNPs/BDD na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

4.3.2. Biossensor Tyr-AuNPs/BDD

A Figura 4.4 mostra a diferença entre os ciclovoltamogramas (CV) obtidos em tampão fosfato (pH 7,0) para os eletrodos de BDD, AuNPs/BDD, e Tyr-AuNPs/BDD em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Observou-se que não há diferença no perfil dos ciclovoltamogramas para os eletrodos de BDD (a), AuNPs/BDD (b). Há um pequeno aumento da resistividade para o eletrodo AuNPs/BDD, mas não chega a causar problemas na transferência de elétrons entre as AuNPs e o eletrodo de BDD. O eletrodo Tyr-AuNPs/BDD exibiu um ciclovoltamograma bem definido com os picos catódico e anódico em 8 e 222 mV respectivamente, e de mesma magnitude (Figura 4c). Esses picos redox são atribuídos à reação redox do centro ativo da enzima tirosinase (enzima que possui átomos de cobre como centro ativo), apresentando a diferença entre os valores de pico anódico e catódico de $\Delta E_p = 214 \text{ mV}$ e um potencial formal redox (E_M) de 115 mV. A presença da enzima Tyr no biossensor, que contém um centro eletroativo (cobre), pode proporcionar a transferência de elétrons, à partir de um lado de seus tetrâmeros, possivelmente ligado à AuNPs/BDD ocorrendo então a transferência

direta de elétrons¹⁰⁶. Essencialmente, as reações redox da Tyr estão relacionadas ao processo redox entre Cu (I) e Cu (II). Os resultados obtidos com o biossensor Tyr-AuNPs/BDD, indicam que as AuNPs eletrodepositadas no eletrodo de BDD podem ser um importante contribuinte para o comportamento eletroquímico do biossensor, como observado na Figura 4.1, promovendo a transferência direta de elétrons do centro ativo da enzima e o eletrodo¹⁶³.

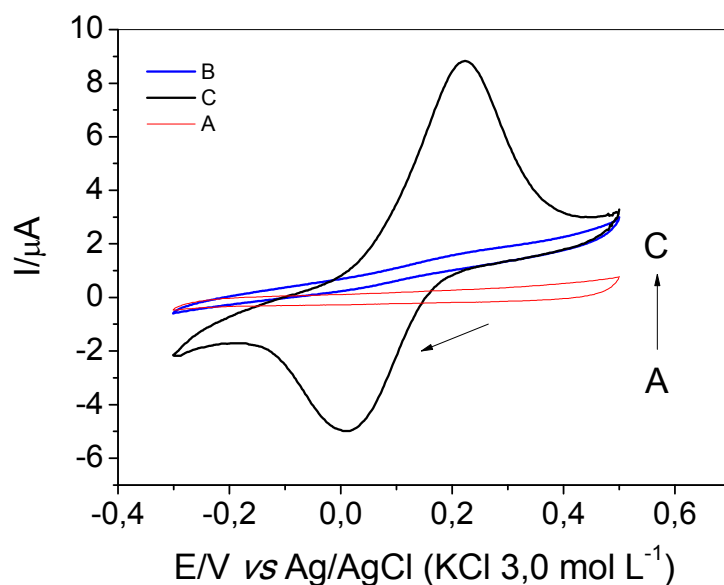


Figura 4. 4. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos BDD (A); AuNPs/BDD (B); e Tyr-AuNPs/BDD (C) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Para o biossensor as reações redox estão relacionadas ao processo redox entre Cu (I) e Cu (II) presentes na enzima tirosinase

O efeito da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica de Tyr-AuNPs/BDD foi estudado, sendo que ambas as correntes de pico catódica e anódica e separação dos picos aumentaram com o aumento da velocidade de varredura, como pode ser observado na Figura 4.5.

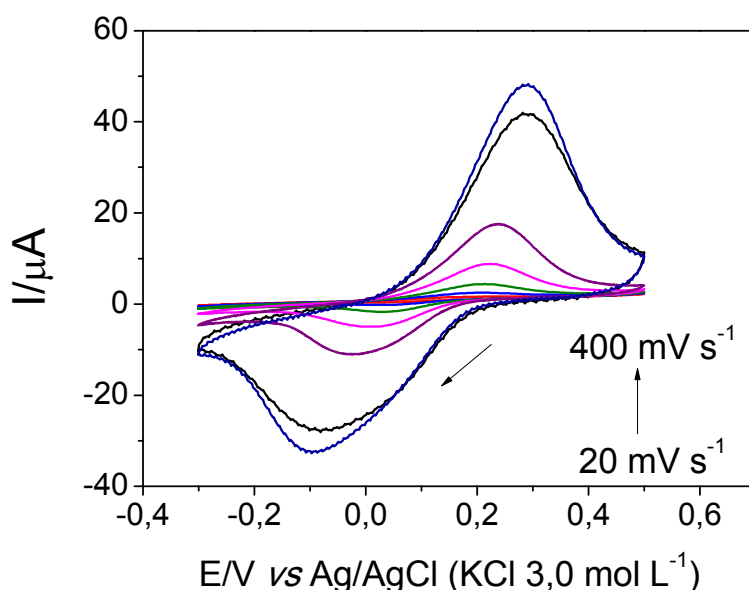


Figura 4. 5. Voltamogramas cíclicos do eletrodo Tyr-AuNPs/BDD em diferentes velocidades de varredura de varredura em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

As correntes de pico anódica e catódica são linearmente proporcionais à velocidade de varredura variando de 20 a 400 mV s⁻¹, indicando que a reação do eletrodo ocorre na monocamada redox. A partir das equações de Laviron¹⁴² (Eqs. 2-4) podem-se obter informações como o coeficiente de transferência e constante de transferência heterogênea para eletrodos com essas características a partir das Figuras 4.6 A e 4.6 B. O estudo do biossensor Tyr-AuNPs/BDD em diferentes velocidades de varreduras de potencial mostrou que a reação não é controlada por difusão, mas sim pela enzima imobilizada na superfície do eletrodo¹⁰⁷, como esperado para sistemas com enzimas imobilizadas.

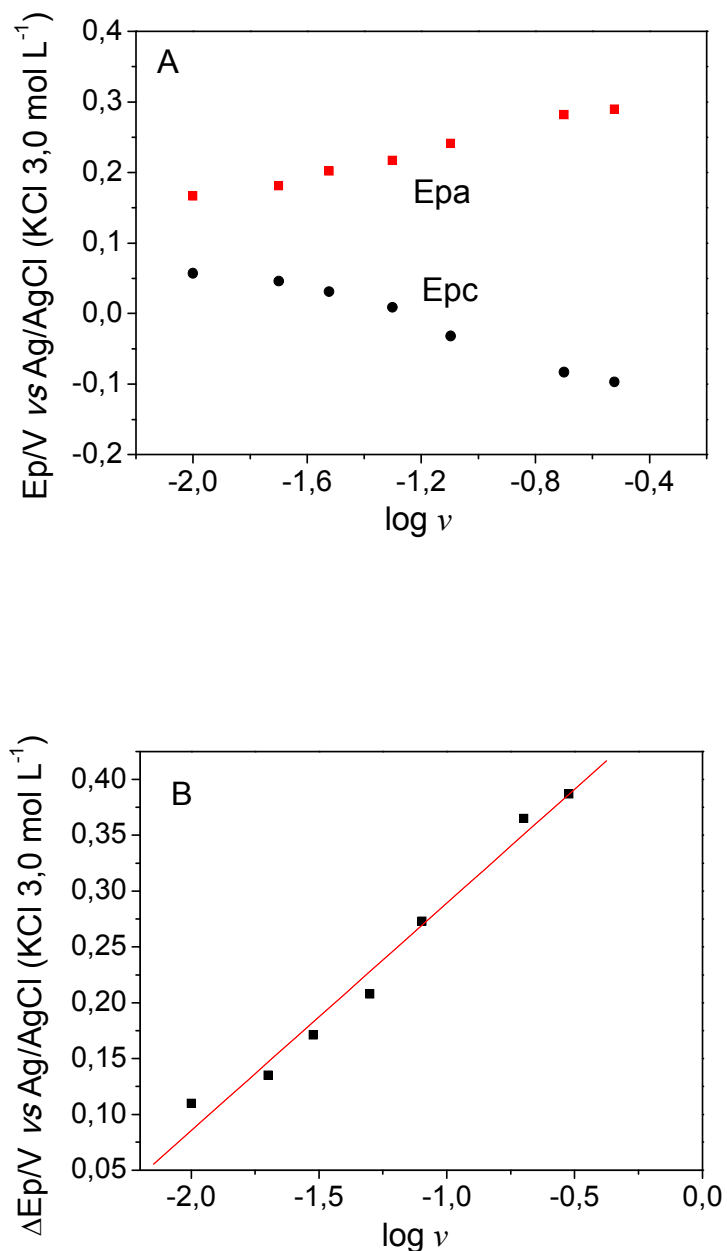


Figura 4. 6. Potenciais de pico anódico e catódico (E_{pc} vs o log ν (A)) e ΔE_p vs log ν (B).

Por meio dos gráficos apresentados nas Figura 4.6 A, o α calculado foi de 0,45. Colocando-se em gráfico ΔE_p em função de log ν (Figura 4.6 B), o valor de k obtido foi de $0,032 \text{ s}^{-1}$, valor esse concordante ($0,030 \text{ s}^{-1}$) com aquele obtido por Ye & ZHOU⁸⁷ empregando-se um eletrodo de prata com a enzima tirosinase em solução aquosa.

4.3.3. Determinação de fenol por voltametria de onda quadrada

Tirosinase é uma enzima contendo cobre que converte os compostos fenólicos para as quinonas correspondentes, na presença de oxigênio. Assim, as quinonas geradas podem ser reduzidas eletroquimicamente em baixo potencial. Os compostos fenólicos podem ser detectados por redução eletroquímica da *o*-quinonas geradas como apresentado na literatura¹⁰⁴. Portanto, a corrente de pico catódica aumenta com adição de fenol pela SWV como observado na Figura 4.7. Os aumentos no pico de redução confirmaram que o biossensor Tyr-AuNPs/BDD apresenta excelente capacidade catalisadora para realizar a redução de fenol.

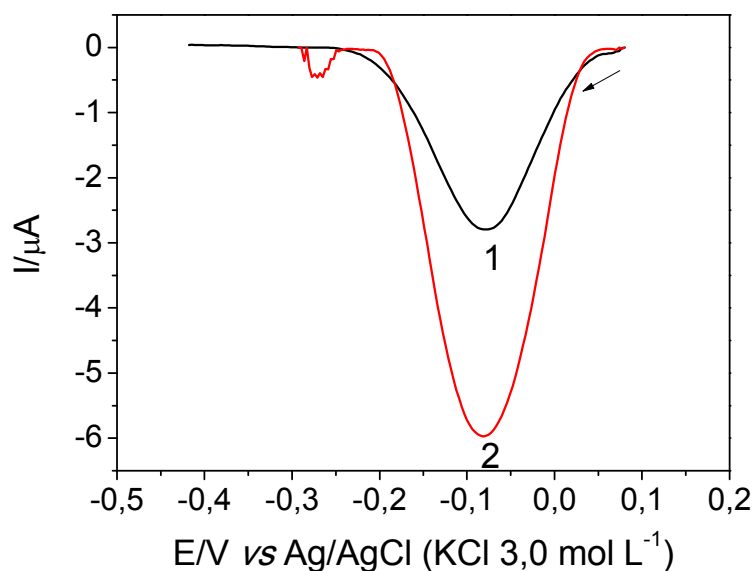


Figura 4. 7. Voltamogramas de onda quadrada do biossensor Tyr-AuNPs/BDD em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (1), e na presença de fenol $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (2). Os parâmetros de voltametria de onda quadrada foram $f=50 \text{ Hz}$; $a= 20 \text{ mV}$; $\Delta E=2 \text{ mV}$.

A otimização dos parâmetros experimentais da voltametria de onda quadrada (SWV) foi realizada utilizando uma solução de fenol $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). A frequência (f) é um parâmetro importante na SWV, a qual determina a intensidade do sinal analítico e, por sua vez, a sensibilidade da técnica. Observou-se que houve um aumento de corrente até uma $f=50 \text{ Hz}$ e, assim, esta frequência foi selecionada para estudos posteriores. A amplitude de pulso (a), outro parâmetro que influencia os valores da corrente de pico

na SWV, foi também estudada. Os resultados obtidos mostraram um aumento dos valores da corrente de pico até 50 mV, sendo assim este valor foi selecionado para estudos posteriores. A taxa de variação do potencial na SWV é o produto entre a frequência e o incremento de varredura (ΔE_s). Portanto, este último parâmetro também pode aumentar o sinal e sensibilidade da técnica. Neste estudo, as correntes de pico aumentaram de forma significativa para ΔE_s até aproximadamente 4 mV, depois de se estabilizar. Assim, para aplicações analíticas, o valor de ΔE_s foi fixado em 4 mV.

A relação entre o aumento da corrente de pico de redução e as diferentes concentrações de fenol foi examinada como observado na Figura 4.8. O aumento da corrente de pico catódica (-0,1V) é linearmente proporcional à concentração de fenol em um intervalo de concentração de 0,1 a 11,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 4.9), com uma equação correspondente a $\Delta I_p \text{ (mA)} = 1,42 + 1,8 C \text{ (}\mu\text{mol L}^{-1}\text{)}$ e um coeficiente de correlação de 0,994 para a curva analítica apresentada Figura 4.9.

O limite de detecção (LD) foi calculado pelo método da relação sinal-ruído. Para determinar a relação sinal-ruído, é realizada uma comparação entre a medição dos sinais de uma solução de referência (10 mmol L^{-1} de fenol devidamente diluído na célula eletroquímica) em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse e um branco (matriz isenta do composto de interesse, neste caso foi utilizado o eletrólito suporte). Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser detectada, na qual a relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1. Neste trabalho a relação foi de 3 vezes o sinal ruído para o cálculo do LD¹⁴⁴. Portanto, o limite de detecção foi de 0,07 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para fenol

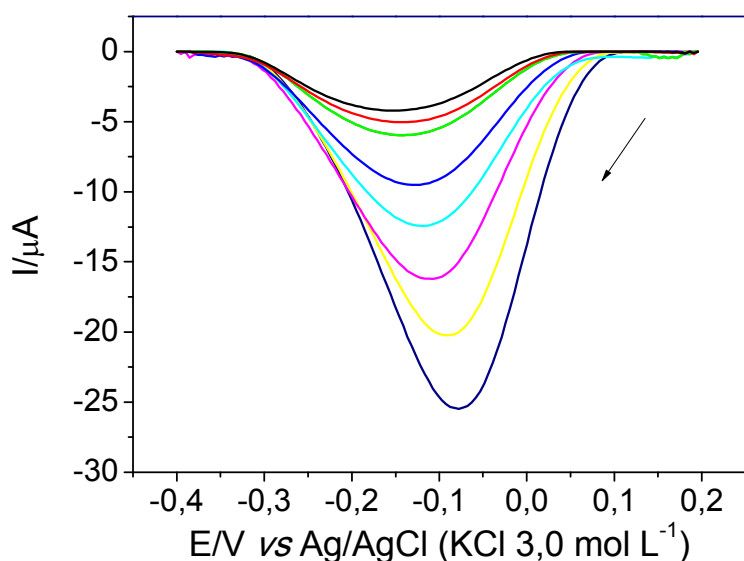


Figura 4. 8. Voltamogramas de onda quadrada do biossensor Tyr-AuNPs/BDD em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na presença de diversas concentrações: 0; 0,1; 1,0; 2,0; 4,9; 7,0; 9,0 e $11 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de fenol. Os parâmetros de voltametria de onda quadrada foram $f=50 \text{ Hz}$; $a= 50 \text{ mV}$; $\Delta E=4 \text{ mV}$.

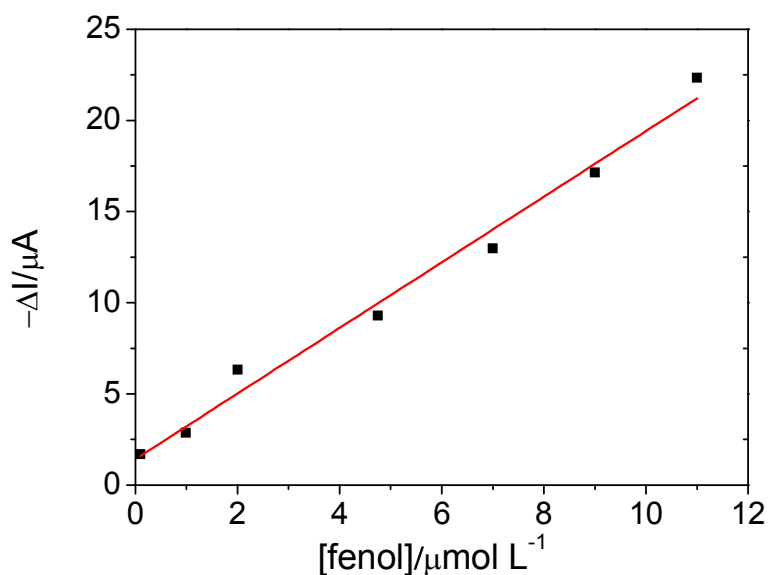


Figura 4. 9. Curva analítica do biossensor Tyr-AuNPs/BDD em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para concentrações de fenol variando de $0,1$ a $11,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. A equação da reta foi de $\Delta I_p (\mu\text{A}) = 1,42 + 1,8 C (\mu\text{mol L}^{-1})$; um coeficiente de correlação de $0,994$ e o limite de detecção foi de $0,07 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para fenol

Realizou-se o estudo de repetibilidade intra-dia, no qual o biossensor apresentou um desvio padrão relativo (RSD) de 3,4 % para o fenol, valor obtido por cinco medidas repetidas na presença $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ do analito de interesse. Por conseguinte, realizou-se o estudo da repetibilidade entre-dias, na presença de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fenol, onde obteve-se um RSD de 4,2% a partir de 5 medidas, realizadas uma por dia, em 5 dias diferentes. Então, estudou-se a reprodutibilidade entre eletrodos, a partir da resposta voltamétrica de cinco diferentes biossensores Tyr-AuNPs/BDD na presença de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fenol utilizando, os quais apresentaram um RSD de 4,8 %.

A estabilidade do biossensor foi investigada para a resposta do biossensor na mesma concentração do analito utilizado nos estudos anteriores durante 30 dias, quando a resposta do biossensor diminuiu para 85% para o fenol após um mês de ensaio (90 determinações). A estabilidade do biossensor pode ser atribuída à biocompatibilidade entre AuNPs e tirosinase.

Um valor estimado da afinidade entre a enzima e o substrato pode ser fornecido pela constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app})¹⁴⁵. Assim, a probabilidade de formação de produto por ligação entre o centro ativo da enzima e o substrato é inversamente proporcional à K_M^{app} . O valor da K_M^{app} pode ser obtido pela análise de regressão linear usando a equação 7 de Lineweaver-Burk¹⁰⁶ apresentado na secção 3.3.7. Portanto, a K_M^{app} pode ser simplesmente obtida multiplicando a inclinação pela I_{max} , resultando em um valor de K_M^{app} de $13,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o fenol.

A Tabela 5 apresenta os valores K_M^{app} relatados na literatura para diferentes biossensores contendo a tirosinase. O valor K_M^{app} obtido neste trabalho é o terceiro melhor valor, indicando uma alta afinidade do substrato fenol e o centro ativo da enzima (Cu(I)/Cu(II)) imobilizada no biossensor. Comparando por exemplo o biossensor desenvolvido por Sanz e colaboradores¹⁶⁴, o biossensor Tyr-AuNPs/BDD apresentou uma ordem de magnitude menor no valor de K_M^{app} .

