

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

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES À BASE DE
FILMES POLIMÉRICOS, NANOTUBOS DE CARBONO E
NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Fernando Campanhã Vicentini*

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 CNPq

**São Carlos - SP
2013**

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

V633db

Vicentini, Fernando Campanhã.

Desenvolvimento de biossensores à base de filmes poliméricos, nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro / Fernando Campanhã Vicentini. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

112 f.

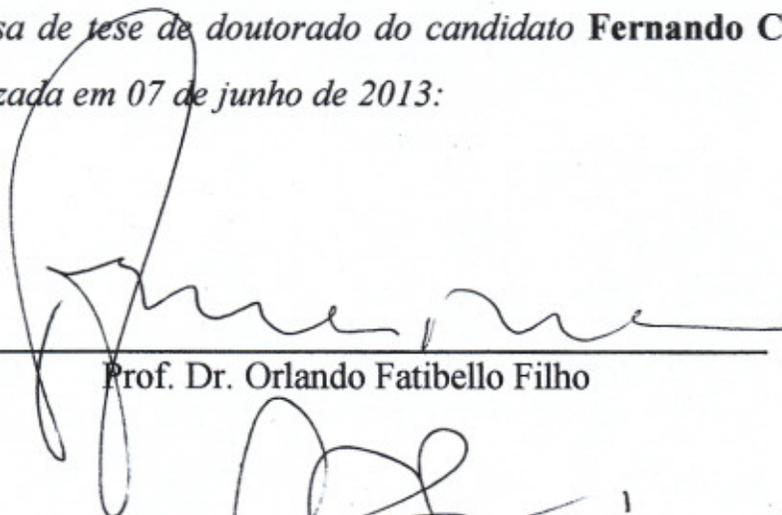
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

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

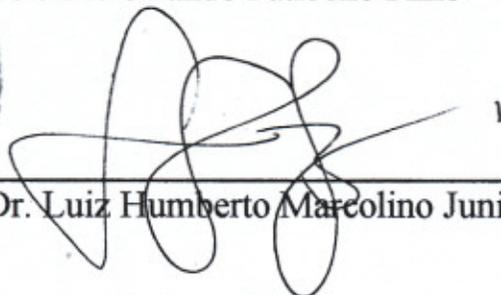
CDD: 543 (20^a)

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

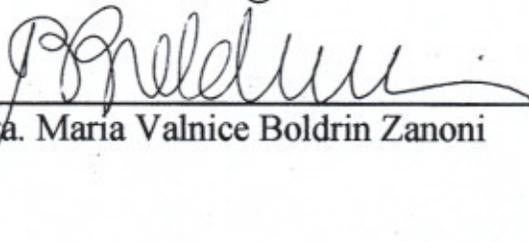
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado do candidato **Fernando Campanhã Vicentini**, realizada em 07 de junho de 2013:*



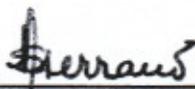
Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho



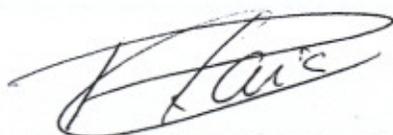
Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Junior



Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni



Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano



Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

"A ciência sem a religião é manca, a religião sem a ciência é cega"

Albert Einstein

Dedico este trabalho

*Aos meus grandes amores Alice e Cássia,
meus pais Luiz Gonzaga e Alda Maria, meus irmãos
Josy, Marcelo, Renata, Luiza e Luiz Gonzaga
pelo carinho, incentivo e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida;

À pequena Alice por muitas alegrias dos últimos anos;

À Cássia pelo amor, carinho e pela paciência durante esses anos;

Aos meus pais e irmãos pelo apoio, amor e carinho;

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho, pela oportunidade, orientação, incentivo, confiança, por todas as discussões científicas e amizade durante esses anos;

Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria e à Prof. Dra. Ivani Aparecida Carlos pelas discussões e sugestões durante a qualificação;

Ao Dr. Bruno Campos Janegitz pela colaboração, discussão dos trabalhos e assuntos voltados ao mundo esportivo, pela amizade;

Ao Prof. Dr. Christopher M. A. Brett, pelas discussões e contribuição;

À Prof. Dra. Élen Sartori pela colaboração e discussão dos trabalhos;

Ao MSc. Luiz Fernando Gorup pelo auxílio na síntese das AuNPs;

Ao Dr. Geiser Gabriel de Oliveira, pelas discussões e contribuições durante esses anos, pela amizade;

Às alunas de IC Amanda e Lívia, pelo aprendizado e auxílio nos experimentos;

Aos Profs. Drs. Silvia Helena Pires Serrano, Luiz Humberto Marcolino Junior, Maria Valnice Boldrin e Ronaldo Censi Faria pela colaboração, sugestões e discussões durante a banca de defesa.

A todos do LABBES/LABIE: Aline, André, Bruna, Cyber, Elson, Fred, Jorge, Lilo, Loriz, Luzia, Marcão, Mariele, Marina, Natália, Osmundo, Paola, Patrícia, Roberta, Tiago Almeida, Tiago Guerreiro e Vagner, pela convivência diária, companheirismo e discussões científicas;

Aos professores do DQ-UFSCar, pelos ensinamentos transmitidos e experiências de vida;

A todos que me apoiaram e de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho;

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 pela bolsa de estudo concedida.

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC – Associação Oficial de Química Analítica (*Association Official Analytical Chemistry*)

AgNPs – Nanopartículas de prata (*Silver nanoparticles*)

AuNPs – Nanopartículas de ouro (*Gold nanoparticles*)

BDD – Diamante dopado com boro (*Boron-doped diamond*)

BMIM – 1-butil-3-metil-imidazol

CTAB – Brometo de acetil trimetilamônio (*Cetyl trimethylammonium bromide*)

CV – Voltametria cíclica (*Cyclic voltammetry*)

CVD – Deposição química em fase vapor (*Chemical vapor deposition*)

DHP – Dihexadecil hidrogenofosfato (*Dihexadecyl hydrogen phosphate*)

DPV – Voltametria de pulso diferencial (*Differential pulse voltammetry*)

E° – Potencial formal

EDC – 1Etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida

EMs – Eletrodos modificados

E_{pa} – Potencial de pico anódico

E_{pc} – Potencial de pico catódico

GA – Glutaraldeído

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

GOx – Glicose oxidase

IL – Líquido iônico (*Ionic liquid*)

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

LD – Limite de detecção

LSV – Voltametria de varredura linear (*Linear sweep voltammetry*)

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MWCNTs – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (*Multi-walled carbon nanotubes*)

NHS – N-hidroxisuccinimida

NPs – Nanopartículas metálicas (*Nanoparticles*)

PAH – Hidrocloreto de polialilamina (*Poly(allylamine hydrochloride)*)

PPO – Polifenol oxidase (*Polyphenol oxidase*)

rpm – Rotações por minuto

RSD – Desvio padrão relativo (*Relative standard deviation*)

SOx – Sulfito oxidase

SWCNTs – Nanotubos de carbono de paredes simples (*Single-walled carbon nanotubes*)

Tyr – Tirosinase (*Tyrosinase*)

Urs – Urease

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Cátions e ânions mais utilizados na formação de ILs	20
TABELA 1.2 – Limites máximos permitidos para adição de agentes sulfitantes em bebidas, conforme legislação brasileira vigente ¹³³	27
TABELA 3.1 – Área eletroativa de diferentes eletrodos em meio de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte	38
TABELA 3.2 – Comparação entre as técnicas utilizadas na determinação de catecol empregando o biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE	50
TABELA 3.3 – Comparação dos parâmetros analíticos obtidos usando diferentes biossensores de tirosinase para determinação de catecol	52
TABELA 3.4 – Valores de K_M^{app} para diferentes biossensores de Tyr empregados na determinação de catecol	54
TABELA 3.5 – Determinação de catecol em amostras de água por LSV usando o biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE e pelo método espectrofotométrico de referência ¹¹⁹	56
TABELA 4.1 – Área eletroativa de diferentes eletrodos em meio de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte	65
TABELA 4.2 – Comparação dos parâmetros analíticos obtidos usando diferentes biossensores de tirosinase para determinação de catecol	72
TABELA 4.3 – Valores de K_M^{app} para diferentes biossensores de Tyr empregados na determinação de catecol	74
TABELA 4.4 – Determinação de catecol em amostras de água por amperometria usando o biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE e pelo método espectrofotométrico de referência ¹¹⁹	76
TABELA 5.1 – Área eletroativa de diferentes eletrodos em meio de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte	85

TABELA 5.2 – Comparação dos parâmetros analíticos obtidos usando diferentes biossensores para a determinação de sulfito94

TABELA 5.3 – Determinação de sulfito em amostras de vinho por DPV usando o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE e pelo método iodométrico de referência¹³⁶96

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Esquema de funcionamento e componentes básicos de um biossensor, sendo 1: analito; 2: material biológico; 3: transdutor e 4: processador de sinal.....	2
FIGURA 1.2 – Esquema de funcionamento de um biossensor de primeira geração. .4	
FIGURA 1.3 – Esquema de funcionamento de um biossensor de segunda geração. M_{ox} : Mediador oxidado, M_{red} : Mediador reduzido.	5
FIGURA 1.4 – Esquema de funcionamento de um biossensor de terceira geração. CA_{ox} : Centro ativo oxidado, CA_{red} : Centro ativo reduzido.....	6
FIGURA 1.5 – Representação esquemática das principais formas de CNTs: (A) SWCNTs e (B) MWCNTs.	9
FIGURA 1.6 – Esquema da representação dos vetores unitários (\vec{a}_1) e (\vec{a}_2), vetor quiral (\vec{C}_h) e vetor de translação (\vec{T}) sobre uma folha de grafeno. Figura retirada da dissertação de QUINTERO ²⁷	11
FIGURA 1.7 – Representação de SWCNTs exibindo diferentes quiralidades: (A) zig-zag ($\theta = 30^\circ$), (B) armchair ($\theta = 0^\circ$) e (C) quiral ($0^\circ < \theta < 30^\circ$).	11
FIGURA 1.8 – Representação da incorporação dos grupos funcionais nos CNTs, pelo tratamento químico com mistura de ácidos HNO_3 e H_2SO_4 . Figura adaptada da dissertação de QUINTERO ²⁷	14
FIGURA 1.9 – Representação esquemática das rotas de síntese Top down e Botton up na obtenção de NPs.....	15
FIGURA 1.10 – (A) Estrutura molecular do DHP. (B) Possível forma polimerizada do DHP após evaporação do solvente (água).....	18
FIGURA 1.11 – Estrutura molecular do PAH.....	18
FIGURA 1.12 – Interação entre o polímero PVP e substratos fenólicos naturais por ligações de hidrogênio.	23

FIGURA 1.13 – Distribuição das espécies ionizadas de dióxido de enxofre com o pH.	26
FIGURA 3.1 – Esquema da reação entre BMIM, EDC e NHS com MWCNTs e a enzima Tyr, na preparação do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE.....	35
FIGURA 3.2 – Imagens de frascos contendo MWCNTs 1 mg mL ⁻¹ dispersos em água (A), solução de DHP 1 mg mL ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) (B) e MWCNTs 1 mg mL ⁻¹ dispersos em solução de DHP 1 mg mL ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) (C), levados ao ultrassom durante 30 minutos e após repouso de dez minutos.	37
FIGURA 3.3 – Voltamogramas cíclicos, após subtração do branco, para os eletrodos GCE (–), DHP/GCE (–), BMIM-DHP/GCE (–), MWCNTs-DHP/GCE (–) e BMIM-MWCNTs-DHP/GCE (–) para uma solução de [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 1,0 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$	39
FIGURA 3.4 – Efeito da concentração de BMIM (mg mL ⁻¹) utilizada no filme em relação ao sinal analítico.	40
FIGURA 3.5 – Voltamogramas cíclicos obtidos, após subtração do branco, para o eletrodo BMIM-MWCNTs-DHP/GCE, na presença de [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 1,0 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$	41
FIGURA 3.6 – Imagens obtidas por MEV da superfície do: (A) BMIM-MWCNTs-DHP/GCE e (B) Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE.	42
FIGURA 3.7 – Voltamogramas cíclicos, após subtração do branco, do biossensor Tyr-MWCNTs-DHP/GCE (–), do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE (–) e do sensor BMIM-MWCNTs-DHP/GCE (–) após 30 ciclos, na presença de catecol 1,0 × 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ e tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) como eletrólito suporte e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$	43
FIGURA 3.8 – CVs, após subtração do branco, do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE em várias velocidades de varredura de 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 e 200 mV s ⁻¹ , na presença de catecol 1,0 × 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ e tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0). Inserido: Correntes de pico anódica e catódica versus a velocidade de varredura.	45

- FIGURA 3.9 – ΔE_p versus logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$). Inserido: Potenciais de pico (E_p) anódico e catódico versus logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$).45
- FIGURA 3.10 – CVs do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE em presença de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pHs de 5,5 até 8,0. Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} . Inserido: (A) Influência do pH na corrente de pico catódica. (B) Dependência do E^{O_i} versus pH.46
- FIGURA 3.11 – Representação esquemática da redução da *o*-quinona produzida na reação enzimática catalisada pela enzima Tyr na presença de oxigênio no biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE. Oxid: forma oxidada e Red: forma reduzida.47
- FIGURA 3.12 – Voltamogramas de varredura linear obtidos com o biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo diferentes concentrações de catecol: (a) $4,9 \times 10^{-6}$, (b) $2,2 \times 10^{-5}$, (c) $4,7 \times 10^{-5}$, (d) $9,8 \times 10^{-5}$, (e) $2,4 \times 10^{-4}$, (f) $4,7 \times 10^{-4}$, (g) $6,9 \times 10^{-4}$, (h) $9,0 \times 10^{-4}$ e (i) $1,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Inserido: Curva analítica obtida para o catecol.48
- FIGURA 3.13 – Voltamogramas de pulso diferencial, obtidos com o biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo diferentes concentrações de catecol: (a) $5,1 \times 10^{-6}$, (b) $7,6 \times 10^{-6}$, (c) $1,0 \times 10^{-5}$, (d) $2,3 \times 10^{-5}$, (e) $3,5 \times 10^{-5}$, (f) $4,8 \times 10^{-5}$, (g) $6,1 \times 10^{-5}$, (h) $7,3 \times 10^{-5}$, (i) $8,6 \times 10^{-5}$ e (j) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Inserido: Curva analítica obtida para catecol.50
- FIGURA 4.1 – Imagem de um frasco contendo uma dispersão coloidal de nanopartículas de ouro.....61
- FIGURA 4.2 – Representação esquemática da preparação do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE.....62
- FIGURA 4.3 – Imagens de frascos contendo dispersão coloidal de AuNPs (A), solução de DHP 1 mg mL^{-1} em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) (B) e 1 mL de dispersão coloidal de AuNPs em suspensão de DHP 1 mg mL^{-1} (C), levados ao ultrassom durante 2 h e após repouso de dez minutos.63

- FIGURA 4.4 – Imagens obtidas por MEV da superfície do: (A) GCE e do (B) GCE modificado com AuNPs.64
- FIGURA 4.5 – Voltamograma cíclico do AuNPs-DHP/GCE em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}65
- FIGURA 4.6 – Voltamogramas cíclicos, após subtração do branco, para os eletrodos GCE (–), DHP/GCE (–) e AuNPs-DHP/GCE (–) para uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$66
- FIGURA 4.7 – Voltamogramas cíclicos, após subtração do branco, do AuNPs-DHP/GCE (–) e do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE (–) em presença de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) como eletrólito suporte e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}67
- FIGURA 4.8 – CVs, após subtração do branco, do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE em várias velocidades de varredura de 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 e 200 mV s^{-1} e na presença de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Inserido: Corrente de pico catódica vs. a velocidade de varredura.68
- FIGURA 4.9 – CVs do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE na presença de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pHs de 5,0 à 7,0. Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} . Inserido: (A) Influência do pH sobre a corrente de pico catódica de catecol. (B) Dependência do E_{pc} vs. pH.69
- FIGURA 4.10 – Estudo da influência do potencial aplicado na redução de catecol na superfície do Tyr-AuNPs-DHP/GCE. Concentração de catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0.70
- FIGURA 4.11 – Amperograma obtido com o biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0), $E_c = -0,10 \text{ V}$, para diferentes concentrações de catecol: $2,5 \times 10^{-6}$ (1), $3,7 \times 10^{-6}$ (2), $5,0 \times 10^{-6}$ (3), $6,2 \times 10^{-6}$ (4), $7,4 \times 10^{-6}$ (5), $1,5 \times 10^{-5}$ (6), $2,2 \times 10^{-5}$ (7), $2,9 \times 10^{-5}$ (8), $3,6 \times 10^{-5}$ (9), $4,3 \times 10^{-5}$ (10), $5,0 \times 10^{-5}$ (11), $5,7 \times 10^{-5}$ (12), $6,3 \times 10^{-5}$ (13), $7,0 \times 10^{-5}$ (14), $7,6 \times 10^{-5}$ (15), $8,3 \times 10^{-5}$ (16), $8,8 \times 10^{-5}$ (17) e $9,5 \times 10^{-5}$ (18) mol L^{-1} . Velocidade de agitação da solução: 1100 rpm. Inserida: Curva analítica obtida para o catecol.71

- FIGURA 5.1 – Representação esquemática da preparação do biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE.81
- FIGURA 5.2 – Imagens obtidas por MEV da superfície do: (a) GCE , (b) AuNPs-PAH/GCE e (c) AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE.83
- FIGURA 5.3 – Voltamograma cíclico do AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} , com $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 84
- FIGURA 5.4 – Voltamogramas cíclicos, após subtração do branco, para catecol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,5) empregando-se GCE (–), PAH/GCE (–), AuNPs-PAH/GCE (–) e AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE (–), com velocidade de varredura: 100 mV s^{-1}86
- FIGURA 5.5 – Voltamogramas cíclicos, após subtração do branco, do PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE (–) e AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE (–) na presença de catecol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,5) como eletrólito suporte e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}88
- FIGURA 5.6 – Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE, em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,5) (–); catecol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,5) (–) e na presença de sulfito $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (–); $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (–); $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (–) e $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (–) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,5) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}89
- FIGURA 5.7 – Representação esquemática da reação enzimática entre catecol, o-quinona, enzima PPO e o sulfito no biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE. Oxid: forma oxidada e Red: forma reduzida. Figura adaptada da tese de VIEIRA¹⁷³.90
- FIGURA 5.8 – Efeito do pH na resposta analítica de catecol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} com o pH, empregando-se o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE, com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} 91
- FIGURA 5.9 – Voltamogramas de pulso diferencial, obtidos com o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) contendo catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (a) e diferentes concentrações de sulfito: $5,0 \times 10^{-7}$ (b),

$1,0 \times 10^{-6}$ (c), $2,0 \times 10^{-6}$ (d), $4,0 \times 10^{-6}$ (e), $6,0 \times 10^{-6}$ (f), $8,0 \times 10^{-6}$ (g), $1,0 \times 10^{-5}$ (h), $1,2 \times 10^{-5}$ (i), $1,5 \times 10^{-5}$ (j), $1,7 \times 10^{-5}$ (k), $2,0 \times 10^{-5}$ (l) e $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (m).

Inserida: Curva analítica obtida para sulfito.....93

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSORES À BASE DE FILMES POLIMÉRICOS, NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO

Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento de novas arquiteturas para biossensores utilizando materiais nanoestruturados. A enzima de interesse foi imobilizada sobre um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas tratados quimicamente e/ou nanopartículas de ouro em filme de dihexadecil hidrogenofosfato ou hidrocloreto de poli(alilamina). Inicialmente, foi proposto um eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) funcionalizados, cloreto de 1-butil-3-metil-imidazol (BMIM) e tirosinase (Tyr) em filme de dihexadecil hidrogenofosfato (DHP) para o desenvolvimento de um novo biossensor. Os MWCNTs, BMIM e Tyr foram eficientemente imobilizados no filme usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxisuccinimida, como agentes de reticulação. A caracterização do filme foi feita por voltametria cíclica (CV) em presença de catecol. O nanocompósito BMIM-MWCNTs exibiu boa condutividade e biocompatibilidade com a enzima Tyr, uma vez que o biossensor mostrou atividade biocatalítica para a oxidação de catecol a o-quinona, que foi reduzida eletroquimicamente para catecol em um potencial de 0,04 V. O biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE apresentou ampla faixa linear, boa repetibilidade, sensibilidade e estabilidade sendo aplicado com sucesso na determinação de catecol em amostras de águas naturais. O segundo biossensor desenvolvido, baseou-se na modificação de um GCE com nanopartículas de ouro (AuNPs) e Tyr em filme de DHP. A imobilização enzimática foi realizada utilizando-se cistamina e glutaraldeído como agentes de reticulação. A técnica amperométrica foi utilizada para obtenção da curva analítica que apresentou uma faixa linear na concentração de catecol de $2,49 \times 10^{-6}$ a $9,50 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $1,74 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE foi aplicado na determinação de catecol em amostras de águas naturais, da represa da UFSCar. Os resultados foram concordantes quando comparados com as concentrações obtidas empregando-se um método espectrofotométrico de referência em um nível de confiança de 95%. Por fim, foi proposta a modificação de um GCE com MWCNTs e AuNPs em filme de

hidroclorato de poli(alilamina) (PAH) para o desenvolvimento de um biossensor. Esta abordagem proporcionou um método eficiente usado para imobilizar a enzima polifenol oxidase (PPO), obtida a partir do extrato bruto de batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). O princípio do método analítico baseia-se na inibição da atividade da PPO pelo sulfito, na reação de redução da *o*-quinona para catecol e/ou na reação entre *o*-quinona e sulfito. Empregando-se as melhores variáveis experimentais para a técnica de voltametria de pulso diferencial, a curva analítica obtida foi linear no intervalo de concentração de sulfito de $5,0 \times 10^{-7}$ a $2,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $4,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O biossensor foi aplicado com sucesso na determinação de sulfito em amostras de vinho branco e tinto com resultados satisfatórios em comparação com um método iodométrico de referência em um nível de confiança de 95%.