Tabela 4. 3. Valores de K_M^{app} para diferentes biossensores contendo Tyr para fenol

Biossensor*	$K_M^{app} / \mu\text{mol L}^{-1}$	Referencia
Nafion/Tyr/ZnO/GCE	240	165
Tyr-MPA-AuE	146	166
Tyr-AuNPs-GCE	140	164
Tyr-Au-CPE	53,6	109
Tyr-SWNTs	30,0	167
GCE/ZnO/chitosan/Tyr	23,0	168
Tyr-AuNPs/BDD	13,0	Tyr-AuNPs/BDD
Nano-HA/CTS/Tyr/AuE	1,31	114
Tyr/PANI-IL-CNF/GCE	1,16	169

MPA: ácido 3-mercaptopropiônico; CPE: eletrodo de pasta de carbono; Nano-HA: nanopartículas de hidroxihapatita; PANI: polianilina; IL: líquido iônico; CNF: nanofibras de carbono

4.3.4. Estudo de interferentes

Para avaliar a seletividade do biossensor, a influência de algumas substâncias geralmente encontradas em amostras de águas foram avaliados em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fenol na presença de interferentes como carbonato, cloreto, sulfato, brometo e iodeto em excesso de 100 vezes como observado na Tabela 4.4. Os resultados mostraram que essas substâncias causaram interferência menor que 5% na determinação de fenol em amostras de água.

A presença de outros compostos fenólicos, tais como catecol, guaiacol entre outros, poderiam causar interferência, já que poderiam ser eletroativos no mesmo potencial de trabalho do biossensor proposto. Em caso de interferência, a determinação de fenóis totais seria uma possibilidade viável.

Tabela 4. 4. Estudo de interferência para o biossensor Tyr-AuNPs/BDD

Interferente	Interferência (%)
Carbonato	+4,1
Cloreto	+2,0
Iodeto	-3,4
Brometo	-0,5
Sulfato	+1,4

4.3.5. Aplicação

O biossensor Tyr-AuNPs/BDD foi então aplicado para a determinação do teor de fenol em amostras de águas de torneira, pelo método de adição de padrão. Foram realizadas três determinações para cada amostra, e os desvios-padrão foram calculados. A Tabela 4.5 apresenta as concentrações de fenol determinadas em águas empregando o método proposto e o método espectrofotométrico. Aplicando-se o teste t pareado¹⁷⁰ nos resultados obtidos utilizando os dois métodos analíticos, obteve-se um valor de t igual a 1,50 que foi menor que o valor crítico (12,7, $\alpha = 0,05$), indicando assim que os teores de fenol determinados empregando-se os dois métodos analíticos são concordantes a um nível de confiança de 95%.

Tabela 4. 5. Resultados obtidos na determinação de fenol em amostras de águas de torneira fortificadas utilizando o método espectrofotométrico e o método proposto

Amostras	Concentração de fenol (10^{-7} mol L ⁻¹)		
	Método comparativo*	Método proposto	Erro relativo %
A	9,7 ± 0,1	9,8 ± 0,2	1,0
B	25,5 ± 0,2	26,0 ± 0,3	2,0

*Método espectrofotométrico¹⁰³

4.4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram eletrodepositadas AuNPs com sucesso sobre o eletrodo de BDD controlando-se o potencial e tempo de deposição. As melhores variáveis foram previamente selecionadas com o auxílio de um planejamento fatorial. A transferência direta de elétrons foi obtida no eletrodo Tyr-AuNPs/BDD atribuído pelo uso das AuNPs e BDD. O centro eletroativo de Tyr (par redox Cu(I)/Cu(II)), apresentou um par redox (um pico anódico e um pico catódico) relacionados às reações entre Cu(II) e Cu(I). A enzima tirosinase foi efetivamente imobilizada nas AuNPs, resultando em um biossensor que exibe resposta rápida, alta sensibilidade e estabilidade para a detecção voltamétrica de compostos fenólicos. Os resultados demonstraram que o BDD pode ser um substrato que oferece diversas vantagens, como a estabilidade química e eletroquímica, sendo um bom eletrodo para a construção de biossensores. O uso de AuNPs em BDD é uma alternativa interessante para imobilizar outras biomoléculas em trabalhos futuros.

IMUNOSSENSOR PARA PROLACTINA UTILIZANDO ELETRODOS DE
CARBONO IMPRESSO MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE OURO

CAPÍTULO 5

5. Imunossensor para prolactina utilizando eletrodos de carbono impresso modificados com nanopartículas de ouro

5.1. Objetivos específicos

Desenvolver e aplicar um imunossensor descartável para a determinação de prolactina (PRL) utilizando eletrodos de carbono impresso (*do inglês, Screen printed carbon electrode, SPCE*) modificados com AuNPs eletrodepositadas

5.2. EXPERIMENTAL

5.2.1. Reagentes e soluções

Ácido tetracloroáurico (III) (Aldrich) foi usado para modificação dos SPCEs. Estreptavidina de *Streptomyces avidinii* (≥ 13 unidades mg^{-1} de proteína) foi obtida da Sigma. Soluções de $0,70 \text{ mg mL}^{-1}$ de estreptavidina foram preparadas em meio de tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Antiprolactina biotilada proveniente de ratos ($0,70 \text{ mg mL}^{-1}$) foi adquirido da Hytest, Turku, Finlândia. Antiprolactina humana monoclonal marcada com fosfatase alcalina (diluição 1:10) e recombinantes purificadas de prolactina humana (0,1 mg) foram adquiridos da Immunometrics, Londres, Reino Unido. O sal monossódico de 1-naftil fosfato foi obtido da Sigma.

Soluções diluídas de antiprolactina biotilada foram preparadas em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e Tween 20 0,01% (Aldrich). Uma solução tampão de pH 7,2 foi preparada utilizando tris-HCl (Scharlau, 99%) 50 mmol L^{-1} e NaCl (Scharlau, 99%) 20 mmol L^{-1} . Outra solução tampão de pH 9,0, foi preparada empregando base Trizma (Sigma, 99%) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e cloreto de magnésio (Panreac, 99%) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Soluções padrão de PRL na

concentração de 3000 ng mL⁻¹ foram preparadas em meio de solução tampão tris-HCl (pH 7,2).

Uma solução estoque de antiprolactina-AP (antiprolactina marcada com a enzima fosfatase alcalina) foi diluída na proporção 1:500, preparadas diariamente em tampão tris-HCl (Aldrich). Soluções diluídas de antiprolactina biotinizada e antiprolactina-AP foram preparadas diariamente com tampão Tris-HCl (pH 7,2). Soluções de 1-naftil fosfato 0,05 mol L⁻¹ foram preparadas diariamente em tampão Trizma (pH 9,0). Soluções estradiol, progesterona, estriol, hormônio do crescimento humano (hGH) e cortisol foram preparados em metanol para o estudo de interferentes e posteriormente preparadas em meio de solução tampão tris-HCl (pH 7,2).

5.2.2. Amostras

As amostras analisadas foram de soro liofilizado humano (Sigma) enriquecido com PRL. O soro sólido foi reconstituído em 1,0 mL de solução de tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,2). Em seguida, foi aliquoteado e congelado a -40 ° C até o uso. Dois diferentes níveis de concentração de PRL, 200 e 800 ng mL⁻¹, foram adicionados às amostras de soro e então analisadas com o imunossensor proposto.

5.2.3. Medidas eletroquímicas

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato μ -Autolab controlado pelo software GPES 4.9 (EcoChemie BV). Eletrodos de carbono impresso (4 mm de diâmetro) foram adquiridos da DropSens[®] (Oviedo, Espanha) e usados como eletrodos de trabalho, como apresentados na Figura 5.1. Estes eletrodos incluem um pseudo-eletrodo de referência de prata e um auxiliar de carbono. Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados à temperatura ambiente. Um banho de ultra-som P-Selecta, uma incubadora shaker (Comecta SA) e um

agitador magnético Agimatic, todos distribuídos pela Scharlab, Madrid, Espanha, também foram utilizados.

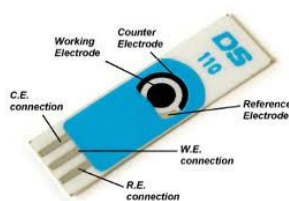


Figura 5. 1. Imagem do eletrodo de carbono impresso

5.2.4. Eletrodeposição das nanopartículas de ouro

As AuNPs foram eletrodepositadas na superfície do eletrodo de carbono impresso (SPCE) na presença de HAuCl_4 $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A eletrodeposição foi realizada através da aplicação de uma corrente constante de $-150 \mu\text{A}$ por 150 s utilizando o eletrodo SPCE.

5.2.5. Preparação do imunossensor

Um volume de $8 \mu\text{L}$ de uma solução de estreptavidina $0,70 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram gotejados com o auxílio de uma micropipeta sobre a superfície do eletrodo AuNPs/SPCE deixando-o repousar por 2h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Após lavagem com solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, adicionou-se $8 \mu\text{L}$ de uma solução de antiprolactina biotilada na concentração de $17,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em meio de solução tampão Tris-HCl (pH 7,2) sobre o eletrodo estreptavidina-AuNPs/SPCE. A incubação foi realizada por 90 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e o imunossensor resultante foi lavado com tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Então, o volume apropriado de uma solução estoque PRL também foi adicionado sobre o eletrodo antiprolactina biotilada-estreptavidina-AuNPs/SPCE, e então incubadas por 60 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, e em seguida o conjugado foi lavado com solução tampão Tris-HCl. Finalmente, $8 \mu\text{L}$ de uma diluição de 1:200 solução antiprolactina-AP foram depositadas e incubadas por 30 min também a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Após lavagem com

tampão Trizma, 50 μL de uma solução de 1-naftil fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ foram gotejados na superfície do imunossensor e aguardou-se o repouso de 30 s para posterior medida eletroquímica.

A voltametria de pulso diferencial foi usada como técnica de transdução eletroquímica na faixa de varredura de potencial de $-0,30$ a $0,50 \text{ V}$. A Figura 5.2 mostra esquematicamente o desenho do imunossensor e as reações bioquímicas e eletroquímica envolvidas no seu funcionamento. A reação 6 apresenta a reação enzimática envolvendo 1-naftil fosfato para formar 1-naftol (hidrólise do 1-naftil fosfato levando a formação de 1-naftol na presença da enzima fosfatase alcalina) foi realizada em pH 9,0, o que correspondeu à atividade de fosfatase alcalina ideal¹⁷¹.

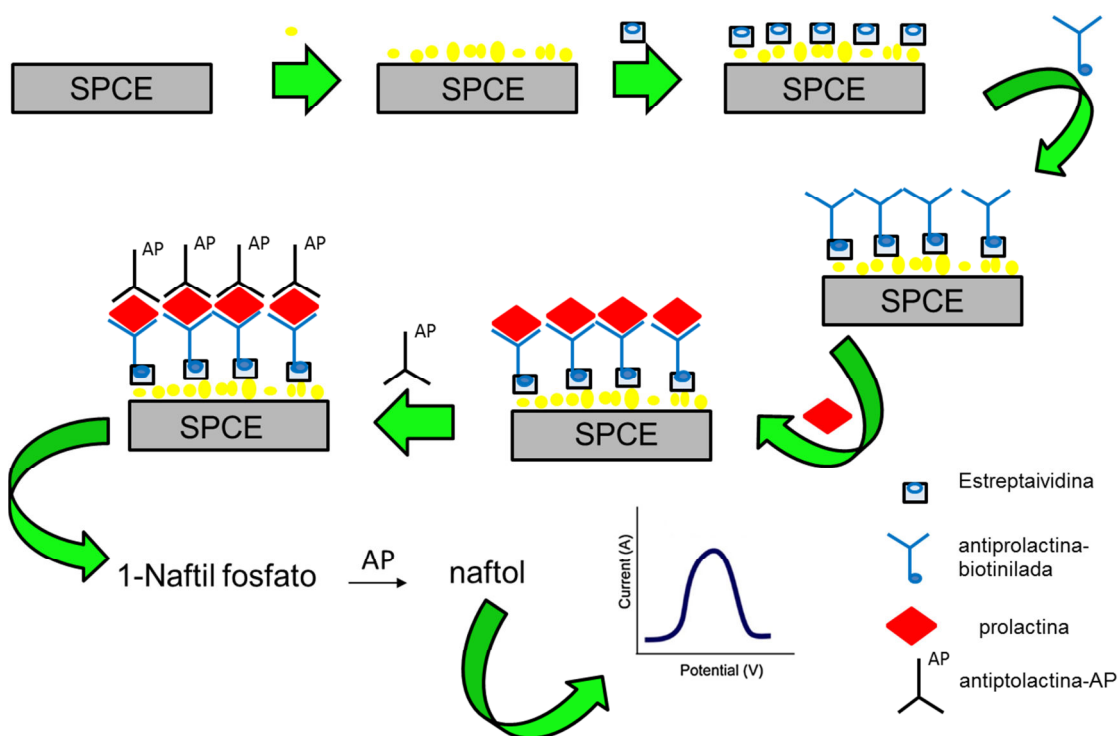
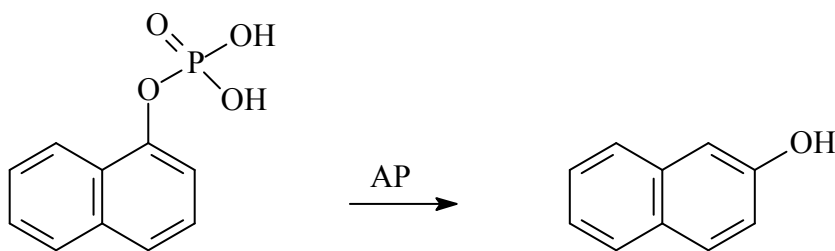


Figura 5. 2. Desenho esquemático do imunossensor com as etapas e as reações bioquímicas e eletroquímica envolvidas em seu funcionamento.



Reação 6

5.2.6. Determinação de prolactina em amostras de soro

Amostras de soro liofilizadas foram armazenadas a 8 ° C até o uso. Em seguida, 1,0 mL da solução estoque de PRL foi adicionado ao sólido contido na ampola para reconstituir o soro e misturar por agitação suave. Uma vez totalmente dissolvido, o imunensaio foi realizado por meio do procedimento descrito acima. E então os valores de corrente de pico obtidos a partir da voltametria de pulso diferencial (DPV) foram interpolados na curva de calibração construída com padrões de PRL (foram preparados diferentes imunossensores, cada contendo uma determinada concentração de prolactina).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Preparação do eletrodo AuNPs/SPCE

Primeiramente as AuNPs foram eletrodepositadas sobre o eletrodo SPCE através da aplicação de uma corrente constante, sendo que a otimização desse processo envolveu o estudo de algumas variáveis experimentais.

Em primeiro lugar, o efeito da concentração de ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) na deposição de AuNPs foi avaliado através do comportamento eletroquímico do eletrodo AuNPs/SPCEs. As concentrações de HAuCl₄ testadas foram: 0,1; 5,0 e 10 mmol L⁻¹. A Figura 5.4 apresenta os ciclovoltagemogramas realizados em tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ aplicando uma

corrente de deposição de $-150 \mu\text{A}$ durante 150 s. Como pode ser observado, os voltamogramas apresentam a forma típica de ouro para eletrodos modificados, com picos bem definidos anódicos e catódicos correspondente à oxidação e redução Au^0 e os óxidos de ouro, respectivamente. Nenhum aumento significativo nas correntes de pico anódica e catódica foram observadas para concentrações de HAuCl_4 superiores a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, indicando uma deposição de ouro quase constante a partir desse valor de concentração. Assim, a concentração de HAuCl_4 $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ escolhida para realizar o processo de eletrodeposição sobre a superfície de SPCE foi de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

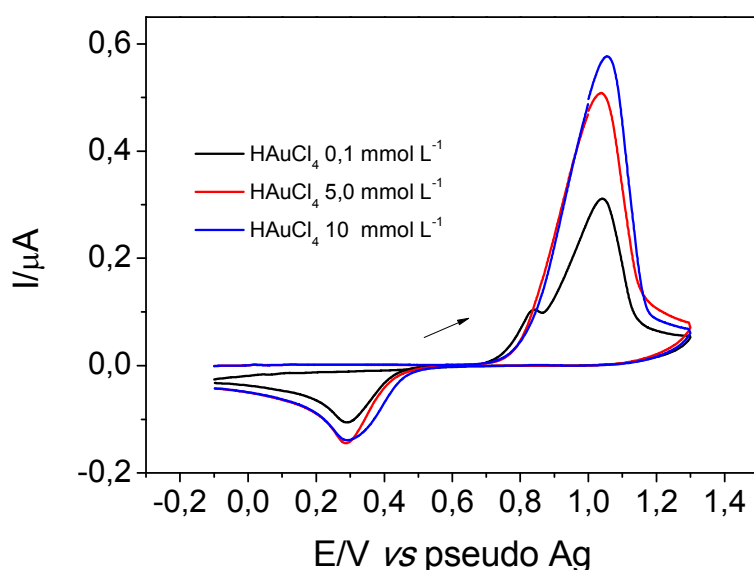


Figura 5. 3. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos AuNPs/SPCEs preparados pela eletrodeposição de AuNPs a partir de soluções de HAuCl_4 $0,1$ (-); $5,0$ (-) e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (-); em meio de tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0); $i_{\text{dep}} = -150 \mu\text{A}$ e $t_{\text{dep}}=150 \text{ s}$.

O tempo de eletrodeposição de ouro (0 a 300 s) e as corrente de redução aplicadas (-50 a $-250 \mu\text{A}$) foram otimizados em seguida. Para isto, utilizou-se a voltametria cíclica na presença de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em eletrólito suporte KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando diferentes eletrodos AuNPs/SPCEs. Os resultados obtidos revelaram que maiores correntes de pico foram obtidas para as correntes aplicadas maiores que $-50 \mu\text{A}$ e um tempo eletrodeposição

maior que 100 s. Portanto, -150 e 150 μA s foram as variáveis selecionadas para a construção dos eletrodos AuNPs/SPCE.

A morfologia da superfície dos eletrodos preparados foi caracterizada por MEV, a qual é apresentada na Figura 5.5. Pode ser observado que as AuNPs estão distribuídas de forma homogênea em toda superfície do eletrodo. O diâmetro médio das nanopartículas foi 64 ± 5 nm. Estes resultados são concordantes com os obtidos anteriormente por Martinez-Paredes e colaboradores¹⁷².

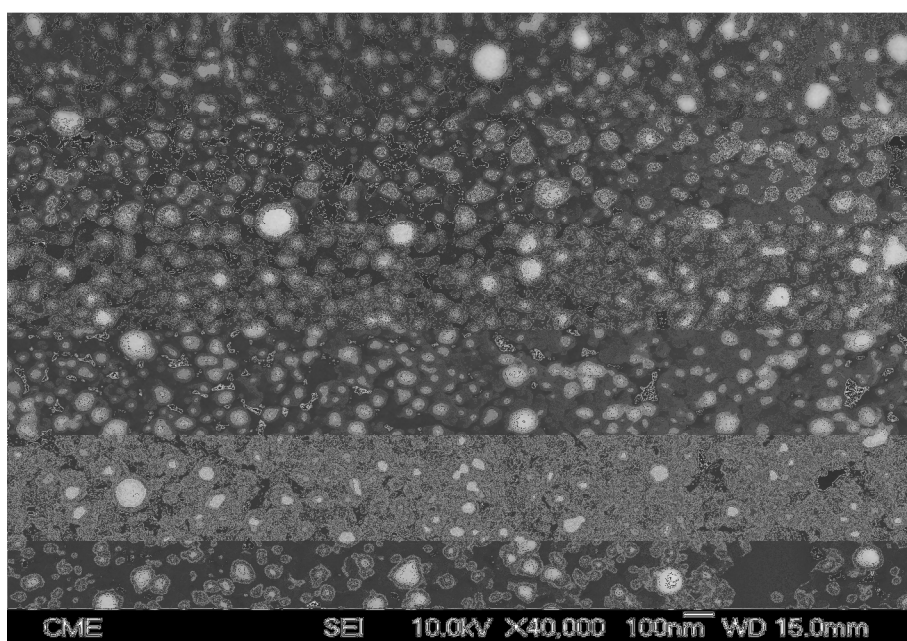


Figura 5. 4. Imagens de MEV do eletrodo AuNPs/SPCE.

Como mencionado anteriormente, a etapa de detecção eletroquímica de PRL envolveu a medição do sinal de oxidação eletroquímica do 1-naftol no eletrodo. Este composto é formado como o produto da reação enzimática AP usando 1-naftilfosfato como substrato, o qual foi selecionado devido ao comportamento eletroquímico relatado para eletrodos SPCE¹⁷².