ABSTRACT

BIOSENSORS DEVELOPMENT BASED ON POLYMERIC FILMS, CARBON NANOTUBES AND GOLD NANOPARTICLES

In this work was described the development of new architectures for biosensors, using nanomaterials. The enzyme of interest was immobilized on glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes chemically treated and/or gold nanoparticles within a dihexadecylphosphate or poly(allylamine hydrochloride) film. Initially, a glassy carbon electrode (GCE) modified with functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), 1-butyl-3-methylimidazolium chloride (BMIM) and tyrosinase (Tyr) within a dihexadecylphosphate (DHP) film for the development of a biosensor was proposed. MWCNTs, BMIM and Tyr were efficiently immobilized in the film using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/N-hydroxysuccinimide as crosslinking agents. The film characterization was realized by cyclic voltammetry (CV) in presence of catechol. The BMIM-MWCNTs nanocomposite showed good conductivity and biocompatibility with Tyr enzyme, once that the biosensor presented biocatalytic activity to the oxidation of catechol to *o*-quinone which was electrochemically reduced to catechol at a potential of 0.04 V. The Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE biosensor showed wide linear range, good repeatability, sensitivity and stability and, the biosensor was successfully applied in the determination of catechol in natural water samples. The second developed biosensor was based on the modification of a GCE with gold nanoparticles (AuNPs) and Tyr within a DHP film. The enzyme immobilization was performed using cystamine and glutaraldehyde as crosslinking agents. Amperometry technique was used to obtain the analytical curve that showed linear in the concentration of catechol in the range from 2.49×10^{-6} to 9.50×10^{-5} mol L⁻¹ with a detection limit of 1.74×10^{-7} mol L⁻¹. The Tyr-AuNPs-DHP/GCE biosensor was applied in the determination of catechol in water samples from the UFSCar Dam. The results were satisfactory when compared with a spectrophotometric method at a 95% confidence level. Finally, the modification of a GCE with MWCNTs and AuNPs within a poly(allylamine hydrochloride) (PAH) film for the development of a novel biosensor was proposed. This approach provided an efficient method used to immobilize polyphenol oxidase (PPO) obtained from the crude extract of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). The principle of the

analytical method is based on the inhibitory effect of sulfite on the activity of PPO, in the reduction reaction of *o*-quinone to catechol and/or the reaction of *o*-quinone with sulfite. Under the optimum experimental conditions using the differential pulse voltammetry technique, the analytical curve obtained was linear in the concentration range of sulfite from 5.0×10^{-7} to 2.2×10^{-5} mol L⁻¹ with a detection limit of 4.0×10^{-7} mol L⁻¹. The biosensor was successfully applied in the determination of sulfite in white and red wine samples with results in close agreement with those results obtained using a reference iodometric method at a 95% confidence level.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	Biossensores	2
1.2	Classificação dos biossensores	3
1.2.1	Biossensores de primeira geração	4
1.2.2	Biossensores de segunda geração	4
1.2.3	Biossensores de terceira geração	6
1.3	Métodos de imobilização enzimática	6
1.3.1	Adsorção física	7
1.3.2	Oclusão em gel.....	7
1.3.3	Microencapsulação.....	7
1.3.4	Ligação covalente em suportes	8
1.3.5	Ligação covalente cruzada	8
1.4	Nanotubos de Carbono.....	9
1.4.1	Síntese dos nanotubos de carbono	12
1.4.2	Tratamento dos nanotubos de carbono	13
1.5	Nanopartículas metálicas.....	15
1.6	Dihexadecil hidrogenofosfato.....	17
1.7	Hidrocloreto de polialilamina (PAH)	18
1.8	Líquidos iônicos	19
1.9	Tirosinase	21
1.10	Compostos fenólicos	24
1.11	Sulfito.....	25
2	OBJETIVOS.....	30
3	Biossensor de tirosinase baseado em um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono, 1-butil-3-metil-imidazol e dihexadecil hidrogenofosfato para a determinação de catecol	32
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3.2	PARTE EXPERIMENTAL	32
3.2.1	Reagentes	32
3.2.2	Medidas eletroanalíticas	32
3.2.3	Célula eletroquímica.....	33
3.2.4	Eletrodos	33
3.2.5	Morfologia.....	33

3.2.6	Funcionalização dos nanotubos de carbono (tratamento ácido)	33
3.2.7	Preparação do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE	34
3.2.8	Preparação das amostras de água fortificadas	35
3.2.9	Método de referência	36
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.3.1	Teste de dispersão	36
3.3.2	Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado BMIM-MWCNTs-DHP/GCE	37
3.3.3	Efeito da concentração de BMIM	39
3.3.4	Caracterização eletroquímica do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE	41
3.3.5	Efeito da velocidade de varredura	43
3.3.6	Efeito do pH	46
3.3.7	Determinação de catecol por voltametria de varredura linear	47
3.3.8	Determinação de catecol por voltametria de pulso diferencial	48
3.3.9	Efeito de interferentes em potencial	55
3.3.10	Aplicação do método proposto na determinação de catecol em amostras de águas naturais	55
3.4	CONCLUSÕES	56
4	Biossensor de tirosinase baseado em um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro e dihexadecil hidrogenofosfato para a determinação de catecol	59
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
4.2	PARTE EXPERIMENTAL	59
4.2.1	Reagentes	59
4.2.2	Medidas eletroanalíticas	59
4.2.3	Célula eletroquímica	60
4.2.4	Eletrodos	60
4.2.5	Morfologia	60
4.2.6	Síntese das nanopartículas de ouro	60
4.2.7	Preparação do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE	61
4.2.8	Preparação das amostras de água fortificadas	62
4.2.9	Método de referência	62
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.3.1	Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado AuNPs-DHP/GCE ..	63

4.3.2	Caracterização eletroquímica do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE.....	66
4.3.3	Efeito da velocidade de varredura	68
4.3.4	Efeito do pH.....	68
4.3.5	Efeito do potencial de trabalho	70
4.3.6	Determinação de catecol por amperometria.....	70
4.3.7	Efeito de interferentes em potencial	74
4.3.8	Aplicação do método proposto na determinação de catecol em amostras de águas naturais	75
4.4	CONCLUSÕES.....	76
5	Biossensor de polifenol oxidase baseado em um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono, nanopartículas de ouro e hidrocloreto de polialilamina para a determinação de sulfito.....	78
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	78
5.2	PARTE EXPERIMENTAL	78
5.2.1	Reagentes	78
5.2.2	Equipamentos.....	79
5.2.3	Célula eletroquímica.....	79
5.2.4	Eletrodos	79
5.2.5	Morfologia.....	79
5.2.6	Funcionalização dos nanotubos de carbono (tratamento ácido)	80
5.2.7	Síntese das nanopartículas de ouro	80
5.2.8	Preparação do extrato bruto de batata doce	80
5.2.9	Preparação do biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE	80
5.2.10	Amostras	82
5.2.11	Método de referência.....	82
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.3.1	Determinação da atividade da PPO	82
5.3.2	Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado AuNPs-MWCNTs-PAH	82
5.3.3	Resposta eletroquímica de catecol no AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE.....	85
5.3.4	Oxidação eletroquímica de catecol no biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE na ausência e presença de sulfito	87
5.3.5	Efeito do pH.....	90
5.3.6	Efeito da velocidade de varredura	91
5.3.7	Determinação indireta de sulfito por voltametria de pulso diferencial.....	91

5.3.8	Efeito de interferentes em potencial	94
5.3.9	Aplicação do método proposto na determinação indireta de sulfito em amostras de vinho	95
5.4	CONCLUSÕES.....	97
6	CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	99
6.1	CONCLUSÕES GERAIS	99
6.2	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	100
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biossensores

Um biossensor é definido como um dispositivo que utiliza material biológico (enzima, antígeno, anticorpo, organismo, tecido animal ou vegetal, célula, microorganismo, entre outros) conectado a um transdutor, o qual converte o sinal biológico em sinal elétrico mensurável^{1,2}. Na FIGURA 1.1 é apresentado um esquema de funcionamento de um biossensor. Em um biossensor eletroquímico, o analito na camada de reconhecimento pode ser oxidado ou reduzido, gerando uma corrente que é proporcional a sua concentração. O consumo de reagente ou o aparecimento de algum produto da reação entre o material biológico e o substrato de interesse (analito) é então monitorado pelo biossensor eletroquímico.

Uma das características mais importantes de um biossensor é a sua seletividade, ou seja, a sua capacidade de discriminar o analito na presença de diferentes espécies (concomitantes), função essa atribuída principalmente ao material biológico imobilizado. Assim, as enzimas são os materiais mais utilizados no desenvolvimento de biossensores³ e esse uso se deve à capacidade enzimática de catalisar com grande eficiência reações biológicas com alta sensibilidade e seletividade^{1,4}.

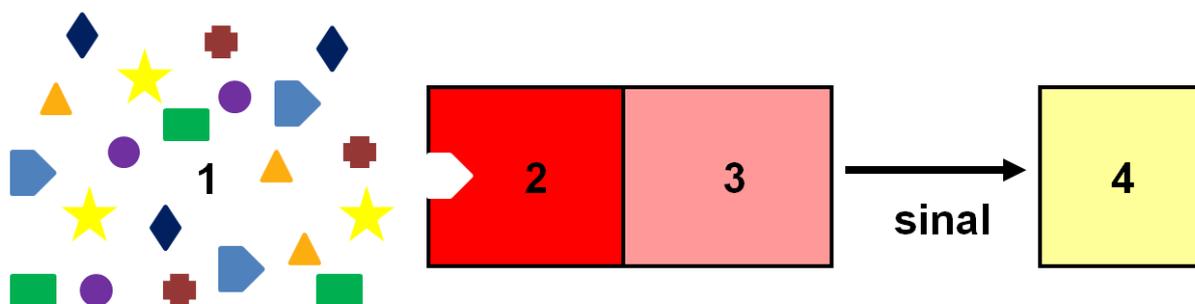


FIGURA 1.1 – Esquema de funcionamento e componentes básicos de um biossensor, sendo 1: analito; 2: material biológico; 3: transdutor e 4: processador de sinal.

O primeiro biossensor (amperométrico) foi desenvolvido em 1962 por CLARK e LYONS⁵, para determinação de glicose no sangue, com o consumo de oxigênio monitorado por um eletrodo para oxigênio (eletrodo para oxigênio descrito

por CLARK) durante a reação catalisada pela enzima glicose oxidase (GOx) imobilizada em uma membrana de celulose, segundo a Equação 1:



Cinco anos depois HUPDIKE e HICKS⁶ aprimoraram o biossensor proposto por CLARK e LYONS, substituindo a membrana de celulose por um gel de poliácridamida em que a enzima foi imobilizada por aprisionamento no polímero. Já em 1969, GUILBAULT e MONTALVO⁷ desenvolveram o primeiro biossensor potenciométrico para determinação de uréia, em que os autores imobilizaram a enzima urease (Urs) em matriz de poliácridamida sobre um eletrodo de vidro sensível a cátions amônio.

A partir destes trabalhos muitos biossensores foram desenvolvidos para os mais diversos fins, sendo utilizados no monitoramento de analitos distintos com interesse ambiental, biológico, farmacêutico, industrial e tecnológico^{1,8,9}.

1.2 Classificação dos biossensores

Os biossensores podem ser classificados como de primeira, segunda ou de terceira geração, dependendo do mecanismo utilizado na transferência eletrônica.

1.2.1 Biossensores de primeira geração

Os biossensores de primeira geração são aqueles baseados na eletroatividade de algum reagente ou produto gerado na reação enzimática entre o substrato e a enzima. Desta maneira, o sinal analítico é produzido pela oxidação ou redução de um reagente ou produto sobre a superfície do eletrodo. O biossensor proposto por CLARK e LYONS⁵ é um exemplo clássico desse tipo de biossensor, sendo possível monitorar o consumo de oxigênio ou a produção de peróxido de hidrogênio (Equação 1). Na FIGURA 1.2 é apresentado um esquema de funcionamento de um biossensor de primeira geração.

Esses biossensores apresentam algumas desvantagens, a saber: é primordial um controle cuidadoso da concentração de O_2 , caso contrário a diminuição da concentração de O_2 não será proporcional à concentração do analito. Além disso, é necessário se aplicar um alto potencial de trabalho ao eletrodo para se determinar a corrente de oxigênio ou peróxido de hidrogênio, o que pode causar interferência na resposta analítica se espécies gasosas eletroativas permearem pela membrana do eletrodo de oxigênio.

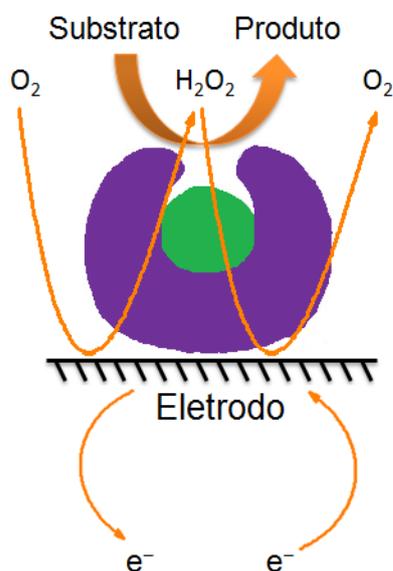


FIGURA 1.2 – Esquema de funcionamento de um biossensor de primeira geração.