O eletrodo AuNPs/SPCE foi comparado a eletrodos descartáveis à base de outros materiais. A Figura 5.6 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial na presença de 1-naftol $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) para os eletrodos SPCE, eletrodo de ouro impresso (SPAuE) e AuNPs/SPCE. Como pode ser observado, o eletrodo AuNPs/SPCE

apresentou maior intensidade de corrente de pico em um potencial muito menor. Estes resultados sugerem um efeito electrocatalítico causado pelas AuNPs eletrodepositadas na superfície do eletrodo SPCE.

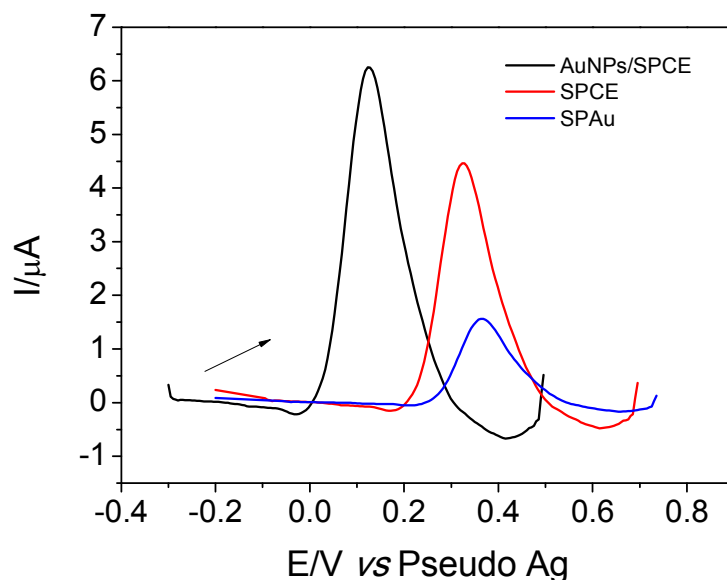


Figura 5. 5. Voltamogramas de pulso diferencial para os eletrodos AuNPs/SPCE, SPCE e SPAu na presença de naftol $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Velocidade de varredura 10 mV s^{-1} , amplitude de pulso 50 mV .

5.3.2. *Imunossensor antiprolactina-AP – prolactina – antiprolactina-biotinilada – estreptavidina – AuNPs/SPCE*

Realizaram-se então os testes com o imunossensor na presença e ausência de prolactina, preparando-se os mesmos como descrito no procedimento experimental (na ausência de prolactina omitiu-se a etapa de adição do antígeno). A Figura 5.7 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o imunossensor antiprolactina-AP-prolactina-antiprolactina biotinilada-estreptavidina/AuNPs/SPCE. Já na ausência da PRL, nenhum sinal voltamétrico foi observado que sugere que não houve adsorção não-específica na superfície do eletrodo.

Observou-se então, que para o imunossensor completo houve a oxidação electroquímica do 1-naftol formado pela fosfatase alcalina presente no

anticorpo antiprolactina-AP na presença de 1-naftil fosfato, comprovando a eficácia da arquitetura proposta no desenvolvimento do mesmo.

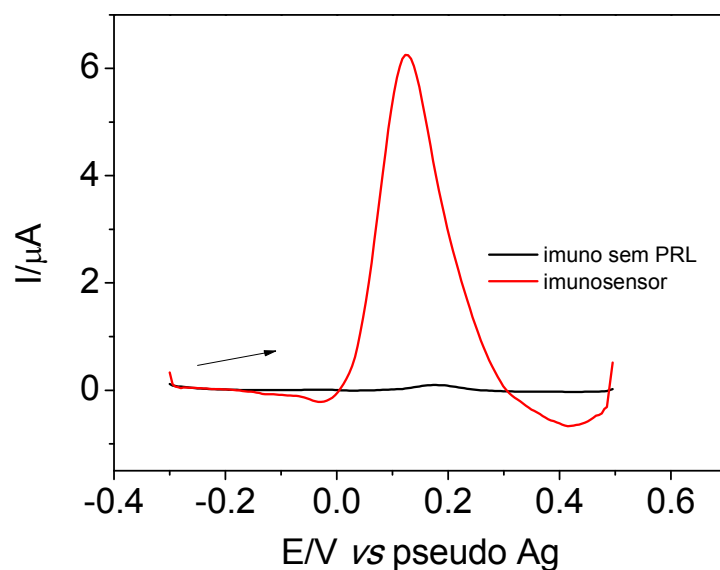


Figura 5. 6. Voltamogramas de pulso diferencial do imunossensor completo e imunossensor na presença e ausência de prolactina em meio de 1-naftil-fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

A espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada para monitorar a modificação do eletrodo com estreptavidina e AuNPs. A Figura 5.8 apresenta os diagramas de Nyquist registrados para os eletrodos SPCE, AuNPs/SPCE e estreptavidina/AuNPs/ SPCE em uma solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe (CN)}_6^{3-/4-}$ como par redox. Como esperado, a resistência de transferência de elétrons diminuiu drasticamente em caso de modificação da SPCE com nanopartículas de ouro. Além disso, a atração eletrostática entre a estreptavidina e as AuNPs deu origem a um forte aumento na resistência de transferência de elétrons em relação ao de AuNPs/SPCE, confirmando assim a adsorção da proteína na superfície do eletrodo.

A imobilização dos anticorpos no AuNPs/SPCEs foi realizada por meio da interação de afinidade entre a estreptavidina e a antiprolactina biotinizada. Portanto, em primeiro lugar, as variáveis envolvidas e a adsorção de estreptavidina sobre a superfície do eletrodo foram então otimizadas. As variáveis estudadas foram concentração, tempo de adsorção e temperatura de

incubação. Os melhores resultados que garantiram a saturação da superfície foram 8 μL de solução de estreptavidina em uma concentração de 0,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com um tempo de incubação de 2 h a 37 $^{\circ}\text{C}$.

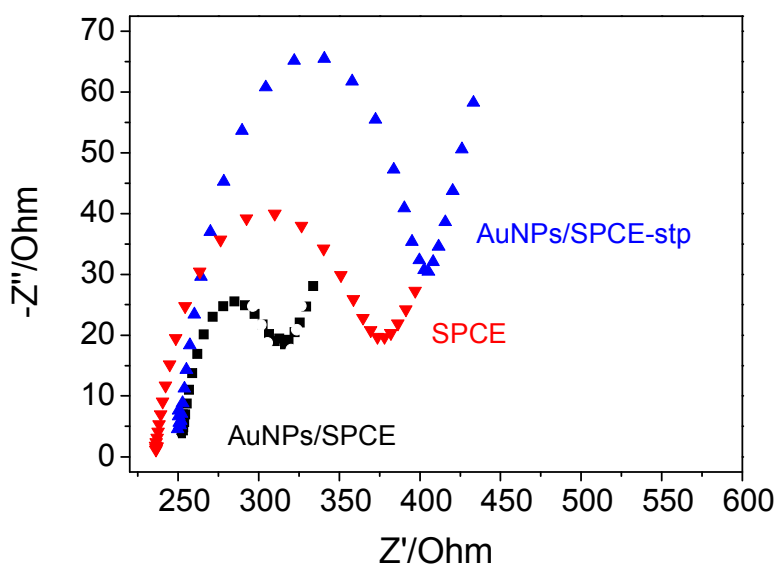


Figura 5. 7. Diagramas de Nyquist para espectroscopias de impedância na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5 mmol L^{-1} em meio de KCl 0,1 mol L^{-1} para SPCE (\blacktriangledown); AuNPs/SPCE (\blacksquare) e estreptavidina/AuNPs/SPCE (\blacktriangle).

O efeito da concentração antiprolactina biotinizada na resposta imunossensor foi avaliada preparando vários imunossensores, em cada caso, adicionando 8 μL de diferentes soluções antiprolactina biotinizada na faixa de concentração entre 0 e 140 mg mL^{-1} . Os imunossaios foram realizados conforme descrito na seção 2.5, utilizando 8 μL PRL na concentração de 1,0 mg mL^{-1} e uma diluição de 1:200 de solução antiprolactina-AP.

Como pode ser observado na Figura 5.9, houve um aumento acentuado na corrente de pico com o aumento da concentração do anticorpo até um valor de 17,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e para concentrações superiores, a corrente de pico se manteve praticamente constante. A resposta constante da corrente de pico se deve a saturação dos sítios de ligação na superfície do eletrodo modificado. Portanto, a concentração acima mencionada de antiprolactina biotinizada foi selecionada para os trabalhos posteriores.

O tempo de incubação da antiprolactina biotinilada para o eletrodo AuNPs/SPCE modificado com estreptavidina também foi otimizado. A corrente de pico aumentou continuamente de 45 min até 90 min, o maior tempo testado. Portanto, a fim de obter a melhor sensibilidade e um tempo de preparo não tão longo, o tempo de incubação a ser utilizado foi de 90 min.

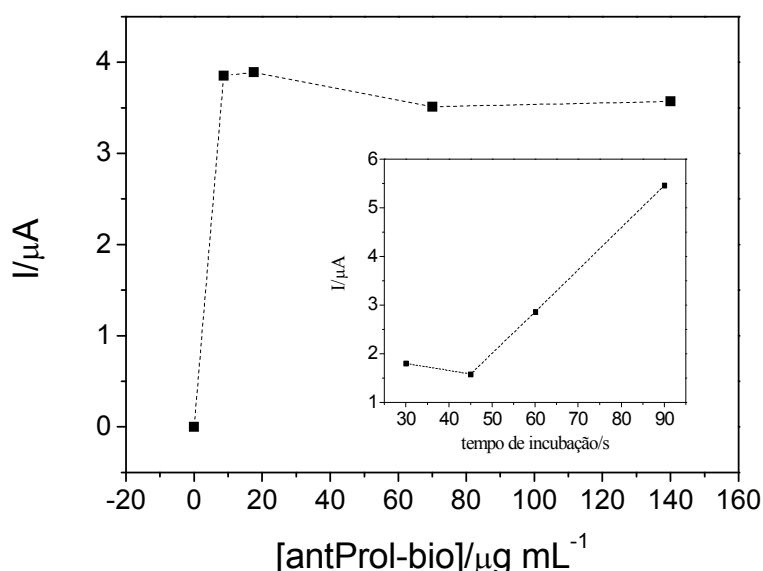


Figura 5. 8. Estudos de concentração e tempo de incubação para o anticorpo antiprolactina biotinilada, usando 8 μL PRL na concentração de 1,0 mg mL^{-1} e uma diluição de 1:200 de solução antiprolactina-AP.

O último passo na construção do imunossensor envolveu a ligação da PRL e o anticorpo secundário marcado antiprolactina marcado com a enzima AP. A fim de otimizar o ensaio, as respostas obtidas com DPV diferencial para os imunossensores preparados com diferentes diluições de antiprolactina-AP na faixa de 0 a 1/1000 foram medidos. A corrente de pico aumentou até uma diluição de 1/200 com uma ligeira diminuição para diluições maiores, valor que provavelmente corresponde à saturação da PRL imobilizada e antiprolactina-AP. Portanto, a fim de se obter a melhor sensibilidade, o valor de diluição de 1/200 foi selecionado. O tempo de incubação para o imunoenensaio também foi estudado na faixa de 0 a 110 min, sendo que após 30 min de incubação a resposta manteve-se constante, sendo este selecionado para estudos

posteriores. A Figura 5.10 apresenta estudos de concentração e tempo para antiprolactina-AP.

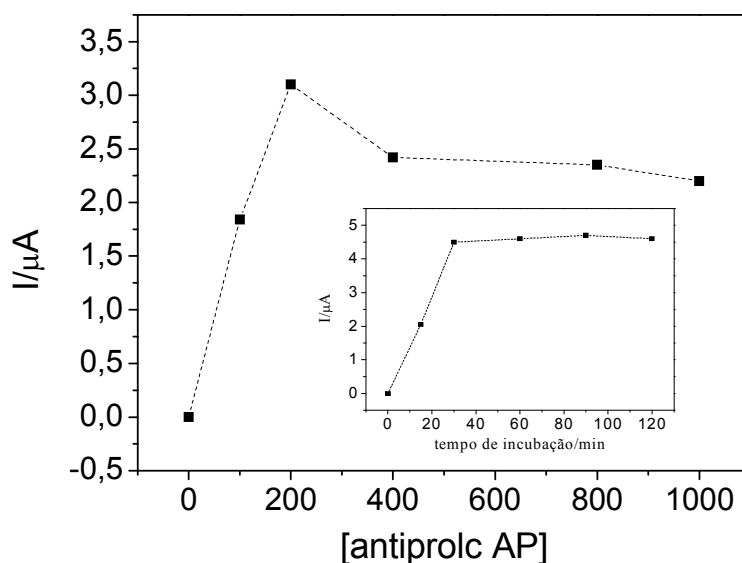


Figura 5. 9. Influencia de concentrações e tempo de incubação da antiprolactina-AP no desenvolvimento do imunossensor proposto.

A influência da concentração de fosfato 1-naftil nas respostas voltamétricas de pulso diferencial foi estudada no intervalo de potencial de -0,30 a 0,50 V utilizando o imunossensor proposto no intervalo de concentração do substrato de 1,0 a 50 mmol L⁻¹. Resultados obtidos (não apresentados) mostraram um aumento da corrente de pico com a concentração do substrato da enzima até 20 mmol L⁻¹, e, para concentrações maiores os valores de corrente de pico foram constantes. Assim, a concentração de 1-naftil fosfato selecionada foi de 50 mmol L⁻¹, para garantir que a taxa de reação enzimática dependa apenas da concentração da enzima. O tempo da reação de hidrólise (formação de 1-naftil fosfato a naftol na presença da enzima AP) a também foi otimizado de 30 a 360 s. Um valor praticamente constante de corrente de pico foi obtido para tempos de reação acima de 30 s, sendo este tempo de hidrólise selecionado para os trabalhos futuros.

Os parâmetros de DPV foram investigados após otimização do imunossensor. A velocidade de varredura e amplitude de pulso foram estudadas nas faixas de 10 a 60 mV s⁻¹ e 10 a 80 mV, respectivamente. Os

valores selecionados para estudos posteriores foram velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} e amplitude de pulso de 70 mV por apresentarem melhor perfil voltamétrico.

5.3.3. Determinação de prolactina por voltametria de pulso diferencial

A curva analítica foi construída para diferentes concentrações de PRL nas condições experimentais selecionados anteriormente. A corrente de pico aumentou proporcionalmente com o aumento das concentrações de PRL, como observado na Figura 5.11, exibindo uma faixa linear de 15 a 1000 ng mL^{-1} e um coeficiente de correlação linear de $0,995$ (Figura 5.12). Esta faixa linear, abrangendo duas ordens de magnitude, é mais ampla do que a relatada na literatura usando a detecção fluorimétrica ($10\text{-}100 \text{ ng mL}^{-1}$)²⁴. O valor da inclinação da curva analítica foi de $3,65 \pm 0,09 \text{ nA ng mL}^{-1}$. Um limite de detecção de 10 ng mL^{-1} de PRL foi calculado de acordo com o critério $3\text{SD}/m$, onde SD foi estimado através do desvio padrão da corrente medida para o ponto correspondente à menor concentração medida da curva analítica (15 ng mL^{-1}), $\text{RSD} = \pm 0,0103 \text{ } \mu\text{A}$ ($n = 10$).

Quando estas características analíticas são comparadas com os obtidos com o magnetoimunossensor relatado anteriormente¹²⁴, pode-se deduzir que tanto a faixa linear e a sensibilidade foram bastante semelhantes (1 a 2000 ng mL^{-1} e 7 mL nA ng^{-1} , respectivamente). Curiosamente, esse bom desempenho analítico é conseguido com um eletrodo que apresenta uma simples forma de preparo. Isso é mais provável devido aos eletrodos modificados com AuNPs e estreptavidina permitirem a imobilização de uma grande quantidade de anticorpo biotilado e também pela capacidade demonstrada dos eletrodos nanoestruturados para a transdução eficiente da oxidação eletroquímica do 1-naftol.

A reprodutibilidade das medições realizadas com diferentes imunossensores foi verificada na presença de uma concentração 600 ng mL^{-1} de PRL. O valor do desvio padrão relativo obtido foi de $5,0\%$ ($n = 5$), que

demonstrou a boa reprodutibilidade alcançada apesar da natureza descartável dos transdutores eletroquímicos empregados.

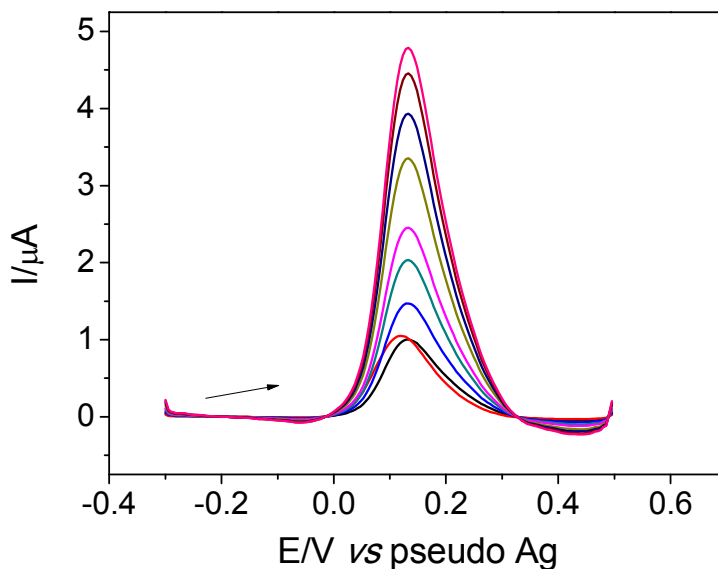


Figura 5. 10. Voltamogramas de pulso diferencial para os imunossensores na presença de 1-naftil fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão Trizma (pH 9,0) com diferentes concentrações de 15; 25; 200; 300; 400; 600; 750; 900 e 1000 ng mL^{-1} de PRL.

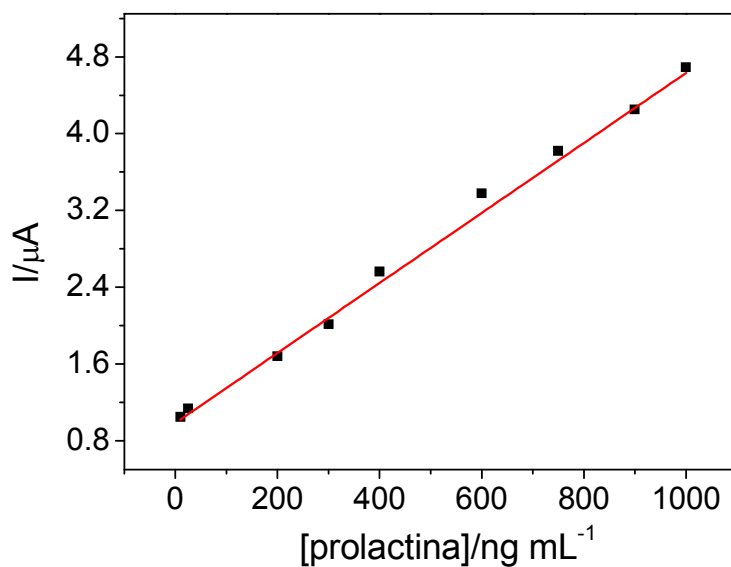


Figura 5. 11. Curva analítica para os imunossensores em diferentes concentrações de PRL na presença de 1-naftil fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de

tampão Trizma (pH 9,0). A equação da reta foi de $I_p (\mu\text{A}) = 0,98 + 0,00367 C$ (ng mL^{-1}); um coeficiente de correlação de 0,995 e o limite de detecção foi de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ para PRL.

5.3.4. Estudo de interferentes

Vários compostos que podem ser também encontrados juntamente com PRL em amostras biológicas foram testadas com substâncias potencialmente interferentes sobre a resposta analítica obtida com o imunossensor desenvolvido. Estradiol, progesterona, estriol, hormônio do crescimento humano (hGH) e cortisol foram as substâncias verificadas presentes numa concentração de 1000 ng mL^{-1} de cada composto.