1.2.2 Biossensores de segunda geração

Os biossensores de segunda geração são aqueles fundamentados na eletroatividade de mediadores de elétrons (livre em solução ou imobilizados juntamente com a enzima no sensor base) atuando na transferência eletrônica entre

o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo, com o objetivo de diminuir o potencial de trabalho aplicado (potencial de detecção), reduzindo assim a interferência causada por outros compostos presentes em solução que possam sofrer reações eletródicas³. Na FIGURA 1.3 é apresentado um esquema de funcionamento de um biossensor de segunda geração.

Os mediadores de elétrons geralmente são cátions de metais de transição e seus complexos. Os mais comuns são complexos de íons ferro, tais como hexacianoferrato (III) ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) e ferroceno ($[\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2]^+$)³.

As desvantagens apresentadas por esses biossensores são: os mediadores de elétrons podem facilitar também a transferência de elétrons de reações paralelas à reação entre enzima e substrato, levando a interferências na medida, além da dificuldade de imobilização do mediador juntamente com a enzima no sensor base. Por outro lado, o emprego do mediador de elétrons em solução possui a desvantagem de ter que empregar a solução de mediador apenas uma ou poucas vezes, não oferecendo vantagem adicional.

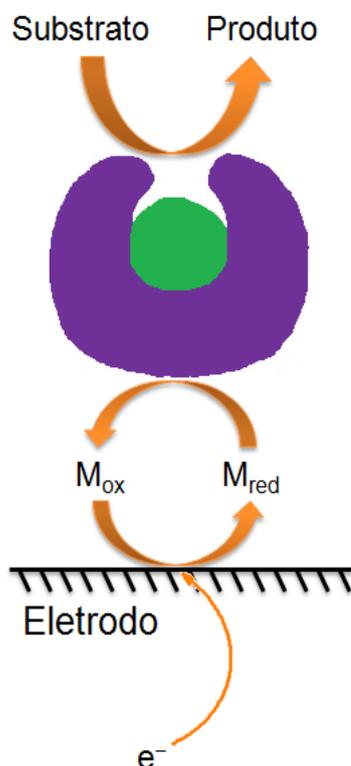


FIGURA 1.3 – Esquema de funcionamento de um biossensor de segunda geração.

M_{ox} : Mediador oxidado, M_{red} : Mediador reduzido.

1.2.3 Biossensores de terceira geração

Os biossensores de terceira geração são aqueles baseados na transferência direta de elétrons entre o centro ativo da enzima e a superfície do eletrodo sem o emprego de mediadores de elétrons, atuando em baixos potenciais. A transferência eletrônica está associada a transformação catalítica do substrato para produto, promovida pelo centro ativo da enzima. Na FIGURA 1.4 é apresentado um esquema de funcionamento de um biossensor de terceira geração.

A grande vantagem apresentada por estes biossensores é uma melhor seletividade, pois os processos ocorrem em menores potenciais, o que diminui a possibilidade de outros compostos presentes em solução interferirem na medida.

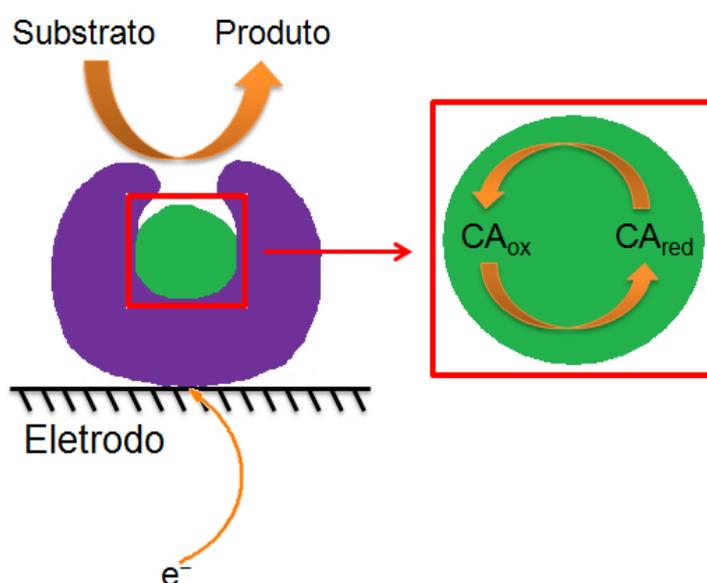


FIGURA 1.4 – Esquema de funcionamento de um biossensor de terceira geração. CA_{ox}: Centro ativo oxidado, CA_{red}: Centro ativo reduzido.

1.3 Métodos de imobilização enzimática

O modo de imobilização da enzima em um determinado suporte é uma etapa crítica no desenvolvimento dos biossensores, pois ao ser imobilizada a enzima deve manter sua atividade biológica, ou seja, o centro ativo da enzima não deve se desnaturar ou sofrer modificações com a imobilização. A grande utilidade da imobilização enzimática é evitar o uso destes materiais na forma solúvel, sem exigência de retirá-los do meio reacional para subsequente aplicação; isso faz com que se tenha uma diminuição do custo por análise e um aumento da rapidez e exatidão do processo^{1,10}.

Existem diversos métodos de imobilização enzimática, dentre eles adsorção física, oclusão em gel, encapsulação, ligação covalente e ligação covalente cruzada^{1,4,11,12}, sendo que cada um apresenta suas vantagens e desvantagens dependendo da aplicação e do transdutor utilizado.

1.3.1 Adsorção física

O método de adsorção física, é o método mais simples de imobilização enzimática, é baseado na adsorção da enzima sobre o substrato através de interações de Van der Waals, ligações covalentes e/ou ligações de hidrogênio. Diversos materiais podem ser utilizados como substrato para adsorção de enzimas, tais como, alumina, carvão, grafite, resinas de troca-iônica, sílica-gel, vidro, entre outros. As principais vantagens desse método são a simplicidade de execução, baixo custo e grande variedade de suportes que podem ser utilizados. Entretanto, apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de um maior controle de diversos fatores (força iônica, pH, temperatura, e solvente) – importantes em qualquer processo em que se trabalhe com enzimas – para que a enzima se mantenha fixa ao substrato (sensor base) e não ocorra sua lixiviação (desprendimento) durante a medida.

1.3.2 Oclusão em gel

Este método baseia-se no confinamento do material biológico dentro dos interstícios de um gel, em que o biomaterial é misturado com uma solução de um monômero e em seguida ocorre a polimerização. Diversos materiais podem ser utilizados para obtenção dos géis, como poliacrilamida, Nylon[®], álcool polivinílico, borracha de silicone, entre outros. A vantagem deste método é o fato da imobilização por oclusão não alterar a estrutura da enzima, fazendo com que a reação entre substrato e enzima não sofra modificação. No entanto, este método pode dar origem a diferentes tamanhos de poros, ocasionando dificuldade ou mesmo o impedimento de difusão de moléculas maiores do substrato. Além disso, pode ocorrer a perda da enzima (por lixiviação) através dos poros do gel.

1.3.3 Microencapsulação

Este método fundamenta-se no confinamento das enzimas em microcápsulas de membranas semipermeáveis fixadas sobre o eletrodo. As

microcápsulas possuem porosidade controlada, o que propicia a difusão do substrato e dos produtos da reação enzimática. Diversas membranas como acetato de celulose, policarbonatos, Nylon[®], quitosana e colágeno são utilizadas para este fim. As vantagens apresentadas são a possibilidade de se imobilizar várias enzimas em uma única etapa e a manutenção da atividade enzimática. Como desvantagens, tem-se a dificuldade de fixação das microcápsulas nos eletrodos e restrição à chegada do substrato na camada enzimática.

1.3.4 Ligação covalente em suportes

O método de ligação covalente é um dos mais utilizados e se baseia na formação de ligações entre os grupos não ativos da enzima (não essenciais para atividade catalítica) com grupos reativos específicos presentes no suporte tais como, hidroxilas ($-OH$), carbonilas ($-C(=O)$), aminas ($-NH_2$), imidazólicos ($C_3H_4N_2$) e tiólicos ($-SH$). Como vantagens do método podem ser destacadas uma menor lixiviação e maior estabilidade entre enzima-suporte frente a variações de pH, força iônica e solventes. A desvantagem está na possibilidade de diminuição da atividade enzimática por alterações da estrutura dos sítios ativos enzimáticos, ou ainda, por reação dos grupos funcionais ativos com o reagente de ligação. Alguns reagentes utilizados no desenvolvimento de biossensores por ligação covalente em suportes são o glutaraldeído (GA), epícloridrina, glioxal, aminotióis, 1etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS).

1.3.5 Ligação covalente cruzada

O princípio deste método é a formação de ligações covalentes cruzadas (*crosslinking*) entre as moléculas das enzimas, por meio de reagentes bifuncionais levando a formação de uma rede rígida. Diversos reagentes podem ser utilizados para este fim, sendo que o mais utilizado é o glutaraldeído (GA)¹³⁻¹⁶. Como principais vantagens destacam-se a simplicidade e menor tempo de execução, além deste método gerar uma forte interação enzima-enzima, o que minimiza a lixiviação da mesma e leva a uma maior estabilidade do biossensor. Em contrapartida, existem algumas desvantagens, como dificultar o processo difusional pela introdução de barreiras, o que leva a um aumento no tempo de resposta do biossensor. Além disso, pode ocorrer a diminuição da atividade enzimática por mudanças

conformacionais no centro ativo da enzima, podendo diminuir o sinal analítico e aumentar o tempo de resposta do biossensor.

1.4 Nanotubos de Carbono

Os nanotubos de carbono (CNTs) se tornaram foco de intensa pesquisa, principalmente no desenvolvimento de sensores e biossensores para diversas aplicações em eletroanálise¹⁷⁻²². Isso se deve às suas propriedades físicas e químicas interessantes, tais como elevada área superficial, alta resistência mecânica, excelente condutividade elétrica e térmica, facilidade para promover a transferência eletrônica e diminuição do potencial de trabalho (eletrocatalise), além da possibilidade de funcionalização para se ancorar enzimas, por exemplo, para uso em biossensores eletroquímicos enzimáticos^{23,24}.

Os nanotubos de carbono (CNTs) podem ser considerados como uma folha de grafeno enrolada entre si formando um cilindro, o qual é fechado como uma espécie de abóboda de carbono¹⁸. Esta é uma maneira simples e fácil de descrevê-los, no entanto, sabe-se que os CNTs são sintetizados de maneiras distintas. Este assunto será abordado novamente na Seção 1.4.1.

Os CNTs são classificados quanto ao número de paredes, existem diversos tipos: nanotubos de carbono de parede simples (em inglês, *Single-Walled Carbon Nanotubes* – SWCNTs), nanotubos de carbono de paredes duplas (em inglês, *Double-Walled Carbon Nanotubes* – DWCNTs) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (em inglês, *Multi-Walled Carbon Nanotubes* – MWCNTs) que apresentam três ou mais paredes. Os CNTs podem apresentar diâmetros variáveis entre 1 a 2 nm (SWCNTs) chegando até 2 a 100 nm (MWCNTs). Na FIGURA 1.5 são apresentas as duas principais formas de CNTs.

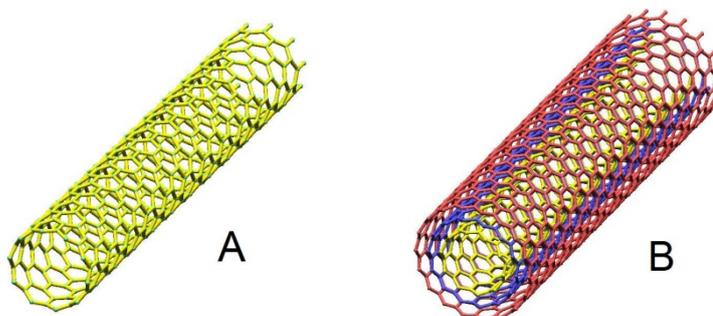


FIGURA 1.5 – Representação esquemática das principais formas de CNTs: (A) SWCNTs e (B) MWCNTs.

Uma das características que fazem com que os CNTs sejam amplamente empregados na modificação de eletrodos é a capacidade que este material possui em promover a transferência eletrônica com grande habilidade, o que leva a uma melhora nas propriedades de detecção dos dispositivos eletroquímicos: como diminuição do potencial de trabalho para uma vasta gama de substratos eletroativos e aumento de sinal analítico^{18,21}, este efeito é chamado de eletrocatalítico.

O efeito eletrocatalítico implica em um aumento da seletividade do (bios)sensor, pois há uma diminuição na possibilidade de se atingir os potenciais de eletrólise de espécies interferentes^{17,19}, o que contribui para o melhor desempenho dos eletrodos modificados (EMs) com CNTs frente aos eletrodos de carbono convencionais. Além disso, os EMs com CNTs apresentam faixa de potencial de trabalho relativamente ampla e são quimicamente inertes em diversos eletrólitos suporte²¹.

A propriedade eletrocatalítica dos CNTs é atribuída ao mecanismo de transporte de elétrons, podendo apresentar características de metal ou semicondutor dependendo da sua estrutura. Para compreender as diferentes estruturas dos CNTs, deve-se imaginar uma folha de grafeno enrolada de modo a formar um cilindro (de forma determinada). É então definido um vetor quiral (\vec{C}_h), que caracteriza o CNT. Esse vetor (\vec{C}_h) é função de duas componentes, os vetores unitários da rede hexagonal, \vec{a}_1 e \vec{a}_2 , e os índices de Hamada (n,m), dois números inteiros²⁵. Desta maneira, o vetor quiral \vec{C}_h é definido como $\vec{C}_h = n\vec{a}_1 + m\vec{a}_2$, conforme apresentado na FIGURA 1.6. A direção de enrolamento da folha de grafeno é definida pelo vetor quiral \vec{C}_h e pelo ângulo quiral θ ²⁶.

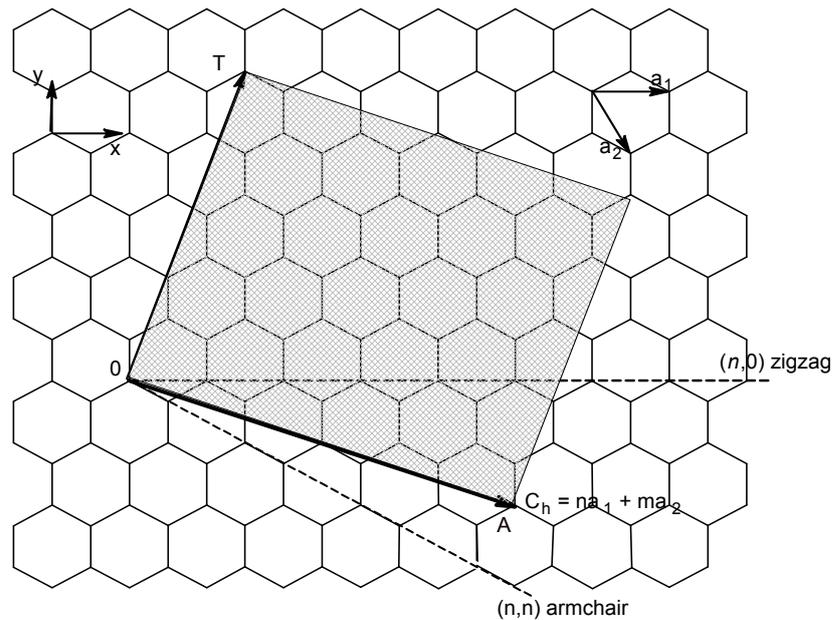


FIGURA 1.6 – Esquema da representação dos vetores unitários (\vec{a}_1) e (\vec{a}_2), vetor quiral (\vec{C}_h) e vetor de translação (\vec{T}) sobre uma folha de grafeno. Figura retirada da dissertação de QUINTERO²⁷.

Os CNTs são classificados quanto à quiralidade, de acordo com os valores de n e m , além do ângulo quiral (θ), que varia entre 0° e 30° . As estruturas possíveis estão apresentadas na FIGURA 1.7, são elas: zigzag ($n \neq m = 0$; $\theta = 30^\circ$), armchair ($n = m$; $\theta = 0^\circ$) e quiral ($n \neq m \neq 0$; $0^\circ < \theta < 30^\circ$).

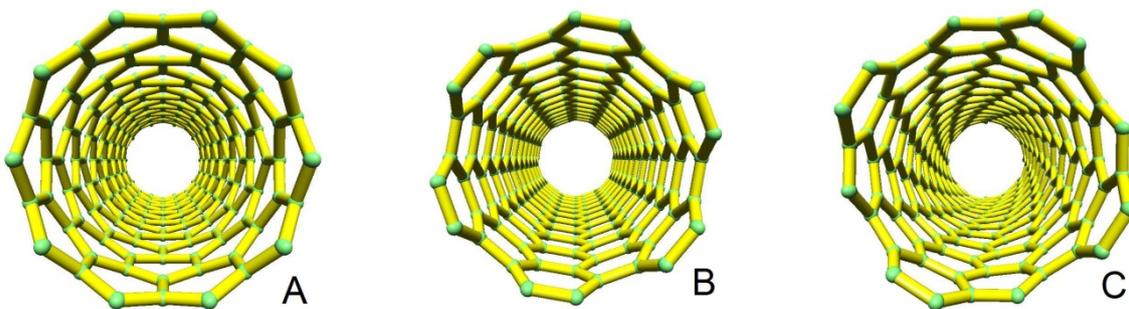


FIGURA 1.7 – Representação de SWCNTs exibindo diferentes quiralidades: (A) zig-zag ($\theta = 30^\circ$), (B) armchair ($\theta = 0^\circ$) e (C) quiral ($0^\circ < \theta < 30^\circ$).

Baseado na quiralidade, os CNTs podem apresentar propriedades metálicas ou de semicondutor. Assim, quando os índices de Hamada (n,m) são múltiplos de três os CNTs apresentam propriedades metálicas, do contrário, exibem propriedades de semicondutor. Desta maneira, os CNTs do tipo armchair apresentam propriedades metálicas, os do tipo zig-zag propriedades de

semicondutor e os do tipo quiral podem mostrar propriedades metálicas ou de semicondutores.

1.4.1 Síntese dos nanotubos de carbono

Existem diversos métodos para sintetizar CNTs, os mais empregados são ablação a laser (vaporização a laser), pirólise em arco voltaico e deposição química em fase vapor (CVD). Todos esses métodos apresentam dois problemas, deixam resíduos dos catalisadores e geram carbono amorfo conjuntamente aos CNTs.

A síntese por ablação a laser baseia-se em vaporizar um material de carbono em altas temperaturas (1200 °C) geradas por um laser mantendo-se a pressão controlada. Utiliza-se um gás inerte, hélio ou argônio, para se resfriar o carbono vaporizado. Os CNTs são depositados em um tubo refrigerado localizado fora do forno. Utilizam-se materiais catalíticos como ferro (Fe) e cobalto (Co) para dopar previamente o material carbonáceo, obtendo-se assim SWCNTs após a vaporização²⁸.

O princípio da descarga por arco voltaico é a geração de um arco elétrico entre dois eletrodos de grafite separados por cerca de 1 mm, em atmosfera de gás inerte (hélio ou argônio) e pressão reduzida. A alta corrente que passa entre os eletrodos (entre 50 e 120 A) em um potencial de 30 V, leva a formação de um plasma de alta temperatura (> 3000 °C). Assim, o carbono é sublimado e condensado rapidamente formando os CNTs²⁹. Esta técnica pode ser utilizada para síntese de SWCNTs e MWCNTs separadamente. Para produção de SWCNTs, utiliza-se o grafite dopado com diversos metais, tais como ferro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), e ítrio (Y). Este método foi utilizado por IJIMA em 1991 quando ele sintetizou os MWCNTs pela primeira vez³⁰.

Já o método de deposição química em fase vapor (CVD) é o mais utilizado atualmente e compreende em aquecer um substrato (entre 800–1100 °C) modificado com partículas metálicas catalíticas, em atmosfera inerte, para decompor o gás precursor (que possui átomos de carbono). No reator dois gases são misturados, hidrogênio (H₂), nitrogênio (N₂) ou amônia (NH₃) com um gás precursor: metano (CH₄), etileno (C₂H₄) ou acetileno (C₂H₂). Assim, as ligações covalentes dos gases precursores são rompidas e os átomos liberados se dirigem para as bordas das partículas metálicas, em que os CNTs são crescidos. Diversos metais são

utilizados para a modificação do substrato, entre eles partículas de Fe, Co, Ni ou misturas desses metais³¹. A grande vantagem do método CVD é a possibilidade de se controlar melhor as variáveis de síntese, desta maneira, há eficiência na obtenção de grandes quantidades de CNTs de boa qualidade com menor teor de impurezas³².

1.4.2 Tratamento dos nanotubos de carbono

A utilização de CNTs é limitada pela baixa solubilidade em vários solventes, entre eles, água, metanol, etanol e isopropanol. Existem diversos métodos de tratamento químico ou funcionalização de CNTs, que destinam-se a promover o aparecimento de grupos funcionais polares sobre sua superfície, dentre eles, exposição ao ozônio³³, vapor de água³⁴, dióxido de carbono³⁵, peróxido de hidrogênio³⁶, plasma de oxigênio³⁷, ácido nítrico concentrado³⁸, ácido clorídrico concentrado³⁸ ou misturas de ácidos nítrico e sulfúrico concentrados³⁸⁻⁴³. Os principais procedimentos empregam os ácidos clorídrico, nítrico e sulfúrico ou suas misturas, devido à alta eficiência de funcionalização⁴⁰.

A funcionalização de CNTs por ácidos oxidantes concentrados ou mistura de ácidos é amplamente utilizada e visa abrir as extremidades dos CNTs, eliminar o carbono amorfo e impurezas metálicas provenientes da síntese, bem como incorporar grupos funcionais polares como grupos carboxilas ($-\text{COOH}$), hidroxilas ($-\text{OH}$), quinonas ($-\text{C}(\text{=O})$), nitros ($-\text{NO}_2$), aminas ($-\text{NH}_2$) ou sulfônicos ($-\text{SO}_3\text{H}$) nas extremidades ou nos defeitos das paredes da estrutura dos CNTs³⁸⁻⁴³. A FIGURA 1.8 ilustra uma representação dos CNTs antes e após tratamento ácido: há abertura da extremidade do tubo, aparecimento de defeitos na estrutura e incorporação de grupos funcionais.

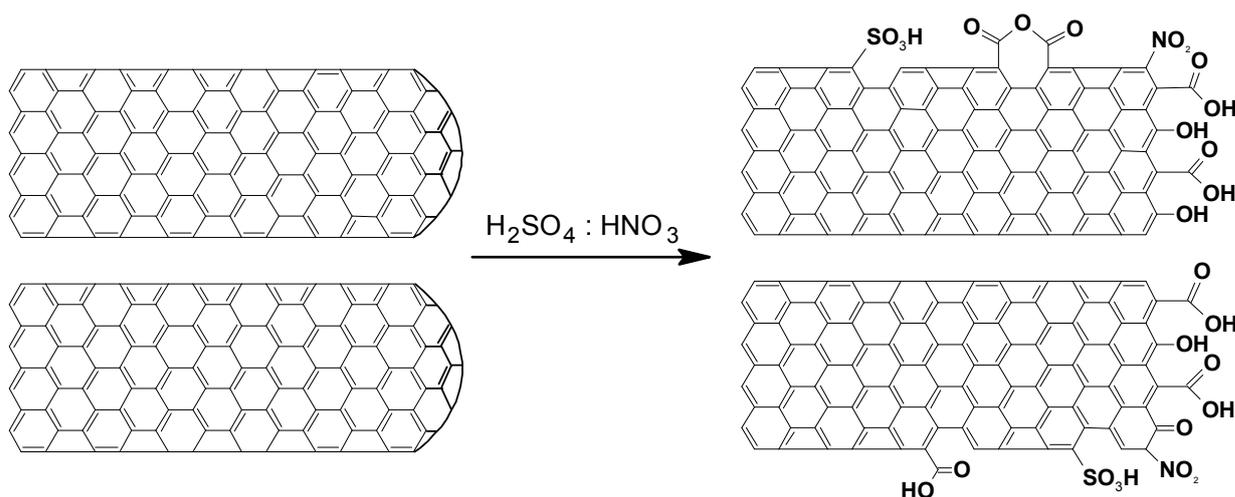


FIGURA 1.8 – Representação da incorporação dos grupos funcionais nos CNTs, pelo tratamento químico com mistura de ácidos HNO_3 e H_2SO_4 . Figura adaptada da dissertação de QUINTERO²⁷.