A Figura 5.13 mostra os voltamogramas registrados do imunossensor para soluções que contenham estes possíveis interferentes, bem como o voltamograma correspondente a PRL. Observou-se claramente que nenhum dos compostos interferiu na zona onde o potencial de pico para PRL surge, demonstrando assim a excelente seletividade do imunossensor para o analito de interesse.

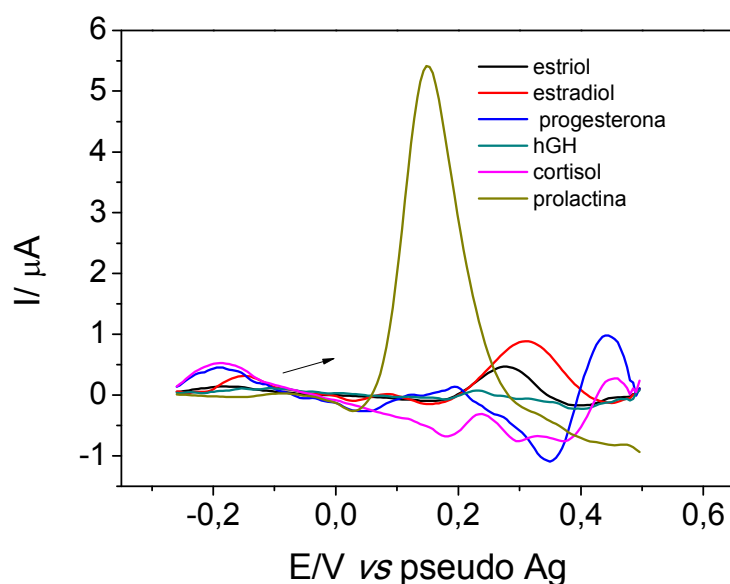


Figura 5. 12. Voltamogramas de pulso diferencial para prolactina estradiol, progesterona, estriol, hormônio do crescimento humano (hGH) e cortisol.

5.3.5. Determinação de prolactina em amostras de soro

A aplicação do imunossensor para a análise de amostras reais foi realizado através da análise de soro humano enriquecido com PRL em dois níveis diferentes concentrações, 200 e 800 ng mL⁻¹ como apresentados na Tabela 5.1. Os resultados obtidos apresentaram um erro relativo de 4% e 0 com desvios padrões relativos entre as medidas de 0,18 e 0,07 % para as amostras de 800 e 200 ng mL⁻¹, respectivamente. A fim de verificar a existência de um efeito de matriz, foram construídas curvas analíticas a partir de amostras de soro através da aplicação do procedimento descrito na seção Experimental. A inclinação média dos gráficos de calibração linear (n = 3) foi de 3,75 ± 0,05 nA / ng mL⁻¹, que é muito semelhante ao obtido com a inclinação para soluções padrão de PRL.

Tabela 5. 1. Determinação de prolactina em soro humano

Amostra	Adicionado (ng mL ⁻¹)	Imunossensor (ng mL ⁻¹)	Erro relativo (%)	RSD
200	200	200	0	±0,07
800	800	824	4,0	±0,18

Conseqüentemente, um efeito significativo da matriz poderia ser descartado e a determinação de PRL em amostras de soro foi realizada por interpolação dos valores de corrente de pico da corrente medida para o intervalo de concentração obtido com a curva analítica. A análise em triplicata para soro em dois níveis de concentração rendeu os valores médios de 200 ± 7 e 824 ± 18 ng mL⁻¹ de PRL, respectivamente. Estes resultados demonstram a adequação do imunossensores descartáveis desenvolvidos para a análise da PRL em soro humano em concentrações fisiológicas relevantes com praticamente nenhum tratamento de amostra.

5.4. CONCLUSÕES

Um novo imunossensor eletroquímico descartável para a determinação do hormônio prolactina foi desenvolvido a partir de nanopartículas de ouro eletrodepositadas em eletrodo de carbono impresso. A imobilização dos anticorpos se deu por meio da afinidade dos anticorpos antiprolactina-biotinilada e a superfície do eletrodo estreptavidina-AuNPs/SPCE, juntamente com um imunoenensaio do tipo sanduíche usando um anticorpo antiprolactina marcado com fosfatase alcalina. A quantificação por DPV de 1-naftol formado como o produto da reação enzimática da enzima fosfatase alcalina e 1-naftil

fosfato permitiu excelentes características analíticas em termos de sensibilidade, ampla faixa linear, reprodutibilidade e seletividade. Este desempenho satisfatório transforma o imunossensor em uma interessante ferramenta analítica para a análise de PRL em amostras clínicas em concentrações relevantes com praticamente nenhum tratamento de amostra.

DETERMINAÇÃO EM FLUXO DE DIURON EMPREGANDO UM BIOSSENSOR
DESCARTÁVEL CONTENDO ACETILCOLINESTERASE E
NANOPARTÍCULAS DE OURO EM UM FILME DE HIDROCLORETO DE
POLI(ALILAMINA)

CAPÍTULO 6

6. Determinação em fluxo de Diuron empregando um biossensor descartável contendo acetilcolinesterase e nanopartículas de ouro em um filme de hidrocloreto de poli(alilamina)

6.1. Objetivos específicos

Determinar o pesticida Diuron (organoclorado) empregando um sistema de análise por injeção em fluxo portátil microcontrolado e um biossensor com a enzima acetilcolinesterase imobilizada em nanopartículas de ouro em um filme de PAH sobre a superfície do eletrodo de carbono impresso descartável.

6.2. EXPERIMENTAL

6.2.1. Reagentes

Iodeto de acetiltiocolina, acetilcolinesterase ≥ 1.000 unidades/mg (extraída de enguia), HAuCl_4 , glutaraldeído 25% v/v (GA), cistamina (CIS) e Diuron foram adquiridos da Aldrich. Hidrocloreto de polialilamina foi adquirido da Sigma. Diuron foi obtido da Fluka. Soluções estoque $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas pela dissolução de uma massa apropriada do pesticida em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 7,0). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura Milli-Q (resistividade $> 18 \text{ M } \Omega\text{cm}$). Todos os outros produtos químicos foram de grau analítico. As soluções de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) utilizadas como eletrólito suporte foram preparadas a partir de Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 . O tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) foi sempre utilizado como eletrólito.

6.2.2. Sistema em fluxo com bombeamento microcontrolado

O microcontrolador programável utilizado foi PIC18F4550 da Microchip Technology® com as seguintes características: 2048 bytes de memória RAM, 32000 bytes de memória flash, 256 bytes de memória EEPROM, 35 portas tipo in/out, interface USB 2.0 com uma velocidade de 12 Mb/s e 16384 instruções possível e um conversor A/D com resolução de 10 bits. O microcontrolador foi usado como unidade de controle e processamento no sistema em fluxo com bombeamento microcontrolado (do inglês, *microcontrolled pumping flow system* – μ C-PFS), conforme mostrado no diagrama de bloco da Figura 6.1.

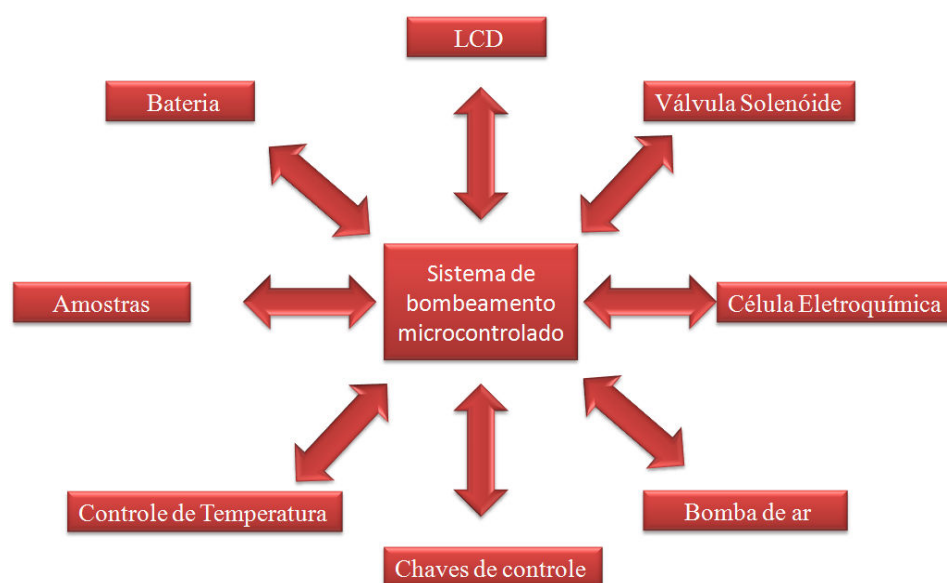


Figura 6.1. O diagrama funcional do sistema microcontrolado de bombeamento (μ C- sistema de fluxo microcontrolado) é composto pelas seguintes unidades principais: Tela de LCD (*do inglês, Liquid Cristal Display*), válvulas solenoides de 3 vias, célula eletroquímica, bomba de ar, chaves de controle, controle de temperatura (sensor de temperatura e cooler), compartimento de amostragem. Todas as unidades são controladas por um microcontrolador como unidade de controle central.

Todas as unidades mostradas no diagrama da Figura 6.1 são controladas pelo microcontrolador utilizado como unidade de controle central, exceto a célula eletroquímica que é controlada por um potenciostato portátil DropSens. Esta foi inserida no diagrama, pois no equipamento desenvolvido

(μ C-PFS) a célula funciona com o compartimento onde as soluções são inseridas, fazendo parte do sistema desenvolvido.

A configuração do sistema em fluxo baseado em multicomutação com detecção eletroquímica utilizando bomba de aquário é apresentado na Figura 6.2.

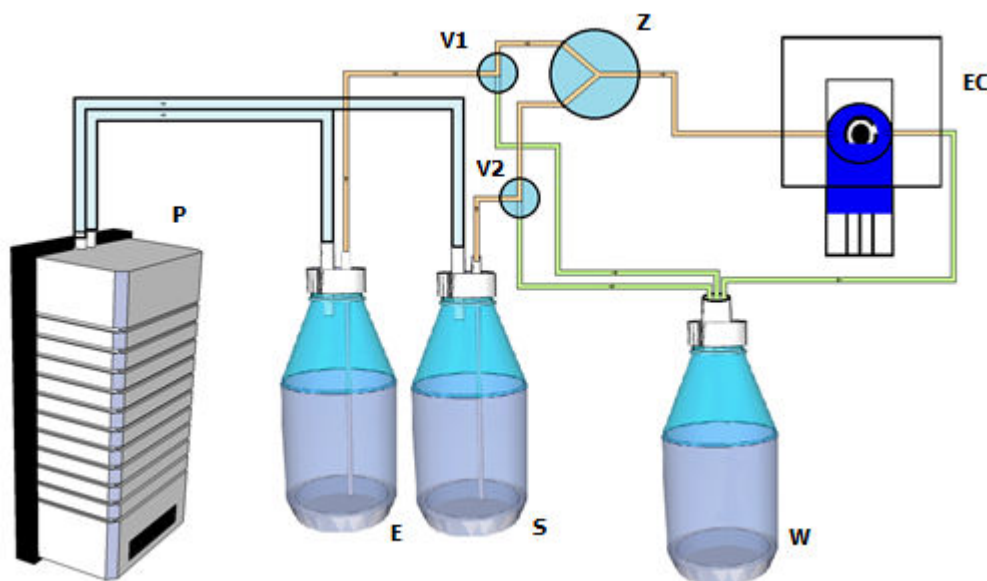


Figura 6. 2. Esquema do sistema de multicomutação em fluxo utilizando bomba de aquário (P), 2 válvulas solenoides (V1 e V2), conector para confluência (z), compartimentos para amostras (E e S), compartimento para resíduos (W) e célula eletroquímica com eletrodo descartável acoplado (EC).

6.2.3. Medidas eletroanalíticas

As medidas eletroanalíticas foram executadas em um potenciostato DropSens gerenciado pelo programa computacional DropView 1.3. A determinação dos valores de pH das soluções foram feitas com um pHmetro digital ORION, modelo EA 940. As medidas de voltametria cíclica e de amperometria foram realizadas em uma célula eletroquímica com configuração em fluxo (Figura 6.3) desenvolvida para este fim, com volume de célula de 50 μ L. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente.

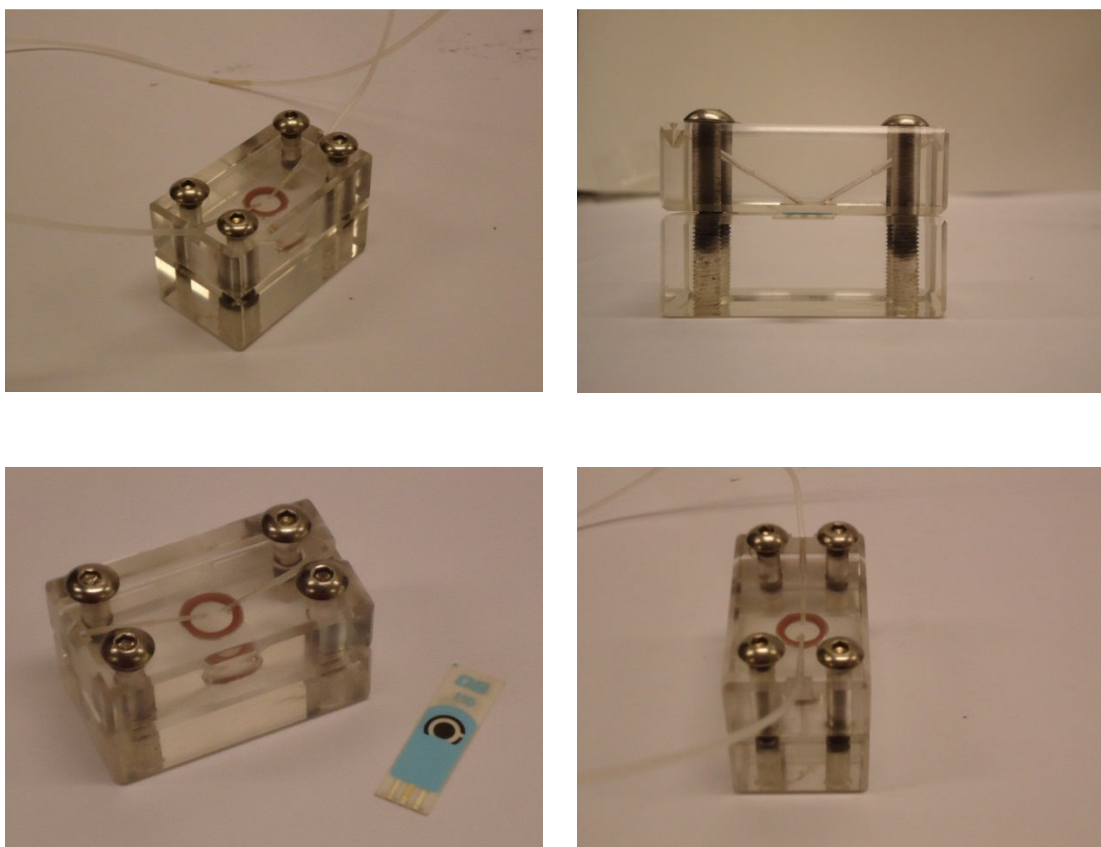


Figura 6. 3. Imagens da célula eletroquímica de fluxo desenvolvida utilizada no sistema de análise por injeção em fluxo.

6.2.4. Eletrodos

Utilizaram-se eletrodos de carbono impresso descartáveis (4 mm de diâmetro) adquiridos da DropSens (Oviedo, Espanha) como eletrodos de trabalho. Esses eletrodos incluem um pseudo eletrodo de referência de prata e um eletrodo auxiliar de carbono.

6.2.5. Síntese das nanopartículas de ouro

Em um balão reacional de 3 bocas contendo 150 mL de uma solução aquosa de HAuCl_4 5,0 mmol L^{-1} a 90 °C, foram adicionados 7,5 mL de uma

solução do agente redutor citrato de sódio $0,3 \text{ mol L}^{-1}$. Essa mistura foi mantida em agitação a $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até o aparecimento de uma cor vermelha. Em seguida, o meio reacional foi rapidamente resfriado até a temperatura ambiente com auxílio de gelo. O esquema do método de preparação das AuNPs pode ser observado na Figura 6.4.

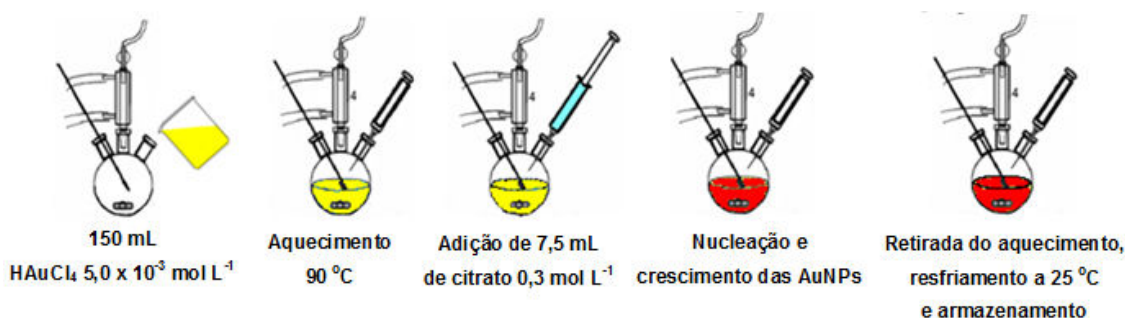


Figura 6. 4. Preparação das AuNPs em meio de citrato de sódio. Em um balão reacional contendo 150 mL de uma solução aquosa de HAuCl_4 $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ a $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$, foram adicionados 7,5 mL de uma solução de citrato de sódio $0,3 \text{ mol L}^{-1}$. Essa mistura foi mantida em agitação a $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até o aparecimento de uma cor vermelha. Em seguida, o meio reacional foi rapidamente resfriado até a temperatura ambiente com auxílio de gelo picado em banho externo ao frasco reacional.

A Figura 6.5 mostra uma fotografia de um frasco contendo as nanopartículas de ouro formadas após a reação de HAuCl_4 com citrato de sódio e, posterior resfriamento.



Figura 6. 5. Imagem da suspensão das nanopartículas de ouro.

6.2.6. Preparação do filme de AuNPs-PAH/SPCE

O filme de AuNPs foi preparado pela dispersão de 1,0 mg de PAH em 1,0 mL de suspensão de AuNPs. A dispersão foi submetida a um banho de ultrassom por 30 minutos. Para efeito de comparação, um filme de PAH sem AuNPs foi preparado pela dispersão de 1,0 mg de PAH em 1,0 mL de água. A dispersão também foi submetida ao banho de ultrassom por 30 minutos.

6.2.7. Preparação do biossensor AChE-AuNPs-PAH/SPCE

Preparou-se o AChE-AuNPs-PAH/SPCE gotejando-se 8 μL de solução de cistamina 10 mmol L^{-1} sobre a superfície do AuNPs-PAH/SPCE, aguardou-se a evaporação do solvente (água) à temperatura ambiente por 1 h. O eletrodo foi lavado com solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0), por 5 min. Então, 8 μL GA 2,5% foram gotejados na superfície do AuNPs-PAH/SPCE e após evaporação do solvente à temperatura ambiente por 1 h, o mesmo foi lavado novamente com solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0), por 5 min. Finalmente, 8 μL de uma solução contendo 4 mL de solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) contendo 1.000 unidades da enzima acetilcolinesterase foram gotejados sobre a superfície do AuNPs-PAH/SPCE e

o após a evaporação do solvente à temperatura ambiente por 2 h, o eletrodo foi cuidadosamente lavado com solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0). Quando não utilizado, o biossensor foi armazenado a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ em um refrigerador. O esquema de fabricação do biossensor AChE-AuNPs-PAH/SPCE é apresentado na Figura 6.6. Os parâmetros eletroquímicos e do sistema de análise por injeção em fluxo foram otimizados visando a maior resposta analítica do biossensor. A concentração de acetilticolina utilizada foi fixada em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

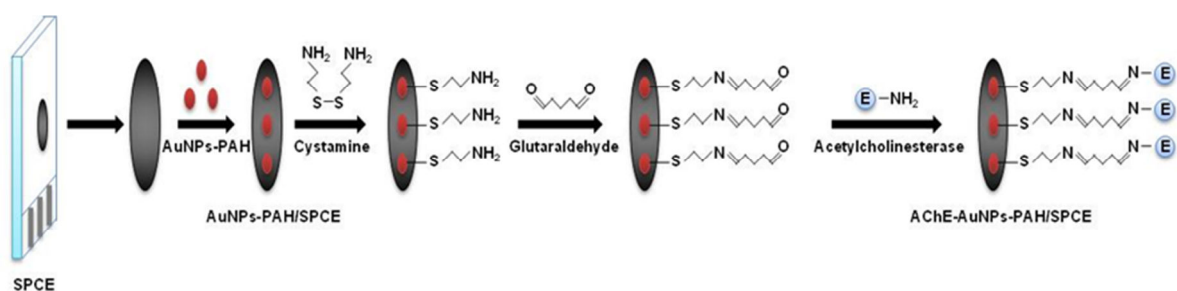


Figura 6. 6. Fabricação do biossensor AChE-AuNPs-PAH/SPCE

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Desenvolvimento da bomba microcontrolada ($\mu\text{C-PFS}$)

6.3.1.1. Projeto da Bomba microcontrolada

O microcontrolador programado em linguagem C, controla a temperatura interna do instrumento (sensor de temperatura e acionamento do cooler), as válvulas solenoides, a bomba de ar, teclas de controle, registro de dados experimentais, e apresenta o tempo de acionamento das válvulas e temperatura em tempo real na tela LCD. Um cristal oscilador (clock) de 8 MHz é o dispositivo responsável por sincronizar as funções do PIC em um tempo pré-determinado via programação. Devido ao baixo consumo de energia, uma bateria de 12 V recarregável capaz de gerar $7,0 \text{ A h}^{-1}$ para o dispositivo foi

acoplada a esse. Esta bateria foi adaptada ao circuito eletrônico, fornecendo uma autonomia elétrica por aproximadamente 15 horas, o que é extremamente útil para análise *in situ*.

No entanto, o uso da rede elétrica convencional (110 ou 220 V) também pode ser utilizada. Um circuito integrado (ULN2008) foi utilizado para acionar as válvulas solenoides. O acionamento de cada válvula solenoide é controlado a partir de um sinal digital enviado pelo microcontrolador através das portas AD (analog/digital) configurado como porta de saída digital. Bits são disponibilizados no circuito integrado, o qual gera um sinal elétrico de 10,0 V e uma corrente elétrica de 90 mA para cada válvula solenoide.

Como a bomba de ar funciona em corrente alternada (110 V, 60 Hz), necessitou-se converter a corrente elétrica contínua (DC, *Direct Current*) para corrente alternada (AC, *Alternating Current*). Para isso, quando o equipamento estiver em modo de bateria, um circuito de conversão DC-AC foi utilizado baseado no uso do circuito integrado 555 configurado no modo monoestável e um transformador, gerando um sinal alternado de 12 V, com frequência de 60 Hz, de modo semelhante ao fornecido pela rede elétrica convencional.

Um sensor de temperatura (LM35) foi utilizado para monitorar a temperatura. Quando a temperatura da célula eletroquímica (compartimento formado por eletrodo impresso, corpo de acrílico e entrada e saída de soluções) aumenta, este sensor gera um potencial proporcional à variação de temperatura e o disponibiliza na porta do microcontrolador configurada para entrada de sinal analógico. Quando o potencial medido corresponder a uma temperatura acima de 25 °C, o microcontrolador envia uma corrente de 25 mA com um potencial de 5 V ativando o transistor BC548, o qual fornece 200 mA de corrente para o refrigerador (*cooler*). Para que os valores de temperatura sejam monitorados na tela de LCD é necessário que a calibração prévia tenha sido realizada e que a curva de calibração esteja gravada na memória do EEPROM do PIC. O sensor utilizado para a leitura de temperatura foi um termopar foi utilizado. Uma fotografia do μ C-PFS desenvolvido é mostrada na Figura 6.7.

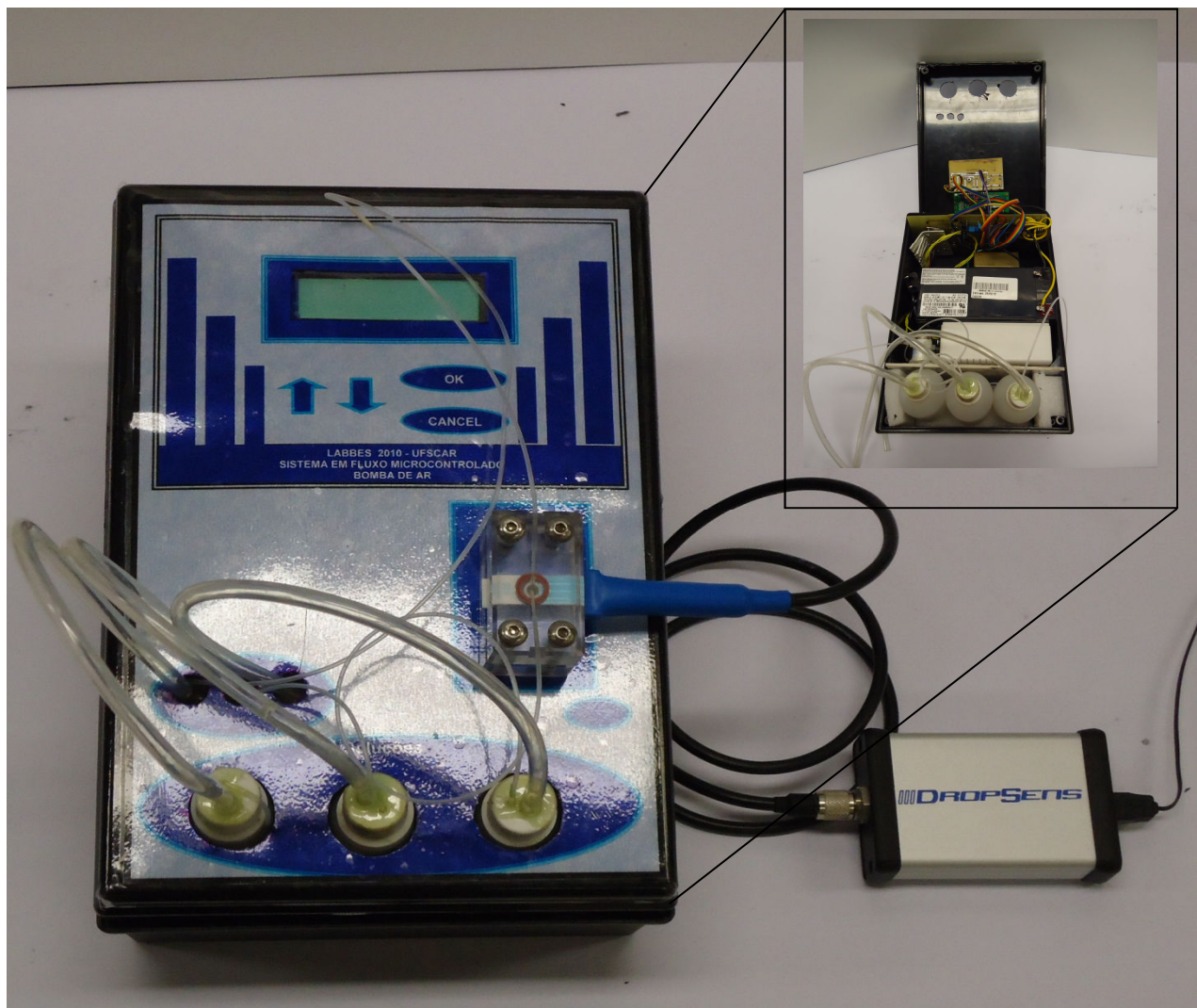


Figura 6. 7. Imagem do sistema μ C-PFS desenvolvido

Com pode ser observado na Figura 6.7, o microcontrolador desempenha todas as funções do sistema μ C-PFS, sendo o microcomputador (PC) utilizado apenas para controlar as medidas amperométricas e para processar os dados eletroquímicos.

6.3.1.2. Procedimento de funcionamento do μ C-PFS

O software em linguagem C controla todas as funções do instrumento desenvolvido. Inicialmente, o software verifica as portas digitais e analógicas do PIC, em seguida, inicializa automaticamente as funções de controle do tempo

de acionamento das válvulas através de quatro teclas no painel do instrumento. Uma mensagem é exibida na tela LCD, mostrando um menu principal com informações sobre o tempo de comutação das válvulas de reagentes e do transportador (eletrólito) que deve ser executado pelo equipamento. O tempo de comutação em tempo real é mostrado na tela LCD, como também a temperatura da cela eletroquímica. Primeiramente, a solução transportadora é propulsionada a partir do frasco adequado (amostragem) pela bomba de ar com vazão fixa e conduzido até a válvula solenoide de 3 vias, uma vez ligada, esta muda a direção do fluxo em direção à célula eletroquímica, com o tempo configurado previamente pelo usuário. Em seguida é registrado o sinal de base pela leitura do sinal de branco, sendo registrado pelo potenciostato via microcomputador acoplado a ele. Do mesmo modo, a válvula da amostra é acionada e o tempo de acionamento também é determinado previamente pelo usuário. Na Figura 6.8 são observados os três níveis de vazão fornecidos pelo μ C-PFS desenvolvido.

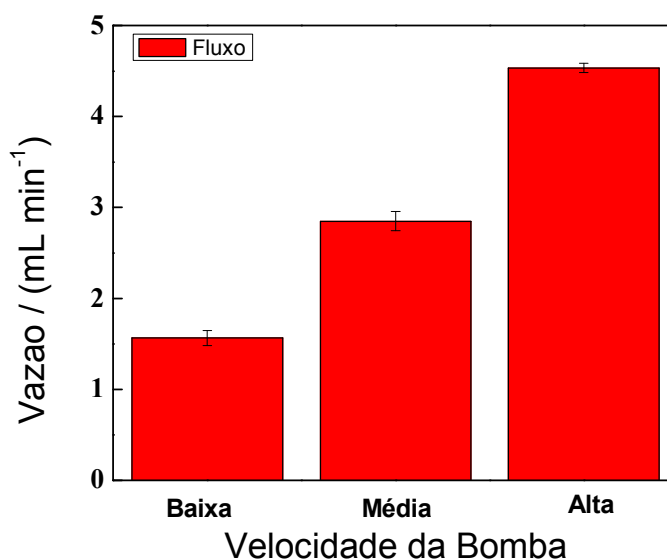


Figura 6. 8. Baixo, médio e alto, são os níveis de vazão que o equipamento pode operar. Os valores médios das vazões com seus respectivos desvios foram $1,5 \pm 0,2$ mL; $3,0 \pm 0,3$ mL e $4,5 \pm 0,1$ mL.

Os valores médios das vazões com seus respectivos desvios foram $1,5 \pm 0,2$ mL; $3,0 \pm 0,3$ mL e $4,5 \pm 0,1$ mL.

6.3.2. Caracterização do eletrodo AuNPs-PAH/SPCE

Empregando-se a equação de Randles-Sevcik, a área eletroativa do SPCE e AuNPs-PAH/SPCE foi estimada utilizando a voltametria cíclica em diversas velocidades de varredura em KCl 0,1 mol L⁻¹ na presença de 1,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]⁴⁻. Assim, as áreas eletroativas dos eletrodos SPCE e AuNPs-PAH/SPCE apresentaram valores de 0,215 e 0,387 cm², respectivamente. Como previsto, as nanopartículas de ouro aumentaram a área da superfície ativa do eletrodo em comparação com o eletrodo de carbono impresso. A Figura 6.9 apresenta os voltamogramas cíclicos em velocidade de varredura 50 mV s⁻¹, em KCl 0,1 mol L⁻¹ na presença de 1,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]⁴⁻.

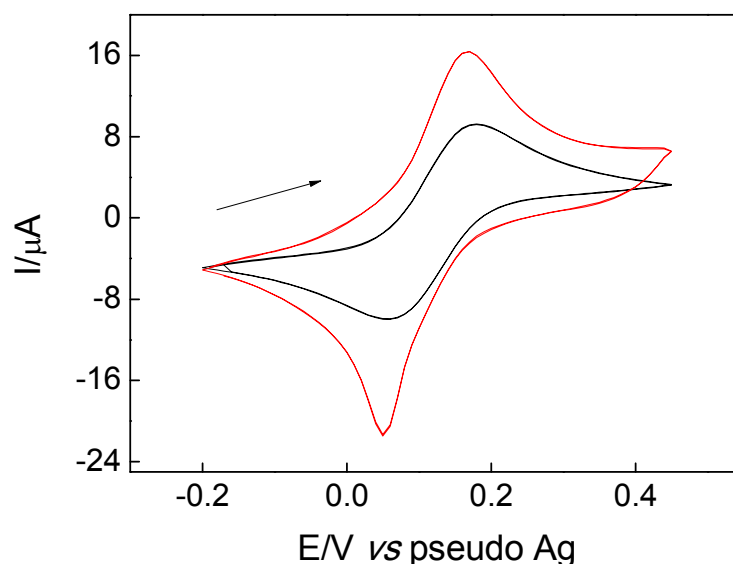


Figura 6.9. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos SPCE (–) e AuNPs-PAH/SPCE (–) em velocidade de varredura 50 mV s⁻¹, em KCl 0,1 mol L⁻¹ na presença de [Fe(CN)₆]⁴⁻ 1,0 mmol L⁻¹.

Para a caracterização do filme de AuNPs-PAH/SPCE utilizou-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de alta resolução. A Figura 6.10 mostra as imagens MEV das AuNPs-PAH na superfície do eletrodo de carbono impresso.

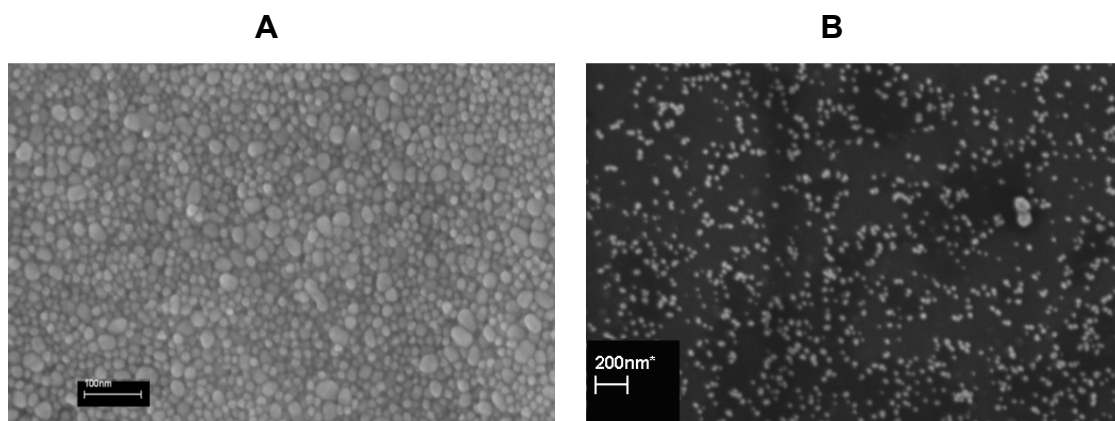


Figura 6. 10. Imagem de MEV das AuNPs (A) e AuNPs-PAH (B).

Após a caracterização do AuNPs-PAH/SPCE, iniciaram-se os estudos para o desenvolvimento do AChE-AuNPs-PAH/SPCE. Na presença de compostos organoclorado há inibição da atividade da AChE e com isso, a diminuição da formação da tiocolina. Como a AChE foi imobilizada no eletrodo AuNPs/SPCE, a quantidade de tiocolina produzida, para determinada concentração fixa de acetiltiocolina, depende da atividade da AChE.

6.3.3. Caracterização eletroquímica do biossensor AChE-AuNPs-PAH/SPCE

A Figura 6.11 mostra os voltamogramas cíclicos do biossensor AChE-AuNPs-PAH/SPCE na presença (B) e ausência de Diuron (A) a 50 mV s^{-1} em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ASCh. Foi observado um pico de oxidação em $0,75 \text{ V}$, que é atribuído à oxidação da tiocolina, produto da hidrólise de ASCh. Na presença de Diuron, observou-se a diminuição do sinal analítico devido à inibição da enzima (AChE) pelo organoclorado, diminuindo assim a concentração de tiocolina, espécie eletroativa responsável pelo sinal analítico.

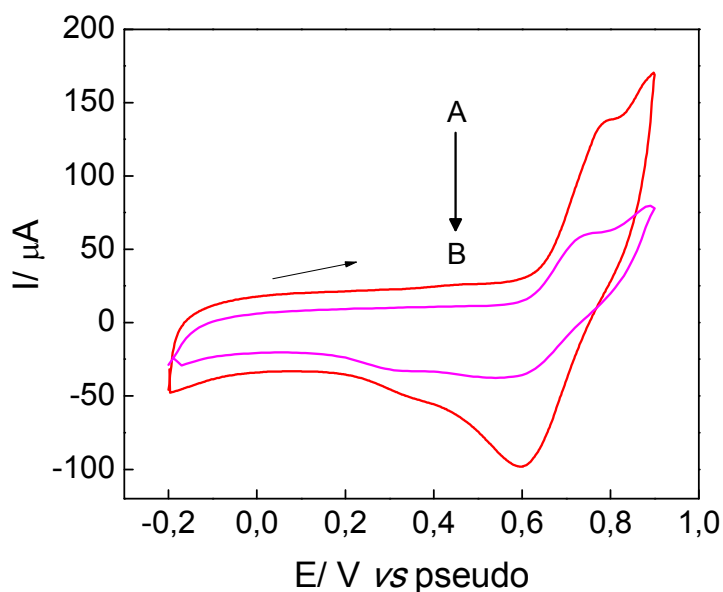


Figura 6.11. Voltamogramas cíclicos do eletrodo AChE-AuNPs-PAH/SPCE (A) meio de ASCh $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e na presença Diuron $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (B), nas mesmas condições; velocidade de varredura 50 mV s^{-1}

A enzima acetilcolinesterase catalisa a reação de hidrólise da acetiltiocolina formando tiocolina e acetato. Esta reação pode ser inibida, como por exemplo, por pesticidas da classe dos carbamatos, organofosforados e organoclorados, que se ligam a serina, o centro ativo da AChE¹⁷³. A Figura 6.12 apresenta a reação de formação de tiocolina e o processo de inibição enzimática provocada pelo pesticida Diuron.

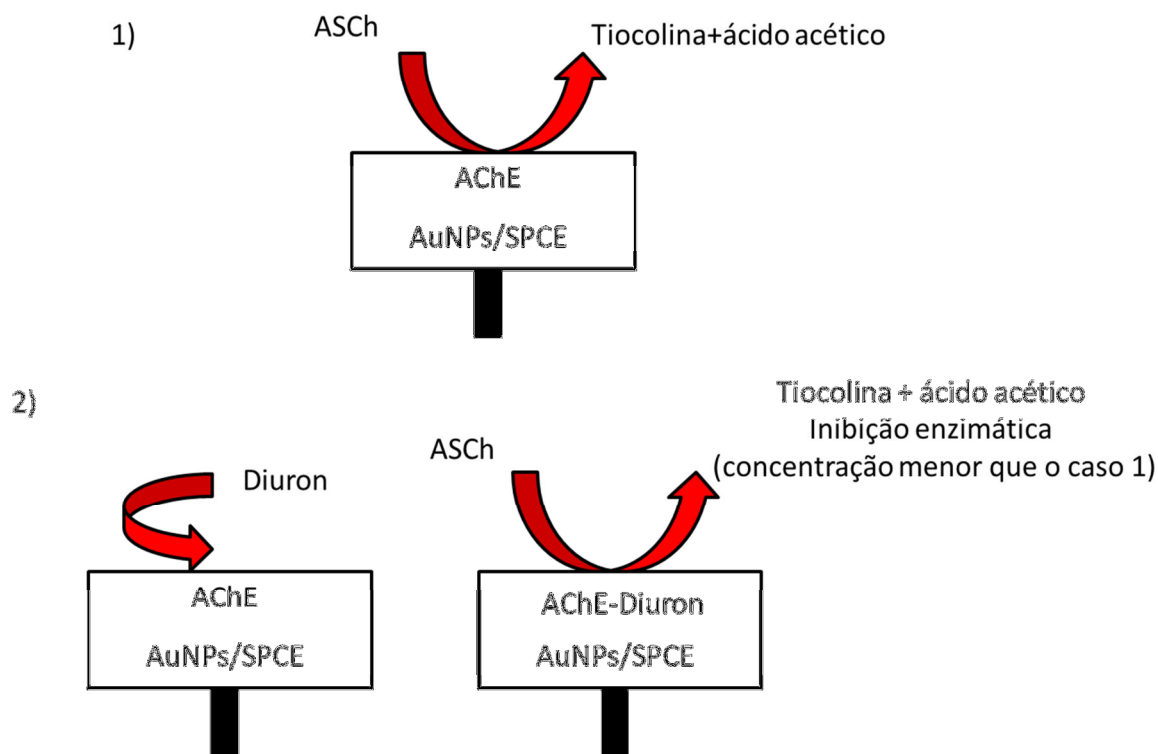


Figura 6. 12. Esquema de reação do biossensor AChE-AuNPs/SPCE. No primeiro caso está sendo mostrado a reação de formação da tiocolina catalisada pela enzima AChE immobilizada na superfície do eletrodo AuNPs/SPCE. No segundo caso, há ligação covalente entre o pesticida Diuron e a enzima AChE, fazendo com que haja inibição enzimática e uma diminuição da produção de tiocolina.