O aumento da solubilidade e principalmente da velocidade de transferência eletrônica são atribuídos à presença dos grupos funcionais que são criados nos planos de borda^{44,45}. Esses planos de borda encontram-se justamente nos defeitos ao longo dos tubos e nas bordas dos CNTs, os quais surgem após tratamento oxidante. A literatura relata que o transporte eletrônico ocorre de forma balística (no plano basal)⁴⁴, ou seja, sem se espalhar ao longo do comprimento do tubo, pois os elétrons não se chocam com os átomos da rede, promovendo a condução de correntes através de grandes extensões²². Essa integração entre a condução balística e a presença dos planos de borda faz com que os CNTs sejam excelentes materiais para mediação da transferência de elétrons em reações com espécies em solução.

A presença de grupos funcionais nos CNTs cria um ambiente suscetível a interações com enzimas, por adsorção, por ligações covalentes ou até mesmo pelo aprisionamento destas moléculas biológicas^{23,24}. Ademais, os CNTs apresentam dimensões (em nível molecular) similares aos das enzimas, o que pode melhorar a resposta para biossensores que empregam estes materiais^{17,19}. Assim, diversos biossensores empregando CNTs são descritos na literatura para as mais diversas aplicações^{15,17,19,46-49}, tais como, glicose, frutose, colesterol, compostos fenólicos, peróxido de hidrogênio, alcoóis, pesticidas organofosforados, fármacos, etc.

1.5 Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas (NPs) têm sido alvo de estudos na última década para utilização em muitos dispositivos tecnológicos. Diversos métodos de síntese para a produção de NPs foram desenvolvidos, a maior parte envolvendo uma síntese química, mas existem ainda os métodos físicos, ou processos mecânicos⁵⁰. Em particular, as NPs possuem um tamanho entre 1 e 100 nm, exibindo propriedades únicas que não são encontradas para o mesmo material enquanto sólido (bulk) e têm sido amplamente estudadas para o emprego em áreas distintas: ambiental, farmacêutica, médica, cosmética, energética, entre outras^{51,52}.

Em geral, existem duas estratégias para preparação de NPs. Os métodos físicos de síntese ou também chamados *Top down*, que consistem em quebrar as partículas do estado macro até chegarem à escala nanométrica. Já as sínteses químicas ou *Bottom up*, baseiam-se em reações químicas e utilização de precursores moleculares ou atômicos⁵³. Na FIGURA 1.9 estão apresentadas as duas estratégias de obtenção de NPs. A grande vantagem do método *Bottom up* é o fato de ser mais simples e possibilitar maior controle do tamanho e forma, obtendo-se assim partículas menores do que aquelas obtidas pelo método *Top down*.

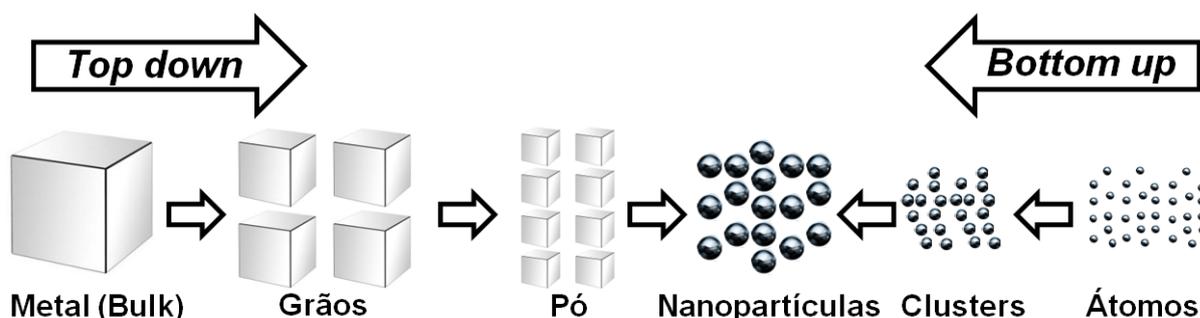
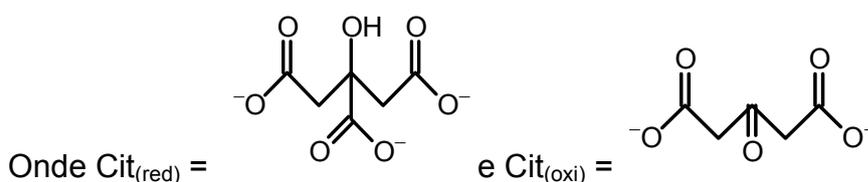
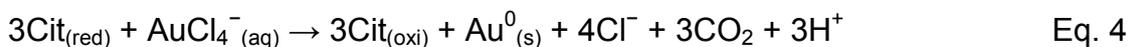


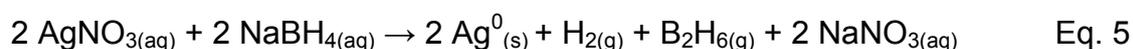
FIGURA 1.9 – Representação esquemática das rotas de síntese Top down e Bottom up na obtenção de NPs.

O método mais empregado na obtenção de diversas NPs (ouro, prata, platina, ródio) é o Método de Turkevich⁵⁴ ou também chamado de Método do Citrato, que consiste em uma reação de óxido-redução (em meio aquoso) entre o citrato e o sal metálico (sal solúvel), como um cloreto ácido de ouro(III) (HAuCl_4), por exemplo. A Equação 4 apresenta a reação de óxido-redução entre o citrato e o sal de ouro:



Este procedimento é simples, rápido, reprodutível (capaz de gerar NPs com tamanhos de 20 nm aproximadamente), de baixo custo e seguro (reação realizada em meio aquoso). Outra importante vantagem do Método de Turkevich é o fato do ânion se comportar como redutor do sal metálico e estabilizante das NPs, não sendo necessária a adição de substâncias estabilizantes. Além do citrato, outros agentes redutores podem ser empregados, dentre eles o ácido ascórbico ou ácido tartárico.

Um método também empregado na síntese de NPs é o da redução com borohidreto de sódio^{54,55} utilizando íons citrato como estabilizante. Pode-se também estabilizar as NPs adicionando excesso de borohidreto de sódio. Assim, o borohidreto ficará adsorvido na superfície das NPs, que ficarão carregadas negativamente, dificultando a agregação das NPs devido a repulsão entre elas. A Equação 5 apresenta como exemplo, a reação de óxido-redução entre o borohidreto e o sal de prata na síntese de NPs de prata (AgNPs):



Outro método que tem sido muito empregado nos últimos anos na obtenção de AuNPs é o Método de Brust⁵⁵, em que a reação de redução entre o AuCl_4^- e borohidreto de sódio ocorre em meio bifásico (água-tolueno) em presença de um alcanotiol. Com este procedimento pode-se obter AuNPs com tamanhos entre 1 – 3 nm aproximadamente, que se mantêm estáveis (sem se decompor ou agregar) por várias semanas.

Na eletroanalítica, as NPs metálicas têm sido utilizadas na modificação de eletrodos, devido principalmente a algumas vantagens em relação aos chamados macroeletrodos, entre elas, grande área de contato, efeito eletrocatalítico e aumento do transporte de massa⁵⁴. Essas vantagens podem propiciar um desempenho analítico superior (maior sensibilidade e menores limite de detecção e diminuição do potencial de trabalho) em relação aos eletrodos convencionais^{36,42,46,56-58}. Para explicar esse melhor desempenho, surgiu o conceito dos chamados nanoeletrodos, ou seja, em um arranjo de NPs cada uma funciona como um microeletrodo⁵⁹. Essa redução de um eletrodo para a escala nanométrica melhora consideravelmente o transporte de massa devido à contribuição da difusão radial e a diminuição da razão sinal/ruído, já que apresenta baixa resistência interna. Assim, diversos eletrodos modificados com NPs têm sido desenvolvidos em procedimentos eletroanalíticos^{52,57,60-62}.

A preparação de sensores pode ser realizada com o uso de NPs de ouro, paládio, platina entre outras, levando a um aumento da estabilidade e permitindo-se trabalhar em menores potenciais de trabalho, causando uma diminuição do efeito de possíveis interferentes presentes nas amostras. Outras características fomentam o uso das NPs no desenvolvimento de sensores e biossensores, dentre elas, resistência mecânica, alta condutividade elétrica, além de boa compatibilidade com biomoléculas^{56,63,64}. Sobretudo as AuNPs têm dimensões semelhantes às das enzimas, o que pode levar a uma melhora da resposta para estes dispositivos (melhor comunicação entre enzima e materiais de eletrodo)⁶⁰. Diversos trabalhos reportados na literatura têm explorado a combinação entre AuNPs e biomoléculas no desenvolvimento de novos biossensores para a determinação de sulfito em alimentos⁴⁶, compostos fenólicos em amostras ambientais^{48,62,65}, peróxido de hidrogênio⁶¹, entre outros.

1.6 Dihexadecil hidrogenofosfato

Dihexadecil hidrogenofosfato (DHP) ou dicetilfosfato é uma molécula com uma cabeça polar e duas longas caudas hidrofóbicas⁶⁶ (FIGURA 1.10 A). É um agente tensoativo (surfactante), que ao ser disperso em água (por agitação ultrassônica) em uma concentração adequada (normalmente 1,0 mg/mL), produz um filme estável na superfície do eletrodo após evaporação da água. Essa estabilidade do filme formado é atribuída provavelmente à formação de ligações de hidrogênio

entre as moléculas do DHP, que se polimerizam⁴⁷ (FIGURA 1.10 B). Desta maneira, o DHP tem sido utilizado juntamente com outros materiais (que são aprisionados nos interstícios do polímero formado), tais como nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas e enzimas, no desenvolvimento de sensores^{61,67} e biossensores^{47,68-70}.

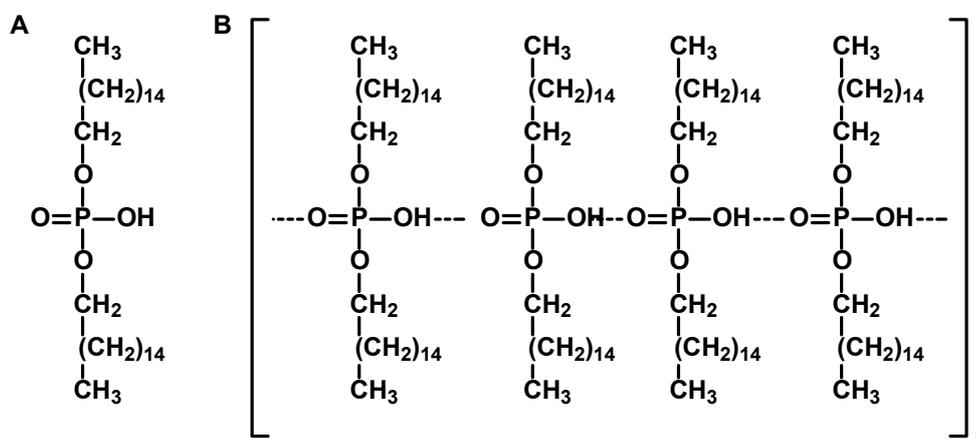


FIGURA 1.10 – (A) Estrutura molecular do DHP. (B) Possível forma polimerizada do DHP após evaporação do solvente (água).