A ligação da enzima ASChE com os carbamatos é reversível e com organoclorados é irreversível. Então, a reativação da enzima AChE, quando ligada a organoclorados (ligação covalente), é possível ser implementada empregando-se alguns reagentes como pralidoxima, obidoxima entre outros¹⁷⁴. Portanto, para realizar a reativação do biossensor proposto seria necessário um estudo sistemático com esses compostos para verificar a possibilidade de reuso do biossensor na determinação do pesticida Diuron.

6.3.4. Potencial de trabalho e tempo de inibição

A influência do tempo de reação sobre a corrente obtida foi investigada no intervalo de 0–20 min, como observado na Figura 6.13. Durante este estudo, a $\mu\text{C-PFS}$ foi desligada após a chegada dos pesticidas na superfície do biossensor AChE-AuNPs-PAH/SPCE (para cada tempo foi utilizado um biossensor), para ocorrer a inibição da formação do produto. A corrente diminuiu com o aumento do tempo até o patamar de 8 min, permanecendo constante para tempos maiores. Assim, um tempo de reação de 8 min foi selecionado para estudos posteriores.

O efeito de aplicação do potencial de trabalho de 0,4 a 0,9 V vs Ag pseudo-referência em uma solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e Diuron 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi estudado. A partir de 0,6 V, pôde-se observar uma diminuição significativa da corrente até atingir o valor ótimo de 0,8 V, e, após este potencial, praticamente não se observou mais variação de corrente. Desta forma, para obter melhores resultados no desempenho analítico do biossensor, o potencial de trabalho de 0,8 V foi escolhido para estudos posteriores.

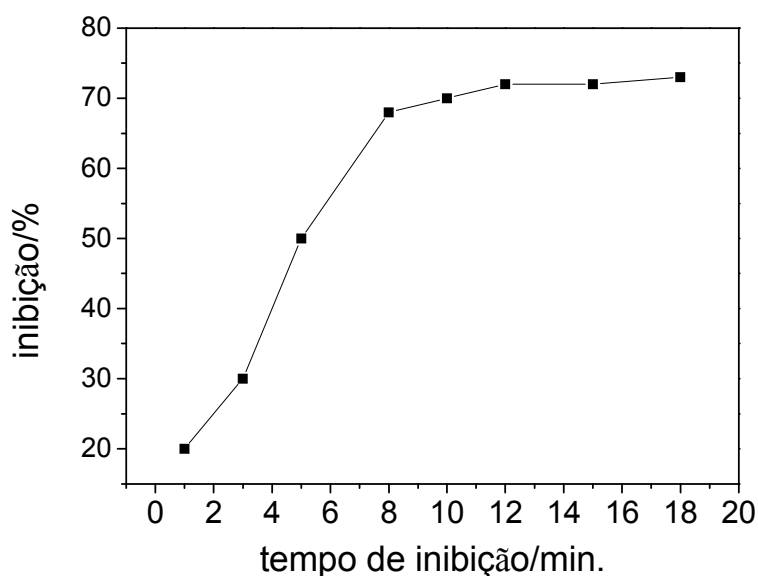


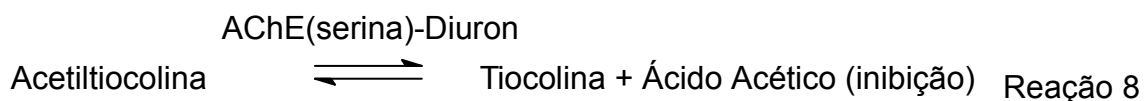
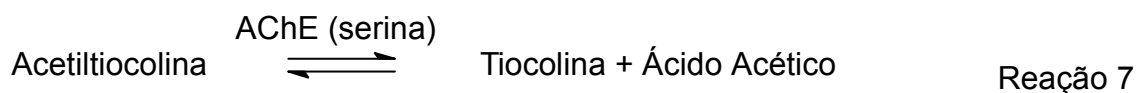
Figura 6.13. Estudo do tempo de inibição para o biossensor na presença de ASCh 1,0 mmol L⁻¹ e Diuron 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

6.3.5. Efeito dos parâmetros do sistema em fluxo

O efeito da vazão da solução transportadora foi investigado na faixa de 1,5 – 4,5 mL min⁻¹, mantendo-se a aplicação de um potencial de trabalho de 0,8 V. A corrente diminuiu com o aumento da vazão até 3,0 mL min⁻¹. Para vazões superiores a 3,0 mL min⁻¹, o sinal analítico manteve-se constante, devido a uma maior dispersão da zona de amostra e um menor tempo de permanência da substância eletroativa (tiocolina) em contato com a superfície do eletrodo. Portanto, uma vazão da solução transportadora de 3,0 mL min⁻¹ foi selecionada, mantendo um bom compromisso entre a magnitude do sinal analítico e estabilidade na resposta do eletrodo.

6.3.6. Determinação de Diuron por amperometria

A relação entre a diminuição da intensidade de corrente de pico e as concentrações de Diuron foi examinada utilizando análise por injeção em fluxo com o auxílio de uma bomba microcontrolada μ C-PFS (utilizou-se um eletrodo para cada concentração do pesticida). Portanto, a cada concentração, a bomba era pausada, um novo biossensor colocado na célula eletroquímica e um frasco contendo o pesticida e acetiltiocolina colocado na bomba de fluxo). Além disso linha base foi corrigida com o auxílio do software Origin® após obtenção de todos sinais amperométricos). A diminuição da corrente está relacionada à inibição enzimática relacionada à oxidação da acetiltiocolina na presença do pesticida Diuron. Primeiramente há reação da acetiltiocolina na presença da enzima acetilcolinesterase (Reação 7). Já na presença de Diuron há posterior ligação irreversível do centro ativo (serina) da enzima AChE com pesticida onde há inibição da formação de tiocolina (Reação 8) e ácido acético.



A diminuição da corrente de pico (sinal analítico) é linearmente proporcional à concentração de Diuron em um intervalo de concentração de $8,0 \times 10^{-8}$ a $1,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 6.14), com uma equação correspondente a $-\Delta/p (\mu\text{A}) = 0,98 + 1,20 \times 10^7 [\text{Diuron}]$ e um coeficiente de correlação de 0,994 como apresentada a curva analítica da Figura 6.15. O limite de detecção obtido a partir da relação sinal/ruído foi de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de Diuron obtido através da relação sinal-ruído utilizando a relação 3:1.

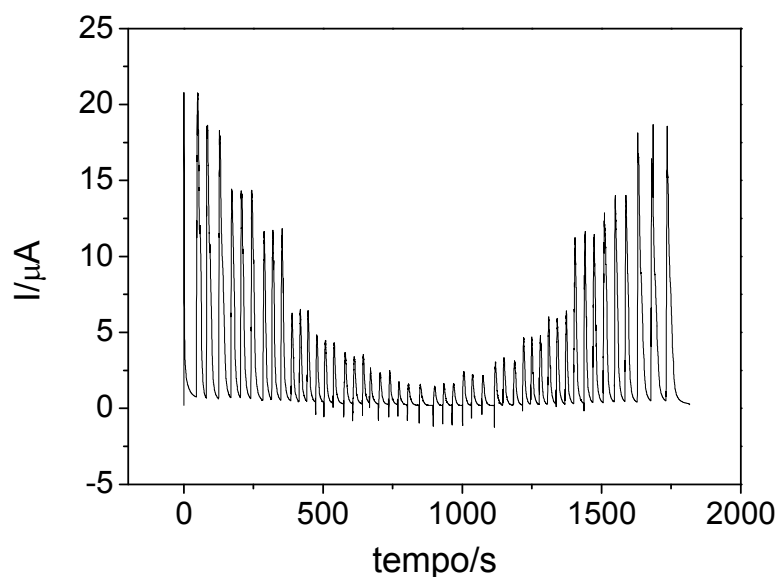


Figura 6. 14. Amperogramas do biossensor AChE-AuNPs-PAH/SPCE em meio de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), ASCh $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e concentrações de $8,0 \times 10^{-8}$; $2,5 \times 10^{-7}$; $7,1 \times 10^{-7}$; $8,5 \times 10^{-7}$; $9,5 \times 10^{-7}$; $1,05 \times 10^{-6}$; $1,1 \times 10^{-6}$ e $1,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de Diuron. $E_{ap}=0,8 \text{ V}$, vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ e tempo de inibição de 8 min.

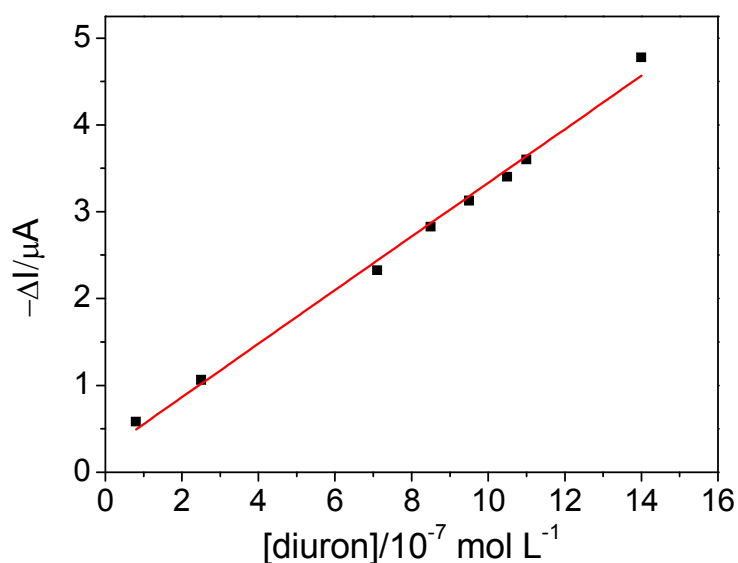


Figura 6. 15. Curva analítica do biossensor AChE-AuNPs-PAH/SPCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ASCh $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, e diferentes concentrações de Diuron. A equação da reta foi $-\Delta I/\mu\text{A} = 0,98 + 1,20 \times 10^7 [\text{Diuron}]$ com um coeficiente de correlação de 0,994. O limite de detecção obtido foi de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

Realizou-se então a análise de Diuron em amostras de águas naturais utilizando-se o biossensor AChE-AuNPs-PAH/SPCE proposto. As amostras de água naturais foram coletadas do rio Monjolinho (São Carlos – SP – Brasil) em 3 diferentes pontos, e, à cada amostra quantidades apropriadas de Diuron foram adicionadas. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.1.

Tabela 6. 1. Determinação de Diuron em amostras de água natural

Amostra	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Biosensor ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
A1	0,50	$0,52 \pm 0,02$	104
	1,00	$1,03 \pm 0,07$	103
A2	0,50	$0,49 \pm 0,02$	98,0
	1,00	$0,97 \pm 0,04$	97,0
A3	0,50	$0,47 \pm 0,01$	94,0
	1,00	$1,07 \pm 0,03$	107

Realizou-se o estudo de reprodutibilidade do biossensor proposto na presença de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Diuron utilizando cinco diferentes biossensores AChE-AuNPs/SPCE, apresentando uma reprodutibilidade aceitável, com uma variação de 4,8% de RSD na presença de Diuron.

6.3.7 Estudo de interferentes

Para avaliar a seletividade do biossensor, a influência de algumas substâncias geralmente encontradas em amostras de águas foram avaliados em solução de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) contendo $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Diuron na presença de interferentes como alumínio(III), ferro(III), Ca(II), Mg(II), carbonato, cloreto, sulfato, brometo e iodeto em excesso de 100 vezes. Os resultados mostraram que essas substâncias causaram interferência menor que 5 % na determinação de Diuron em amostras de água.

A presença de carbamatos, organofosforados, entre outros pesticidas poderiam causar interferência nas medidas do pesticida Diuron utilizando o biossensor proposto.

6.4. CONCLUSÕES

Com a bomba microcontrolada operando em modo de bateria, uma autonomia de 15 h foi conseguida, o que permite que análises *in situ* possam ser facilmente realizadas de modo rápido, com boa confiabilidade, precisão e exatidão. De acordo com os resultados obtidos, a bomba microcontrolada apresentou um bom desempenho com boa precisão para os três de níveis de vazões possíveis. Mesmo utilizando um biossensor que pode ser aplicado uma única vez, este por ser descartável e de baixo custo, propicia uma detecção satisfatória, com boa frequência analítica e com um procedimento completamente automático, o que viabiliza sua aplicação em campo.

Pôde se verificar ainda, que a presença das nanopartículas de ouro no filme de PAH provocou um aumento significativo da corrente de pico bem como uma boa definição dos picos de oxidação da tiocolina obtendo-se assim uma melhora na transferência de elétrons. A dispersão das AuNPs em PAH sobre a superfície do SPCE se mostrou estável e homogênea, fato este comprovado pelo MEV, sendo um filme estável para a aplicação em biossensores. Além disso, a enzima Acetilcolinesterase foi imobilizada efetivamente no filme AuNPs-PAH e aplicado na determinação do pesticida Diuron.

CONCLUSÕES GERAIS
E
SUGESTÕES DE
TRABALHOS FUTUROS

CAPÍTULO 7

7. Conclusões gerais e sugestões de trabalhos futuros

7.1. Conclusões gerais

Foram desenvolvidas com sucesso novas arquiteturas de biossensores eletroquímicos enzimáticos utilizando nanomateriais. Utilizaram-se as enzimas glicose oxidase para a determinação de glicose, tirosinase para compostos fenólicos, e a acetilcolinesterase para a determinação de pesticidas organoclorados. Além desses biossensores, também foi desenvolvido um imunossensor para prolactina.

O tratamento ácido dos nanotubos de carbono propiciou o aparecimento de grupos carboxílicos que por sua vez, permitiram a ligação covalente direta com a enzima glicose oxidase.

O biossensor GOx-CNTs-DHP/GCE apresentou uma faixa linear de 0,02 a 15 mmol L⁻¹ e um limite de detecção de 9,0 μmol L⁻¹ para glicose utilizando a voltametria de onda quadrada. Após 30 dias (ou 120 determinações) resposta do biossensor foi 89,0 % da resposta inicial. A constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{APP}) calculada foi de 11 mmol L⁻¹.

A eletrodeposição realizada com o auxílio do planejamento fatorial pode ser uma estratégia interessante para a obtenção de nanopartículas metálicas sobre diferentes superfícies eletródicas.

A transferência direta de elétrons deu-se a partir da enzima Tyr diretamente ligada às AuNPs empregando-se glutaraldeído e cistamina. O aumento da corrente de pico catódica foi linearmente proporcional à concentração de fenol em um intervalo de concentração de 0,1 a 11,0 μmol L⁻¹, além de um limite de detecção de 0,07 μmol L⁻¹, a partir da voltametria de onda quadrada. A constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{APP}) calculada foi de 13 μmol L⁻¹.

O emprego da cronopotenciometria foi interessante para a eletrodeposição de nanopartículas de ouro sobre eletrodo de carbono impresso.

A quantificação de prolactina foi realizada por voltametria de pulso diferencial, de 1-naftol, formado como o produto da reação enzimática utilizando 1-naftil fosfato como substrato da enzima AP. O imunossensor proposto exibiu uma faixa linear de

15 a 1000 ng mL⁻¹ e um limite de detecção de 10 ng mL⁻¹, o qual foi aplicado com sucesso em amostras de soro humano enriquecido com prolactina.

O eletrodo de carbono impresso comercial é uma alternativa para o desenvolvimento de sensores e biossensores descartáveis visando aplicação *in situ*, com boa precisão e confiabilidade.

O uso de polieletrólitos é uma proposta para a formação de filmes estáveis para a construção de eletrodos com materiais nanoestruturados.

O biossensor, AChE-AuNPs/SPCE apresentou uma faixa linear de $8,0 \times 10^{-8}$ a $1,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de Diuron. Além disso, o biossensor apresentou boa sensibilidade, estabilidade e reprodutibilidade para a determinação de Diuron por amperometria.

7.2. Perspectivas futuras

Propor de novos biossensores eletroquímicos para a análise de amostras de águas *in situ*,

Aplicar a bomba microcontrolada em procedimentos fotométricos em fluxo e aplicação desta juntamente com novos biossensores em análises clínicas.

Estudar da reativação do biossensor AChE-AuNPs-PAH/GCE com reagentes como prolaxina.

Propor novos biossensores a partir de materiais nanoestruturados, por exemplo, nanopartículas metálicas e/ou grafeno.

Estudar novos filmes poliméricos e polieletrólitos para novos sensores e biossensores eletroquímicos.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

CAPÍTULO 8

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. THEVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R.A. & WILSON, G.S., "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification". *Biosens. Bioelectron.* **16**(1-2): 121, 2001.
2. FATIBELLO-FILHO, O. & CAPELATO, M.D., "Biossensores". *Quimica Nova.* **15**(1): 28, 1992.
3. MEHRVAR, M. & ABDI, M., "Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors". *Anal. Sci.* **20**(8): 1113, 2004.
4. AMINE, A.; MOHAMMADI, H.; BOURAIS, I. & PALLESCHI, G., "Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring". *Biosens. Bioelectron.* **21**(8): 1405, 2006.
5. COSNIER, S., "Biosensors based on electropolymerized films: new trends". *Anal. Bioanal. Chem.* **377**(3): 507, 2003.
6. PIERRE, A.C., "The sol-gel encapsulation of enzymes". *Biocatal. Biotransform.* **22**(3): 145, 2004.
7. CHU, X.; DUAN, D.X.; SHEN, G.L. & YU, R.Q., "Amperometric glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto covalently immobilized carbon nanotube electrode". *Talanta.* **71**(5): 2040, 2007.
8. ZOU, Y.J.; XIAN, C.L.; SUN, L.X. & XU, F., "Amperometric glucose biosensor prepared with biocompatible material and carbon nanotube by layer-by-layer self-assembly technique". *Electrochim. Acta.* **53**(12): 4089, 2008.
9. LIU, Z.M.; LIU, Y.L.; SHEN, G.L. & YU, R.Q., "Nano-ZnO/chitosan composite film modified electrode for voltammetric detection of DNA hybridization". *Anal. Lett.* **41**(6): 1083, 2008.
10. NASCIMENTO, V.B. & ANGNES, L., "Screen-printed electrodes". *Quimica Nova.* **21**(5): 614, 1998.
11. CLARK, L.C. & LYONS, C., "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery". *Ann.NY Acad.Sci.* **102**(1): 29, 1962.
12. FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A.; MELLO, L.D. & KUBOTA, L.T., "Direct electron transfer: An approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity". *J. Braz. Chem. Soc.* **14**(2): 230, 2003.
13. CHEN, Q.; PAMIDI, P.V.A.; WANG, J. & KUTNER, W., "β-Cyclodextrin cation exchange polymer membrane for improved second-generation glucose biosensors". *Anal. Chim. Acta.* **306**(2-3): 201, 1995.
14. JANEGITZ, B.C.; PAULIUKAITE, R.; GHICA, M.E.; BRETT, C.M.A. & FATIBELLO-FILHO, O., "Direct electron transfer of glucose oxidase at glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film". *Sensors and Actuators B: Chemical.* **158**(1): 411, 2011.
15. MARQUES, P. & YAMANAKA, H., "Biosensors based on the enzymatic inhibition process". *Quimica Nova.* **31**(7): 1791, 2008.
16. JANG, L.S. & KENG, H.K., "Modified fabrication process of protein chips using a short-chain self-assembled monolayer". *Biomed. Microdevices.* **10**(2): 203, 2008.

17. GRABAREK, Z. & GERGELY, J., "Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters". *Analytical Biochemistry*. **185**(1): 131, 1990.
18. JENNINGS, M.L. & NICKNISH, J.S., "Localization of a site of intermolecular cross-linking in human red blood-cell band-3 protein". *J. Biol. Chem.* **260**(9): 5472, 1985.
19. STAROS, J.V., "N-hydroxysulfosuccinimide active esters - bis(n-hydroxysulfosuccinimide) esters of 2 dicarboxylic-acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers". *Biochemistry*. **21**(17): 3950, 1982.
20. PAULIUKAITE, R.; GHICA, M.E.; FATIBELLO, O. & BRETT, C.M.A., "Comparative Study of Different Cross-Linking Agents for the Immobilization of Functionalized Carbon Nanotubes within a Chitosan Film Supported on a Graphite-Epoxy Composite Electrode". *Anal. Chem.* **81**(13): 5364, 2009.
21. JANEGITZ, B.C.; FIGUEIREDO-FILHO, L.C.S.; MARCOLINO-JUNIOR, L.H.; SOUZA, S.P.N.; PEREIRA-FILHO, E.R. & FATIBELLO-FILHO, O., "Development of a carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan for cadmium(II) and mercury(II) determination". *J. Electroanal. Chem.* **660**(1): 209, 2011.
22. HUANG, I.Y. & LEE, M.C., "Development of a FPW allergy biosensor for human IgE detection by MEMS and cystamine-based SAM technologies". *Sensors and Actuators B: Chemical*. **132**(1): 340, 2008.
23. MORENO-GUZMÁN, M.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P. & PINGARRÓN, J.M., "A disposable electrochemical immunosensor for prolactin involving affinity reaction on streptavidin-functionalized magnetic particles". *Anal. Chim. Acta.* **692**(1-2): 125, 2011.
24. MORENO-GUZMAN, M.; EGUILAZ, M.; CAMPUZANO, S.; GONZALEZ-CORTES, A.; YANEZ-SEDENO, P. & PINGARRON, J.M., "Disposable immunosensor for cortisol using functionalized magnetic particles". *Analyst*. **135**(8): 1926, 2010.
25. KAVAN, L.; DUNSCH, L. & KATAURA, H., "Electrochemical tuning of electronic structure of carbon nanotubes and fullerene peapods". *Carbon*. **42**(5-6): 1011, 2004.
26. SHERIGARA, B.S.; KUTNER, W. & D'SOUZA, F., "Electrocatalytic Properties and Sensor Applications of Fullerenes and Carbon Nanotubes". *Electroanalysis*. **15**(9): 753, 2003.
27. TAN, X.; LI, M.; CAI, P.; LUO, L. & ZOU, X., "An amperometric cholesterol biosensor based on multiwalled carbon nanotubes and organically modified sol-gel/chitosan hybrid composite film". *Analytical Biochemistry*. **337**(1): 111, 2005.
28. ZHAO, Q.; GAN, Z. & ZHUANG, Q., "Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanotubes". *Electroanalysis*. **14**(23): 1609, 2002.
29. LI, J.; KOEHNE, J.E.; CASSELL, A.M.; CHEN, H.; NG, H.T.; YE, Q.; FAN, W.; HAN, J. & MEYYAPPAN, M., "Inlaid multi-walled carbon nanotube nanoelectrode arrays for electroanalysis". *Electroanalysis*. **17**(1): 15, 2005.
30. WILDGOOSE, G.G.; BANKS, C.E.; LEVENTIS, H.C. & COMPTON, R.G., "Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis". *Microchimica Acta*. **152**(3-4): 187, 2006.

31. WANG, J. & LIN, Y.H., "Functionalized carbon nanotubes and nanofibers for biosensing applications". *Trac-Trends Anal. Chem.* **27**(7): 619, 2008.
32. IJIMA, S., "Helical microtubules of graphitic carbon". *Nature.* **354**(6348): 56, 1991.
33. KATZ, E. & WILLNER, I., "Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: Applications in nanobioelectronics". *ChemPhysChem.* **5**(8): 1085, 2004.
34. RIVAS, G.A.; RUBIANES, M.D.; RODRIGUEZ, M.C.; FERREYRA, N.E.; LUQUE, G.L.; PEDANO, M.L.; MISCORIA, S.A. & PARRADO, C., "Carbon nanotubes for electrochemical biosensing". *Talanta.* **74**(3): 291, 2007.
35. MERKOCI, A., "Carbon nanotubes in analytical sciences". *Microchimica Acta.* **152**(3-4): 157, 2006.
36. LIN, Y.; YANTASEE, W.; WANG, J.; MUSAMEH, M.; TU, Y. & REN, Z., *Biosensor Based on Carbon Nanotubes, In: Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology.* 2004, New York: H. S. Nalwa.
37. LI, J., *Applications: Biosensors, in: Carbon Nanotubes- Science and Applications.* 2005, New York: CRC Press.
38. GOODING, J.J., "Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing". *Electrochim. Acta.* **50**(15): 3049, 2005.
39. BASIUK, V.A. & BASIUK, E.V., *Chemical Derivatization of Carbon Nanotube Tips, In: Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology.* 2004, New York: H. S. Nalwa
40. JI, X.B.; KADARA, R.O.; KRUSSMA, J.; CHEN, Q.Y. & BANKS, C.E., "Understanding the Physicoelectrochemical Properties of Carbon Nanotubes: Current State of the Art". *Electroanalysis.* **22**(1): 7, 2010.
41. ZHOU, T.L.; WANG, X.; ZHU, H.G. & WANG, T.C., "Influence of carboxylic functionalization of MWCNTs on the thermal properties of MWCNTs/DGEBA/EMI-2,4 nanocomposites". *Compos. Pt. A-Appl. Sci. Manuf.* **40**(11): 1792, 2009.
42. AGUI, L.; YANEZ-SEDENO, P. & PINGARRON, J.M., "Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry - A review". *Anal. Chim. Acta.* **622**(1-2): 11, 2008.
43. VALENTINI, F.; AMINE, A.; ORLANDUCCI, S.; TERRANOVA, M.L. & PALLESCI, G., "Carbon nanotube purification: Preparation and characterization of carbon nanotube paste electrodes". *Anal. Chem.* **75**(20): 5413, 2003.
44. PEREIRA, A.C.; SANTOS, A.D. & KUBOTA, L.T., "Trends in amperometric electrodes modification for electroanalytical applications". *Quimica Nova.* **25**(6A): 1012, 2002.
45. WELCH, C.W. & COMPTON, R.G., "The use of nanoparticles in electroanalysis: a review". *Anal. Bioanal. Chem.* **384**(3): 601, 2006.
46. CAMPBELL, F. & COMPTON, R., "The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review". *Anal. Bioanal. Chem.* **396**(1): 241, 2010.
47. PENN, S.G.; HE, L. & NATAN, M.J., "Nanoparticles for bioanalysis". *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**(5): 609, 2003.
48. PINGARRÓN, J.M.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P. & GONZÁLEZ-CORTÉS, A., "Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors". *Electrochim. Acta.* **53**(19): 5848, 2008.

49. TANG, L.; ZENG, G.M.; SHEN, G.L.; ZHANG, Y.; LI, Y.P.; FAN, C.Z.; LIU, C. & NIU, C.G., "Highly sensitive sensor for detection of NADH based on catalytic growth of Au nanoparticles on glassy carbon electrode". *Anal. Bioanal. Chem.* **393**(6-7): 1677, 2009.
50. ZHANG, Y.; ZENG, G.M.; TANG, L.; HUANG, D.L.; JIANG, X.Y. & CHEN, Y.N., "A hydroquinone biosensor using modified core-shell magnetic nanoparticles supported on carbon paste electrode". *Biosens. Bioelectron.* **22**(9-10): 2121, 2007.
51. MURPHY, L., "Biosensors and bioelectrochemistry". *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**(2): 177, 2006.
52. DAVE, K.; MCKECHNIE, L. & PANCHAL, H., "Application of Nanobioinformatics in Medical Science - A Probable Therapy". *Curr. Bioinform.* **6**(2): 163, 2011.
53. JACOB, S.J.P.; FINU, J.S. & NARAYANAN, A., "Synthesis of silver nanoparticles using Piper longum leaf extracts and its cytotoxic activity against Hep-2 cell line". *Colloid Surf. B-Biointerfaces.* **91**: 212, 2012.
54. DELOUISE, L.A., "Applications of Nanotechnology in Dermatology". *J. Invest. Dermatol.* **132**(3): 964, 2012.
55. ANITA, S.; RAMACHANDRAN, T.; RAJENDRAN, R.; KOUSHIK, C.V. & MAHALAKSHMI, M., "A study of the antimicrobial property of encapsulated copper oxide nanoparticles on cotton fabric". *Text. Res. J.* **81**(10): 1081, 2011.
56. ZANCHET, D.; HALL, B.D. & UGARTE, D., "Structure population in thiol-passivated gold nanoparticles". *J. Phys. Chem. B.* **104**(47): 11013, 2000.
57. ZANCHET, D.; TOLENTINO, H.; ALVES, M.C.M.; ALVES, O.L. & UGARTE, D., "Inter-atomic distance contraction in thiol-passivated gold nanoparticles". *Chem. Phys. Lett.* **323**(1-2): 167, 2000.
58. BARON, R.; CAMPBELL, F.W.; STREETER, I.; XIAO, L. & COMPTON, R.G., "Facile method for the construction of random nanoparticle arrays on a carbon support for the development of well-defined catalytic surfaces". *Int. J. Electrochem. Sci.* **3**(5): 556, 2008.
59. BATCHELOR-MCAULEY, C. & WILDGOOSE, G.G., "The influence of substrate effects when investigating new nanoparticle modified electrodes exemplified by the electroanalytical determination of aspirin on NiO nanoparticles supported on graphite". *Electrochem Commun.* **10**(8): 1129, 2008.
60. WANG, S.F.; XU, Q. & LIU, G.D., "Differential pulse voltammetric determination of uric acid on carbon-coated iron nanoparticle modified glassy carbon electrodes". *Electroanalysis.* **20**(10): 1116, 2008.
61. MASHHADIZADEH, M.H.; ESKANDARI, K.; FOROUMADI, A. & SHAFIEE, A., "Copper(II) modified carbon paste electrodes based on self-assembled mercapto compounds-gold-nanoparticle". *Talanta.* **76**(3): 497, 2008.
62. ABOLLINO, O.; GIACOMINO, A.; MALANDRINO, M.; PISCIONIERI, G. & MENTASTI, E., "Determination of mercury by anodic stripping voltammetry with a gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode". *Electroanalysis.* **20**(1): 75, 2008.
63. LI, X.L.; YUAN, R.; CHAI, Y.Q.; ZHANG, L.Y.; ZHUO, Y. & ZHANG, Y., "Amperometric immunosensor based on toluidine blue/nano-Au through

- electrostatic interaction for determination of carcinoembryonic antigen". *J. Biotechnol.* **123**(3): 356, 2006.
64. DING, C.; ZHAO, F.; REN, R. & LIN, J.-M., "An electrochemical biosensor for [alpha]-fetoprotein based on carbon paste electrode constructed of room temperature ionic liquid and gold nanoparticles". *Talanta.* **78**(3): 1148, 2009.
65. YUAN, Y.R.; YUAN, R.; CHAI, Y.Q.; ZHUO, Y. & MIAO, X.M., "Electrochemical amperometric immunoassay for carcinoembryonic antigen based on bi-layer nano-Au and nickel hexacyanoferrates nanoparticles modified glassy carbon electrode". *J. Electroanal. Chem.* **626**(1-2): 6, 2009.
66. SZUNERITS, S. & BOUKHERROUB, R., "Investigation of the electrocatalytic activity of boron-doped diamond electrodes modified with palladium or gold nanoparticles for oxygen reduction reaction in basic medium". *Comptes Rendus Chimie.* **11**(9): 1004, 2008.
67. OISHI, S.S., "Síntese, Dopagem E Caracterização Das Resinas Furfurílica e Fenol-Furfurílica visando a Otimização do Processamento de Carbono Vítreo Reticulado. Guaratinguetá, Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista. Dissertação de Mestrado.". 2009.
68. LAMAS-ARDISANA, P.J.; QUEIPO, P.; FANJUL-BOLADO, P. & COSTA-GARCIA, A., "Multiwalled carbon nanotube modified screen-printed electrodes for the detection of p-aminophenol: Optimisation and application in alkaline phosphatase-based assays". *Anal. Chim. Acta.* **615**(1): 30, 2008.
69. MEDEIROS, R.A.; DE CARVALHO, A.E.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode". *Talanta.* **76**(3): 685, 2008.
70. WENG, J.; XUE, J.M.; WANG, J.; YE, J.S.; CUI, H.F.; SHEU, F.S. & ZHANG, Q.Q., "Gold-cluster sensors formed electrochemically at boron-doped-diamond electrodes: Detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and thiols". *Adv. Funct. Mater.* **15**(4): 639, 2005.
71. BATCHELOR-MCAULEY, C.; BANKS, C.E.; SIMM, A.O.; JONES, T.G.J. & COMPTON, R.G., "The electroanalytical detection of hydrazine: A comparison of the use of palladium nanoparticles supported on boron-doped diamond and palladium plated BDD microdisc array". *Analyst.* **131**(1): 106, 2006.
72. MAHE, E.; DEVILLIERS, D. & COMNINELLIS, C., "Electrochemical reactivity at graphitic micro-domains on polycrystalline boron doped diamond thin-films electrodes". *Electrochim. Acta.* **50**(11): 2263, 2005.
73. MONTILLA, F.; MORALLON, E.; DUO, I.; COMNINELLIS, C. & VAZQUEZ, J.L., "Platinum particles deposited on synthetic boron-doped diamond surfaces. Application to methanol oxidation". *Electrochim. Acta.* **48**(25-26): 3891, 2003.
74. SINE, G. & COMNINELLIS, C., "Nafion((R))-assisted deposition of microemulsion-synthesized platinum nanoparticles on BDD - Activation by electrogenerated (OH)-O-center dot radicals". *Electrochim. Acta.* **50**(11): 2249, 2005.

75. STRADIOTTO, N.R.; TOGHILL, K.E.; XIAO, L.; MOSHAR, A. & COMPTON, R.G., "The Fabrication and Characterization of a Nickel Nanoparticle Modified Boron Doped Diamond Electrode for Electrocatalysis of Primary Alcohol Oxidation". *Electroanalysis*. **21**(24): 2627, 2009.
76. WEI, M.; SUN, L.G.; XIE, Z.Y.; ZHII, J.F.; FUJISHIMA, A.; EINAGA, Y.; FU, D.G.; WANG, X.M. & GU, Z.Z., "Selective determination of dopamine on a boron-doped diamond electrode modified with gold nanoparticle/polyelectrolyte-coated polystyrene colloids". *Adv. Funct. Mater.* **18**(9): 1414, 2008.
77. WU, Y., "Nano-TiO₂/dihexadecylphosphate based electrochemical sensor for sensitive determination of pentachlorophenol". *Sensors and Actuators B: Chemical*. **137**(1): 180, 2009.
78. YAO, S.J.; XU, J.H.; WANG, Y.; CHEN, X.X.; XU, Y.X. & HU, S.S., "A highly sensitive hydrogen peroxide amperometric sensor based on MnO₂ nanoparticles and dihexadecyl hydrogen phosphate composite film". *Anal. Chim. Acta*. **557**(1-2): 78, 2006.
79. WU, Y.H. & HU, S.S., "Direct electrochemistry of glucose oxidase in a colloid Au-dihexadecylphosphate composite film and its application to develop a glucose biosensor". *Bioelectrochemistry*. **70**(2): 335, 2007.
80. TAKEDA, H.H.; JANEGITZ, B.C.; MEDEIROS, R.A.; MATTOSO, L.H.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Differential pulse voltammetric determination of ciprofibrate in pharmaceutical formulations using a glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a poly(allylamine hydrochloride) film". *Sensors and Actuators B: Chemical*. **161**(1): 755, 2012.
81. CAI, C.X. & CHEN, J., "Direct electron transfer of glucose oxidase promoted by carbon nanotubes". *Analytical Biochemistry*. **332**(1): 75, 2004.
82. ZHAO, Y.D.; ZHANG, W.D.; CHEN, H. & LUO, Q.M., "Direct electron transfer of glucose oxidase molecules adsorbed onto carbon nanotube powder microelectrode". *Anal. Sci.* **18**(8): 939, 2002.
83. LIU, Y.; WANG, M.K.; ZHAO, F.; XU, Z.A. & DONG, S.J., "The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix". *Biosens. Bioelectron.* **21**(6): 984, 2005.
84. KRSTIC, D.Z.; COLOVIC, M.; KRALJ, M.B.; FRANKO, M.; KRINULOVIC, K.; TREBSE, P. & VASIC, V., "Inhibition of AChE by malathion and some structurally similar compounds". *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **23**(4): 562, 2008.
85. HSIEH, B.C.; MATSUMOTO, K.; CHENG, T.J.; YUU, G. & CHEN, R.L.C., "Choline biosensor constructed with chitinous membrane from soldier crab and its application in measuring cholinesterase inhibitory activities". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**(4): 673, 2007.
86. DU, D.; HUANG, X.; CAI, J.; ZHANG, A.D.; DING, J.W. & CHEN, S.Z., "An amperometric acetylthiocholine sensor based on immobilization of acetylcholinesterase on a multiwall carbon nanotube-cross-linked chitosan composite". *Anal. Bioanal. Chem.* **387**(3): 1059, 2007.
87. GHOSH, D.; DUTTA, K.; BHATTACHARYAY, D. & SARKAR, P., "Amperometric detection of pesticides using polymer electrodes". *Environ. Monit. Assess.* **119**(1-3): 481, 2006.