1.7 Hidrocloreto de polialilamina (PAH)

O hidrocloreto de polialilamina (PAH) é um polieletrólito catiônico fraco que possui vários grupos amino ($-\text{NH}_2$) ionizáveis em sua cadeia, estando totalmente protonado em soluções neutras e ácidas e totalmente desprotonado em soluções ligeiramente básicas (pK_a entre 8,5 – 9,67 em solução aquosa)⁷¹⁻⁷⁴. Assim, em pH 8,0, por exemplo, somente uma fração de grupos $-\text{NH}_2$ na estrutura do PAH está protonado e torna-se $-\text{NH}_3^+$. Por outro lado, em pH 4,0 ele está totalmente protonado. Na FIGURA 1.11 é apresentada a estrutura molecular do PAH. Esse polieletrólito tem sido utilizado juntamente com um polieletrólito aniônico por meio da técnica de camadas automontadas (layer-by-layer) no desenvolvimento de sensores e biossensores^{71,74,75}. Ademais, é utilizado em química e aplicações biomédicas para liberação controlada de fármacos e medicamentos⁷⁶.

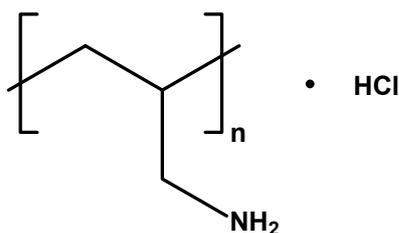


FIGURA 1.11 – Estrutura molecular do PAH.

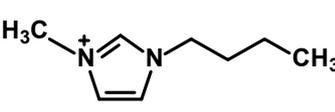
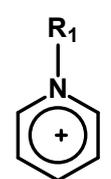
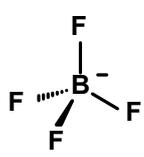
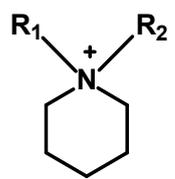
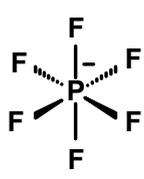
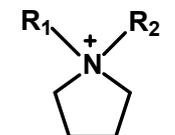
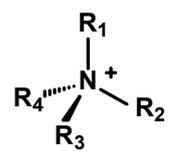
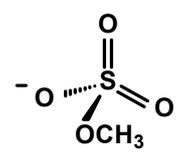
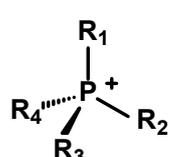
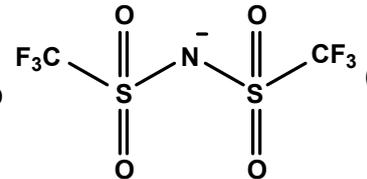
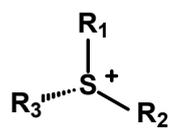
Além disso, o PAH tem sido empregado em dispersões contendo nanotubos de carbono (SWCNTs e MWCNTs)^{46,73,76-80} por formar uma suspensão estável e homogênea em água, permitindo assim a modificação de eletrodos de carbono vítreo para diferentes fins. Nosso grupo tem trabalhado com eletrodos de carbono vítreo modificado com filmes de MWCNTs e PAH para diversas aplicações tais como, determinação de ácido ascórbico⁷⁸ e sulfito^{46,73,78} em alimentos e ainda ciprofibrato⁷⁹ e propiltiouracil⁷⁷ em formulações farmacêuticas.

1.8 Líquidos Iônicos

Os líquidos iônicos (ILs) são sais, compostos por um cátion orgânico volumoso e um ânion orgânico ou inorgânico, estes são líquidos a uma temperatura inferior a 100 °C⁸¹. TORRIERO e BOND afirmam que essa definição pode ser arbitrária para distinguir ILs dos classicamente conhecidos sais fundidos⁸². Os ILs são diferenciados dos típicos sais inorgânicos por sua baixa temperatura de fusão. Em contrapartida, os sais inorgânicos típicos possuem uma alta temperatura de fusão de cerca de 1000 °C, a qual é atribuída a uma forte atração eletrostática entre os íons, refletindo em elevadas energias reticulares. A grande diferença de tamanho entre um cátion volumoso e um ânion pequeno (no caso dos ILs) não permite uma forte atração eletrostática entre eles, pois sendo os ILs compostos orgânicos, estão presentes entre os íons interações de van der Waals (entre as cadeias alifáticas), ligações de hidrogênio fracas (entre cátion e ânion) e interações do tipo π - π (entre anéis aromáticos) que irá refletir em baixas energias reticulares, fazendo com que os íons sejam desorganizados. Como resultado, muito destes sais permanecem no estado líquido à temperatura ambiente⁸³⁻⁸⁵. Por exemplo, o NaCl tem um ponto de fusão em torno de 800 °C, quando o sódio é substituído por 1-butil-3-metil-imidazol (BMIM) o ponto de fusão decresce para quase 60 °C⁸⁶.

Os cátions mais empregados para a formação dos ILs são derivados de imidazol, piridínio, piperidínio, pirrolidínio, amônio, fosfônio e sulfônio, os quais podem ser combinados com diversos ânions tais como brometo, cloreto, nitrato, tiocianato, tetrafluorborato, hexafluorofosfato, dicianamida, metilsulfato, Bis (trifluormetilsulfonil) imida, entre outros, os quais estão apresentados na TABELA 1.1.

TABELA 1.1 – Cátions e ânions mais utilizados na formação de ILs

Cátions		Ânions	
	Imidazol	Br^-	Brometo
		Cl^-	Cloreto
		NO_3^-	Nitrato
	BMIM	$^- \text{S}-\text{C}\equiv\text{N}$	Tiocianato
	Piridínio		Tetrafluorborato
	Piperidínio		Hexafluorofosfato
	Pirrolidínio	$\text{N}\equiv\text{C}-\text{N}^--\text{C}\equiv\text{N}$	Dicianamida
	Tetraalquilamônio		Metilsulfato
	Tetraalquilfosfônio		Bis (trifluorometilsulfonyl) imida
	Trialquilsulfônio		

R_1, R_2, R_3 e R_4 = Grupos alquílicos ou H.

Os ILs podem ser divididos em dois grupos de acordo com sua solubilidade em água, sendo classificados como ILs imiscíveis (hidrofóbicos) ou ILs miscíveis (hidrofílicos) em água.

A miscibilidade de ILs em água é fortemente dependente dos ânions^{87,88}. Assim, Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , CH_3COO^- e CF_3COO^- são ânions que fazem com que o IL seja miscível em água. Já o PF_6^- e o Tf_2N^- deixam o IL imiscível em água. Os ânions BF_4^- e CF_3SO_3^- são, em geral, miscíveis em água. Entretanto, essa miscibilidade depende da estrutura dos cátions presentes no IL, ela diminui com o aumento do comprimento da cadeia catiônica (cadeia alquílica)⁸⁴.

Desta maneira, combinando-se cátions e ânions apropriados, é possível modificar de maneira controlada as propriedades físico-químicas dos ILs, tais como, ponto de fusão, condutividade iônica, constante dielétrica, viscosidade, densidade e ainda miscibilidade em água, propriedades de fundamental importância em aplicações como, síntese (orgânica, inorgânica), catálise, extração, separação, reações enzimáticas, dispositivos eletroquímicos (baterias, capacitores, células a combustível, células fotovoltaicas e sensores eletroquímicos) entre outras^{83-85,89}.

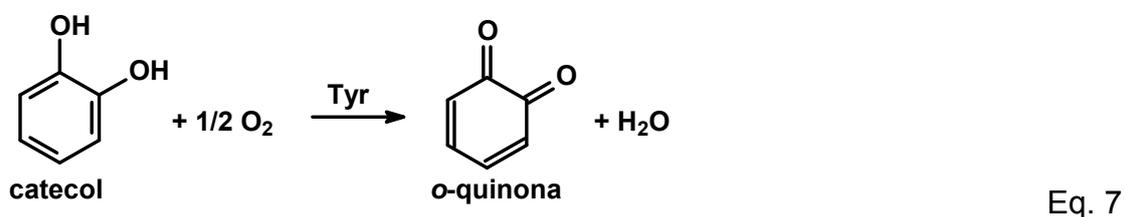
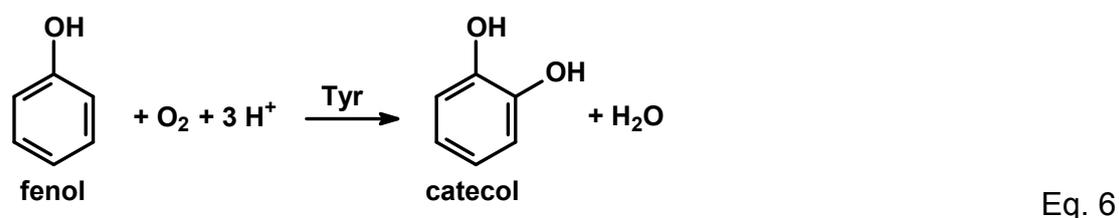
A utilização dos ILs no desenvolvimento de novos métodos eletroquímicos tem atraído a atenção de muitos pesquisadores nos últimos anos, sendo uma área em grande desenvolvimento. Os ILs têm sido empregados no desenvolvimento de sensores para gases, íon-seletivos, voltamétricos e biossensores^{84,90,91}.

Neste contexto, a utilização de ILs em eletroanálise fornece algumas características como a estabilidade nas respostas eletroquímicas, condutividade iônica elevada e ampla janela de potencial. Nos últimos anos, os ILs têm sido utilizados como materiais condutores no desenvolvimento de sensores eletroquímicos e biossensores, sobretudo em materiais híbridos de carbono-IL^{92,93}, na maioria dos casos incorporando-os em pastas de carbono⁹⁴ ou em compósitos⁹⁵. O uso de ILs no desenvolvimento de biossensores se mostra interessante, pois apresentam boa compatibilidade com biomoléculas e enzimas^{90,91}. Além disso, existem alguns trabalhos envolvendo ILs incorporados em filmes na superfície dos eletrodos⁹². Como se sabe, eletrodos de filme são uma boa alternativa para aprisionar proteínas e enzimas, já que conservam a sua bioatividade e não interferem na resposta eletroquímica.

1.9 Tirosinase

A tirosinase (Tyr) é uma metaloproteína que possui dois átomos de cobre em seu centro ativo, é também conhecida como polifenol oxidase (PPO) ou

catecol oxidase. Esta importante enzima catalisa a oxidação de reações, tais como: *o*-hidroxilação de monofenóis a *o*-diidroxifenóis e, subsequentemente, oxidação de *o*-diidroxifenóis a *o*-quinonas, em presença de oxigênio molecular. As Equações 6 e 7 apresentam como exemplo, a oxidação de fenol a catecol com posterior oxidação a *o*-quinona, catalisada pela enzima Tyr em presença de oxigênio.



A Tyr tem sido amplamente utilizada na construção de biossensores para determinação de fenóis⁹⁶⁻⁹⁹. JANEGITZ e colaboradores propuseram um novo biossensor para fenol baseado na transferência direta de elétrons através da imobilização direta de Tyr em nanopartículas de ouro eletrodepositados sobre a superfície de um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)⁶². Em outro trabalho, YANG e colaboradores construíram um filme composto por nanopartículas de níquel, quitosana e Tyr para a detecção de catecol¹⁰⁰. ARECCHI et al. desenvolveram um biossensor de Tyr para a detecção amperométrica de compostos fenólicos em alimentos, em que a enzima foi imobilizada sobre um eletrodo de carbono vítreo coberto por uma membrana de nanofibras de Nylon^{®101}.