88. ZHANG, S.P.; SHAN, L.G.; TIAN, Z.R.; ZHENG, Y.; SHI, L.Y. & ZHANG, D.S., "Study of enzyme biosensor based on carbon nanotubes modified electrode for detection of pesticides residue". *Chin. Chem. Lett.* **19**(5): 592, 2008.
89. WANG, J.; TIMCHALK, C. & LIN, Y.H., "Carbon nanotube-based electrochemical sensor for assay of salivary cholinesterase enzyme activity: An exposure biomarker of organophosphate pesticides and nerve agents". *Environ. Sci. Technol.* **42**(7): 2688, 2008.
90. BAIRD, C., *Química Ambiental*. 2002, Porto Alegre: Bookman.
91. OLIVEIRA-BRETT, A.M. & DA SILVA, L.A., "A DNA-electrochemical biosensor for screening environmental damage caused by s-triazine derivatives". *Anal. Bioanal. Chem.* **373**(8): 717, 2002.
92. CASIDA, J.E., "Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action". *Chem. Res. Toxicol.* **22**(4): 609, 2009.
93. SHULGA, O. & KIRCHHOFF, J.R., "An acetylcholinesterase enzyme electrode stabilized by an electrodeposited gold nanoparticle layer". *Electrochem. Commun.* **9**(5): 935, 2007.
94. TURDEAN, G.; POPESCU, I. & ONICIU, L., "Amperometric cholinesterase biosensors for the determination of organophosphorus pesticides". *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.* **80**(3): 315, 2002.
95. BUCUR, B.; FOURNIER, D.; DANET, A. & MARTY, J.L., "Biosensors based on highly sensitive acetylcholinesterases for enhanced carbamate insecticides detection". *Anal. Chim. Acta.* **562**(1): 115, 2006.
96. NUNES, G.S.; JEANTY, G. & MARTY, J.L., "Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides - Comparative study". *Anal. Chim. Acta.* **523**(1): 107, 2004.
97. ABDULLAH, J.; AHMAD, M.; HENG, L.Y.; KARUPPIAH, N. & SIDEK, H., "Chitosan-based tyrosinase optical phenol biosensor employing hybrid nafion/sol-gel silicate for MBTH immobilization". *Talanta.* **70**(3): 527, 2006.
98. LIU, Z.J.; DENG, J.Q. & LI, D., "A new tyrosinase biosensor based on tailoring the porosity of A1(2)O(3) sol-gel to co-immobilize tyrosinase and the mediator". *Anal. Chim. Acta.* **407**(1-2): 87, 2000.
99. VIDAL, J.C.; BONEL, L. & CASTILLO, J.R., "A modulated tyrosinase enzyme-based biosensor for application to the detection of dichlorvos and atrazine pesticides". *Electroanalysis.* **20**(8): 865, 2008.
100. GUPTA, V.K.; ALI, I. & SAINI, V.K., "Removal of chlorophenols from wastewater using red mud: An aluminum industry waste". *Environ. Sci. Technol.* **38**(14): 4012, 2004.
101. NOWAK, A. & LIBUDZISZ, Z., "Influence of phenol, p-cresol and indole on growth and survival of intestinal lactic acid bacteria". *Anaerobe.* **12**(2): 80, 2006.
102. SELASSIE, C.D.; DESOYZA, T.V.; ROSARIO, M.; GAO, H. & HANSCH, C., "Phenol toxicity in leukemia cells: a radical process?". *Chem.-Biol. Interact.* **113**(3): 175, 1998.
103. LUPETTI, K.O.; VIEIRA, L.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Jack fruit-capric acid biosensor for total phenols determination in wastewaters". *Anal. Lett.* **37**(9): 1833, 2004.

104. VIEIRA, I.D. & FATIBELLO, O., "Amperometric biosensor for the determination of phenols using a crude extract of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) Lam)". *Anal. Lett.* **30**(5): 895, 1997.
105. MOGHADDAM, A.B.; GANJALI, M.R.; SABOURY, A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A. & NOROUZI, P., "Electrodeposition of nickel oxide nanoparticles on glassy carbon surfaces: application to the direct electron transfer of tyrosinase". *J. Appl. Electrochem.* **38**(9): 1233, 2008.
106. MOHAMMADI, A.; MOGHADDAM, A.B.; DINARVAND, R. & REZAEI-ZARCHI, S., "Direct Electron Transfer of Polyphenol Oxidase on Carbon Nanotube Surfaces: Application in Biosensing". *International Journal of Electrochemical Science.* **4**(7): 895, 2009.
107. YE, B.X. & ZHOU, X.Y., "Direct electrochemical redox of tyrosinase at silver electrodes". *Talanta.* **44**(5): 831, 1997.
108. HALL, G.F.; BEST, D.J. & TURNER, A.P.F., "The determination of p-cresol in chloroform with an enzyme electrode used in the organic-phase". *Anal. Chim. Acta.* **213**(1-2): 113, 1988.
109. LIU, S.Q.; YU, J.H. & JU, H.X., "Renewable phenol biosensor based on a tyrosinase-colloidal gold modified carbon paste electrode". *J. Electroanal. Chem.* **540**: 61, 2003.
110. APETREI, C.; RODRIGUEZ-MENDEZ, M.L. & DE SAJA, J.A., "Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized phosphate-doped polypyrrole film as an immobilization support. Application for detection of phenolic compounds". *Electrochim. Acta.* **56**(24): 8919, 2011.
111. MANG, J.; LEI, J.; LIU, Y.; ZHAO, J. & JU, H., "Highly sensitive amperometric biosensors for phenols based on polyaniline-ionic liquid-carbon nanofiber composite". *Biosens. Bioelectron.* **24**(7): 1858, 2009.
112. ONNERFJORD, P.; EMNEUS, J.; MARKOVARGA, G.; GORTON, L.; ORTEGA, F. & DOMINGUEZ, E., "Tyrosinase graphite-epoxy based composite electrodes for detection of phenols". *Biosens. Bioelectron.* **10**(6-7): 607, 1995.
113. WANG, J.; FANG, L. & LOPEZ, D., "Amperometric biosensor for phenols based on a tyrosinase graphite-epoxy biocomposite". *Analyst.* **119**(3): 455, 1994.
114. LU, L.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; HUAN, S.; SHEN, G. & YU, R., "A novel tyrosinase biosensor based on hydroxyapatite-chitosan nanocomposite for the detection of phenolic compounds". *Anal. Chim. Acta.* **665**(2): 146, 2010.
115. FIORENTINO, D.; GALLONE, A.; FIOCCO, D.; PALAZZO, G. & MALLARDI, A., "Mushroom tyrosinase in polyelectrolyte multilayers as an optical biosensor for o-diphenols". *Biosens. Bioelectron.* **25**(9): 2033, 2010.
116. ZHOU, Y. & ZHI, J., "Development of an amperometric biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase on a boron-doped diamond electrode". *Electrochem. Commun.* **8**(12): 1811, 2006.
117. KOCHANA, J.; GALA, A.; PARCZEWSKI, A. & ADAMSKI, J., "Titania sol-gel-derived tyrosinase-based amperometric biosensor for determination of phenolic compounds in water samples. Examination of interference effects". *Anal. Bioanal. Chem.* **391**(4): 1275, 2008.

118. ZEJLI, H.; DE CISNEROS, J.L.H.-H.; NARANJO-RODRIGUEZ, I.; LIU, B.; TEMSAMANI, K.R. & MARTY, J.L., "Phenol biosensor based on Sonogel-Carbon transducer with tyrosinase alumina sol-gel immobilization". *Anal. Chim. Acta.* **612**(2): 198, 2008.
119. S.S. ROSATTO; R.S. FREIRE; N. DURÁN & KUBOTA, L.T., "Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental". *Quim. Nova.* **24**(1): 77, 2001.
120. SOARES, C.R.J.; CAMARGO, I.M.C.; MORGANTI, L.; GIMBO, E.; OLIVEIRA, J.E.; LEGOUX, R.; FERRARA, P. & BARTOLINI, P., "Reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of prolactin in bacterial extracts and in its purified form". *J. Chromatogr. A.* **955**(2): 229, 2002.
121. GREGERSON, K.A., *Prolactin: Structure, function and regulation of secretion*, in: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3rd ed. 2006, New York: J.D.Neill.
122. MONDAL, M.; RAJKHOWA, C. & PRAKASH, B.S., "Development and validation of a highly sensitive economic enzymeimmunoassay for prolactin determination in blood plasma of mithun (*Bos frontalis*) and its application during milk let down and cyclicity". *Anim. Reprod. Sci.* **99**(1-2): 182, 2007.
123. ROY, K.S. & PRAKASH, B.S., "Development and validation of a simple, sensitive enzyme immunoassay (EIA) for quantification of prolactin in buffalo plasma". *Theriogenology.* **67**(3): 572, 2007.
124. PETROU, P.S.; KAKABAKOS, S.E.; CHRISTOFIDIS, I.; ARGITIS, P. & MISIAKOS, K., "Multi-analyte capillary immunosensor for the determination of hormones in human serum samples". *Biosens. Bioelectron.* **17**(4): 261, 2002.
125. MARTÍNEZ-CALATAYUD, J., *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals*. 1996, London: Taylor & Francis.
126. TZANAVARAS, P.D.; THEMELIS, D.G.; ECONOMOU, A. & THEODORIDIS, G., "Flow and sequential injection manifolds for the spectrophotometric determination of captopril based on its oxidation by Fe(III)". *Microchimica Acta.* **142**(1-2): 55, 2003.
127. MARCOLINO-JÚNIOR, L.H.; BERGAMINI, M.F.; TEIXEIRA, M.F.S.; CAVALHEIRO, É.T.G. & FATIBELLO-FILHO, O., "Flow injection amperometric determination of dipyrone in pharmaceutical formulations using a carbon paste electrode". *Il Farmaco.* **58**(10): 999, 2003.
128. GAIAO, E.D.; DOS SANTOS, S.R.B.; DOS SANTOS, V.B.; DO NASCIMENTO, E.C.L.; LIMA, R.S. & DE ARAUJO, M.C.U., "An inexpensive, portable and microcontrolled near infrared LED-photometer for screening analysis of gasoline". *Talanta.* **75**(3): 792, 2008.
129. LIMA, R.S.; DOS SANTOS, V.B.; GUERREIRO, T.B.; DE ARAUJO, M.C.U. & GAIAO, E.D., "A microcontrolled system for monitoring of pH, conductivity and temperature of water at on-line, in situ and remote way". *Quimica Nova.* **34**(1): 135, 2011.
130. PALMA, A.J.; LOPEZ-GONZALEZ, J.; ASENSIO, L.J.; FERNANDEZ-RAMOS, M.D. & CAPITAN-VALLVEY, L.F., "Microcontroller-based portable instrument for stabilised optical oxygen sensor". *Sens. Actuator B-Chem.* **121**(2): 629, 2007.

131. BERG, R.; KONIGER, M.; SCHJEIDE, B.M.; DIKMAK, G.; KOHLER, S. & HARRIS, G.C., "A simple low-cost microcontroller-based photometric instrument for monitoring chloroplast movement". *Photosynth. Res.* **87**(3): 303, 2006.
132. FRANKOWIAK, M.R.; GROSVENOR, R.I. & PRICKETT, P.W., "A Petri-net based distributed monitoring system using PIC microcontrollers". *Microprocess. Microsyst.* **29**(5): 189, 2005.
133. JANEGITZ, B.C.; MARCOLINO-JUNIOR, L.H.; CAMPANA-FILHO, S.P.; FARIA, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Anodic stripping voltammetric determination of copper(II) using a functionalized carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan". *Sensors and Actuators B: Chemical.* **142**(1): 260, 2009.
134. LI, J.; HE, W.D.; YANG, L.P.; SUN, X.L. & HUA, Q., "Preparation of multi-walled carbon nanotubes grafted with synthetic poly(L-lysine) through surface-initiated ring-opening polymerization". *Polymer.* **48**(15): 4352, 2007.
135. KIM, B. & SIGMUND, W.M., "Functionalized multiwall carbon nanotube/gold nanoparticle composites". *Langmuir.* **20**(19): 8239, 2004.
136. KIM, Y.S.; CHO, J.H.; ANSARI, S.G.; KIM, H.I.; DAR, M.A.; SEO, H.K.; KIM, G.S.; LEE, D.S.; KHANG, G. & SHIN, H.S., "Immobilization of avidin on the functionalized carbon nanotubes". *Synthetic Metals.* **156**(14-15): 938, 2006.
137. JOURNET, C.; MASER, W.K.; BERNIER, P.; LOISEAU, A.; DELACHAPPELLE, M.L.; LEFRANT, S.; DENIARD, P.; LEE, R. & FISCHER, J.E., "Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique". *Nature.* **388**(6644): 756, 1997.
138. STAR, A.; STODDART, J.F.; STEUERMAN, D.; DIEHL, M.; BOUKAI, A.; WONG, E.W.; YANG, X.; CHUNG, S.W.; CHOI, H. & HEATH, J.R., "Preparation and properties of polymer-wrapped single-walled carbon nanotubes". *Angew. Chem.-Int. Edit.* **40**(9): 1721, 2001.
139. WANG, J.; MUSAMEH, M. & LIN, Y.H., "Solubilization of carbon nanotubes by Nafion toward the preparation of amperometric biosensors". *J. Am. Chem. Soc.* **125**(9): 2408, 2003.
140. BARD, A.J. & FAULKNER, L.R., *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2 ed. ed. 2001, New York: John Wiley & Sons.
141. WISSINK, M.J.B.; BEERNINK, R.; PIEPER, J.S.; POOT, A.A.; ENGBERS, G.H.M.; BEUGELING, T.; VAN AKEN, W.G. & FEIJEN, J., "Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and in vitro evaluation". *Biomaterials.* **22**(2): 151, 2001.
142. LAVIRON, E., "General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems". *J. Electroanal. Chem.* **101**(1): 19, 1979.
143. GUISEPPI-ELIE, A.; LEI, C.H. & BAUGHMAN, R.H., "Direct electron transfer of glucose oxidase on carbon nanotubes". *Nanotechnology.* **13**(5): 559, 2002.
144. ICH, *Validation of analytical procedures: text and methodology, GUIDELINE, I.H.T.* 2005.
145. PRICE, N.C. & STEVENS, L., *Fundamentals of enzymology*. 2nd ed. 1989, New York: Oxford University Press.

146. HU, F.; CHEN, S.; WANG, C.; YUAN, R.; CHAI, Y.; XIANG, Y. & WANG, C., "ZnO nanoparticle and multiwalled carbon nanotubes for glucose oxidase direct electron transfer and electrocatalytic activity investigation". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **72**(3–4): 298, 2011.
147. ZHAI, Y.; ZHAI, S.; CHEN, G.; ZHANG, K.; YUE, Q.; WANG, L.; LIU, J. & JIA, J., "Effects of morphology of nanostructured ZnO on direct electrochemistry and biosensing properties of glucose oxidase". *J. Electroanal. Chem.* **656**(1–2): 198, 2011.
148. CHU, X.; DUAN, D.; SHEN, G. & YU, R., "Amperometric glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto covalently immobilized carbon nanotube electrode". *Talanta*. **71**(5): 2040, 2007.
149. YANG, Z.; REN, Y.; ZHANG, Y.; LI, J.; LI, H.; HU, X.H.X. & XU, Q., "Nanoflake-like SnS₂ matrix for glucose biosensing based on direct electrochemistry of glucose oxidase". *Biosensors and Bioelectronics*. **26**(11): 4337, 2011.
150. SUN, Y.; BAI, Y.; YANG, W. & SUN, C., "Controlled multilayer films of sulfonate-capped gold nanoparticles/thionine used for construction of a reagentless bienzymatic glucose biosensor". *Electrochim. Acta*. **52**(25): 7352, 2007.
151. KANG, X.; WANG, J.; WU, H.; AKSAY, I.A.; LIU, J. & LIN, Y., "Glucose Oxidase–graphene–chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing". *Biosensors and Bioelectronics*. **25**(4): 901, 2009.
152. WU, B.-Y.; HOU, S.-H.; YIN, F.; ZHAO, Z.-X.; WANG, Y.-Y.; WANG, X.-S. & CHEN, Q., "Amperometric glucose biosensor based on multilayer films via layer-by-layer self-assembly of multi-wall carbon nanotubes, gold nanoparticles and glucose oxidase on the Pt electrode". *Biosensors and Bioelectronics*. **22**(12): 2854, 2007.
153. LI, F.H.; SONG, J.X.; LI, F.; WANG, X.D.; ZHANG, Q.X.; HAN, D.X.; IVASKA, A. & NIU, L., "Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on carbon nanotubes@SnO₂-Au composite". *Biosens. Bioelectron.* **25**(4): 883, 2009.
154. XUE, C.-H.; ZHOU, R.-J.; SHI, M.-M.; WU, G.; ZHANG, X.-B.; WANG, M. & CHEN, H.-Z., "Electrochemistry of glucose oxidase immobilized on carbon nanotubes noncovalently functionalized by multihydroxyl and multicarboxyl groups". *J. Electroanal. Chem.* **642**(1): 92, 2010.
155. LI, Y.; GAO, Y.; ZHOU, Y.; LIU, Y. & LIU, J., "Glucose oxidase–Tm₂O₃ nanoparticle-modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing". *J. Electroanal. Chem.* **642**(1): 1, 2010.
156. BUDEVSKI, E.; STAIKOV, G. & LORENZ, W.J., *Electrochemical Phase Formation and Growth-An Introduction to the Initial Stages of Metal Deposition*. 1996, Weinheim: VCH.
157. STAIKOV, G. & MILCHEV, A., *Electrocrystallization in Nanotechnology*. 2007 Weinheim: Wiley-VCH.
158. WALTER, E.C.; MURRAY, B.J.; FAVIER, F.; KALTENPOTH, G.; GRUNZE, M. & PENNER, R.M., "Noble and coinage metal nanowires by electrochemical step edge decoration". *J. Phys. Chem. B*. **106**(44): 11407, 2002.

159. KOMSIYSKA, L. & STAIKOV, G., "Electrocrystallization of Au nanoparticles on glassy carbon from HClO₄ solution containing [AuCl₄]⁻". *Electrochim. Acta.* **54**(2): 168, 2008.
160. SALAZAR-BANDA, G.R.; ANDRADE, L.S.; NASCENTE, P.A.P.; PIZANI, P.S.; ROCHA, R.C. & AVACA, L.A., "On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments". *Electrochim. Acta.* **51**(22): 4612, 2006.
161. DONG, W.J.; DONG, C.; SHUANG, S.M. & CHOI, M.M.F., "Near-infrared luminescence quenching method for the detection of phenolic compounds using N-acetyl-L-cystein-protected gold nanoparticles-tyrosinase hybrid material". *Biosensors & Bioelectronics.* **25**(5): 1043, 2010.
162. CHIKAE, M.; IDEGAMI, K.; KERMAN, K.; NAGATANI, N.; ISHIKAWA, M.; TAKAMURA, Y. & TAMIYA, E., "Direct fabrication of catalytic metal nanoparticles onto the surface of a screen-printed carbon electrode". *Electrochem. Commun.* **8**(8): 1375, 2006.
163. JANEGITZ, B.C.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Direct electrochemistry of tyrosinase and biosensing for phenol based on gold nanoparticles electrodeposited on a boron-doped diamond electrode". *Diamond and Related Materials.* **25**(0): 128, 2012.
164. SANZ, V.C.; MENA, M.L.; GONZALEZ-CORTES, A.; YANEZ-SEDENO, P. & PINGARRON, J.M., "Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes - Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines". *Anal. Chim. Acta.* **528**(1): 1, 2005.
165. 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, 2008.
166. CAMPUZANO, S.; SERRA, B.; PEDRERO, M.; DE VILLENA, F.J.M. & PINGARRON, J.M., "Amperometric flow-injection determination of phenolic compounds at self-assembled monolayer-based tyrosinase biosensors". *Anal. Chim. Acta.* **494**(1-2): 187, 2003.
167. ZHAO, Q.; GUAN, L.H.; GU, Z.N. & ZHUANG, Q.K., "Determination of phenolic compounds based on the tyrosinase-single walled carbon nanotubes sensor". *Electroanalysis.* **17**(1): 85, 2005.
168. LI, Y.F.; LIU, Z.M.; LIU, Y.L.; YANG, Y.H.; SHEN, G.L. & YU, R.Q., "A mediator-free phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to ZnO nanoparticles". *Analytical Biochemistry.* **349**(1): 33, 2006.
169. ZHANG, J.; LEI, J.; LIU, Y.; ZHAO, J. & JU, H., "Highly sensitive amperometric biosensors for phenols based on polyaniline-ionic liquid-carbon nanofiber composite". *Biosensors and Bioelectronics.* **24**(7): 1858, 2009.
170. ANDERSON, R.L., *Practical statistics for analytical chemists.* . 1987, New York: Van Nostrand Reinhold.
171. ITO, S.; YAMAZAKI, S.-I.; KANO, K. & IKEDA, T., "Highly sensitive electrochemical detection of alkaline phosphatase". *Anal. Chim. Acta.* **424**(1): 57, 2000.
172. MARTINEZ-PAREDES, G.; GONZALEZ-GARCIA, M.B. & COSTA-GARCIA, A., "In situ electrochemical generation of gold nanostructured

- screen-printed carbon electrodes. Application to the detection of lead underpotential deposition". *Electrochim. Acta.* **54**(21): 4801, 2009.
173. SOUSA, S.C.A. & REBELO, M.J.F., "Acetylcholinesterase – Choline Oxidase Biosensor for Pirimicarb Determination". *Portugaliae Electrochimica Acta* **26**(1): 65, 2008.
174. POHANKA, M.; JUN, D. & KUČA, K., "Amperometric Biosensors for Real Time Assays of Organophosphates". *Sensors.* **8**(9): 5303, 2008.