A PPO pode ser encontrada na natureza em diversos tecidos vegetais, como por exemplo, abacate, abobrinha, banana, batata doce, batata inglesa, berinjela, beterraba, jaca, kiwi, maçã, manga, pêssigo, pêra, morango, uva, entre outros¹⁰². A concentração da enzima nos tecidos vegetais é dependente de alguns fatores como, local de plantio, período da colheita e estado de amadurecimento (a concentração é menor em frutos e/ou vegetais não amadurecidos¹⁰²). O uso de tecidos vegetais para obtenção de PPO é devido principalmente à simplicidade, rapidez e eficiência de extração, bem como pelo baixo custo de frutas e vegetais.

Entretanto, o uso de tecidos vegetais como fonte enzimática pode apresentar algumas desvantagens, entre elas a multiplicidade de enzimas que pode ocasionar uma menor seletividade do biossensor (em alguns casos), além de diminuir a atividade enzimática em função do tempo, pois podem ocorrer reações entre a enzima (em presença de oxigênio molecular) e os substratos naturais presentes nos tecidos vegetais, no caso de soluções de extratos enzimáticos. Para diminuir esses efeitos, os extratos podem ser obtidos na presença de alguns estabilizadores ou protetores, substâncias que separam os compostos fenólicos naturais dos extratos enzimáticos. Um agente protetor muito empregado é o polímero polivinilpirrolidona (PVP), que apresenta baixa solubilidade em água e é capaz de formar ligações de hidrogênio com os substratos fenólicos. Na FIGURA 1.12 está apresentada a interação entre o PVP e compostos fenólicos naturais por meio de ligações de hidrogênio.

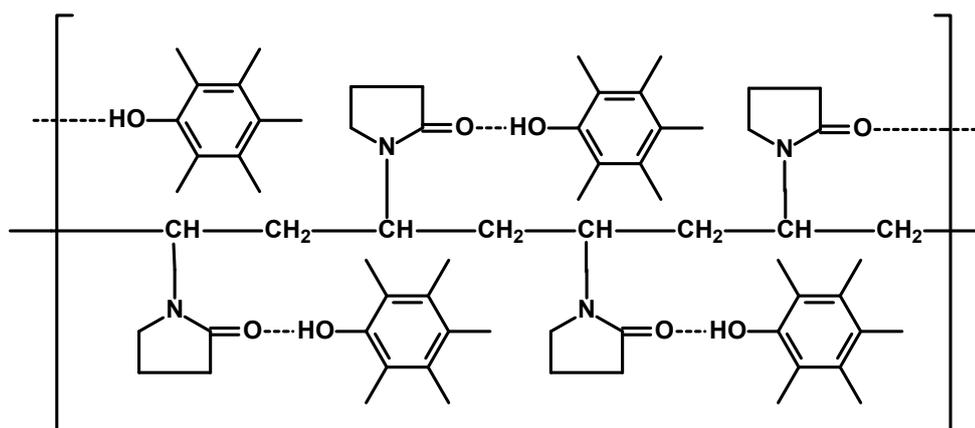


FIGURA 1.12 – Interação entre o polímero PVP e substratos fenólicos naturais por ligações de hidrogênio.

Outros compostos podem ser utilizados como agentes protetores, removendo os substratos naturais dos extratos enzimáticos entre eles, resinas de troca iônica, policaprolactona e polietileno glicol¹⁰². Assim, inúmeros tecidos vegetais têm sido utilizados no desenvolvimento de biossensores para inúmeras aplicações¹⁰², dentre elas ambientais¹⁰³, farmacêuticas¹⁰⁴⁻¹⁰⁶, biológicas⁹⁴ e alimentícias^{46,107-109}.

A atividade da Tyr pode ser inibida por diversas substâncias como, sulfito, ácido ascórbico, tiocianato, azida, além de diversos poluentes (carbamatos, organofosforados, ditiocarbamatos, atrazinas, tiurêas, etc)^{12,104,108,110}. Sendo assim,

biossensores baseados em Tyr podem ser empregados para se determinar o inibidor. Para tanto, trabalha-se com uma concentração fixa de substrato e monitora-se a diminuição na concentração do oxigênio no meio reacional ou na concentração da quinona gerada pela ação enzimática.

1.10 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos têm um ou mais grupos hidroxila (–OH) ligados ao anel aromático. Esses compostos são um dos principais contaminantes presentes em águas residuárias amplamente empregados em diversas indústrias, dentre elas madeira, de tecidos, de herbicidas e pesticidas, farmacêutica, etc^{62,96,98,111}. A contaminação de solos e águas superficiais por compostos fenólicos representa um grande risco para a fauna e a flora, pois mesmo em baixas concentrações são tóxicos, podendo causar diversas doenças, incluindo o câncer^{112,113}.

Muitos métodos para a determinação analítica de compostos fenólicos estão descritos na literatura, incluindo métodos empregando técnicas como a cromatografia gasosa¹¹⁴, cromatografia líquida de alta eficiência^{115,116}, quimioluminescência¹¹⁷, eletroforese capilar¹¹⁸ e espectrofotometria¹¹⁶. Contudo, estes métodos necessitam de pré-tratamento de amostra e requerem maiores tempos de análise, além de serem inadequados para um monitoramento *in situ* das amostras.

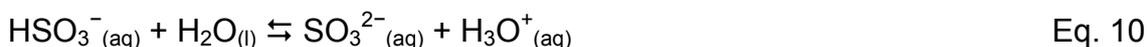
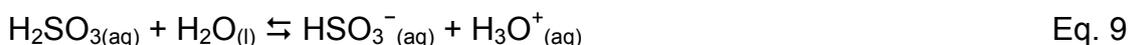
O método espectrofotométrico é o método oficial recomendado pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*¹¹⁹ para determinação de compostos fenólicos em águas naturais, de abastecimento, residuárias e do mar. Esse método baseia-se na reação entre 4-aminoantipirina e o composto fenólico para produzir antipirina detectada em 500 nm. Todavia, este é um método moroso, uma vez que há a necessidade de se aguardar 15 min para se fazer a leitura da antipirina formada. Portanto, novos métodos têm sido desenvolvidos para a determinação de compostos fenólicos em água, sobretudo, métodos eletroanalíticos envolvendo sensores^{66,120,121} e biossensores^{48,98,99,110,112,113,122-128}.

O desenvolvimento de novos biossensores para a determinação de compostos fenólicos apresenta algumas vantagens tais como, rápida resposta, menores tempos de análise já que não há necessidade de tratamento sofisticado da amostra, baixo custo, simplicidade de preparação, além de elevadas sensibilidade e

seletividade, sendo uma boa opção para a determinação de compostos fenólicos de forma precisa e exata.

1.11 Sulfito

Agentes sulfítantes, tais como sulfito de sódio, dióxido de enxofre, hidrogenossulfito de sódio e de potássio e metabissulfito de sódio e de potássio, entre outros, são utilizados como aditivos (E220-228) em alimentos e bebidas para prevenir a deterioração provocada por fungos, bactérias e leveduras em alimentos ácidos, e na inibição de reações de escurecimento enzimático e não enzimático durante processamento e estocagem¹²⁹. Todos eles são quimicamente equivalentes (SO_2 , HSO_3^- , SO_3^{2-} e $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$) após incorporação em alimentos ou bebidas a um dado pH. Em soluções aquosas^{73,130,131}, pode-se escrever os equilíbrios do dióxido de enxofre (Equações 8 – 10), uma vez que o SO_2 é um gás bastante solúvel em água:



A solubilidade de SO_2 em solução aquosa é calculada empregando-se a constante de Henry (H), que é igual a $1,242 \text{ mol L}^{-1} \text{ atm}^{-1}$ a 25°C . Os valores dos pK_{as} para o ácido sulfuroso são 1,91 (pK_{a1}) e 7,18 (pK_{a2}), característicos de um ácido fraco diprótico. A espécie metabissulfito ($\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$) em solução aquosa é convertida a hidrogenossulfito (HSO_3^-) e está representada na Equação 11:



Na FIGURA 1.13 está apresentada a curva de distribuição das duas espécies ionizadas do dióxido de enxofre em diferentes pHs. Entre pH 1,9 e 7,2 a espécie predominante é o íon bissulfito ou hidrogeno sulfito (HSO_3^-), em valores de pHs menores que 1,8 o SO_2 molecular prevalece, já para pHs maiores que 7,2 o íon sulfito (SO_3^{2-}) predomina. É importante ressaltar que alguns autores^{131,132}

apresentaram a distribuição das espécies iônicas para o sulfito, trazendo valores de pK_{as} próximos aos citados acima, mas graficamente, o valor de pK_{a2} foi apresentado de maneira errônea (em torno de 5,3), o que altera drasticamente as espécies presentes em pH 6,0, por exemplo.

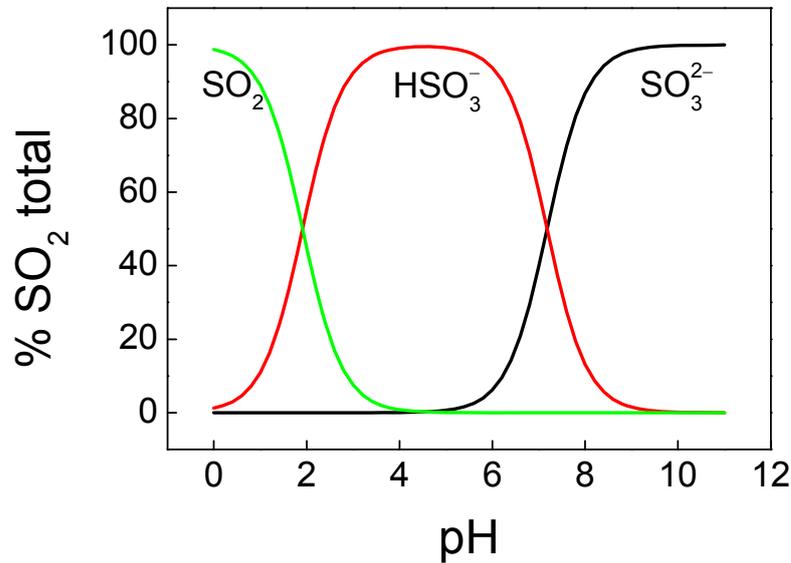


FIGURA 1.13 – Distribuição das espécies ionizadas de dióxido de enxofre com o pH.

Em particular, o dióxido de enxofre é largamente utilizado na fabricação de vinhos para prevenir a oxidação e inibir o crescimento bacteriano, o que muitas vezes conduz à deterioração do vinho. O nível de dióxido de enxofre permitido no vinho é de 350 mg L^{-1} . A TABELA 1.2 apresenta os limites máximos permitidos para adição de agentes sulfitantes em diversas bebidas, conforme legislação brasileira vigente.

TABELA 1.2 – Limites máximos permitidos para adição de agentes sulfitantes em bebidas, conforme legislação brasileira vigente¹³³

Bebidas	Limite máximo (mg/L) (expresso em SO₂)
Cervejas	20,0
Cooler	350
Licores de frutas	100
Refrigerantes	40,0
Saquês	350
Sidras	350
Sucos de frutas	200
Vinhos	350
Vinhos de frutas	350
Xarope de glicose	40,0

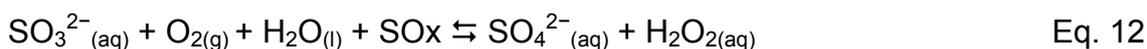
Esses limites estabelecidos são importantes, pois o SO₂ é tóxico para algumas pessoas e pode causar reações alérgicas, tais como náuseas, diarreia, irritação gástrica, urticária ou inchaço, e principalmente ataques de asma¹²⁹. A ingestão diária aceitável de sulfito (expresso como SO₂) é de 0,7 mg/kg peso corpóreo, incluindo todas as espécies contendo S(IV). Assim, uma pessoa de 70 kg que não possui alergia a sulfito pode ingerir a quantidade máxima de 49 mg de sulfito por dia, ou consumir 1,225 L de refrigerante ou 140 mL de vinho diariamente.

Nesse contexto, o desenvolvimento de um procedimento analítico preciso para monitorar a concentração de SO₂ em vinhos é requerido na indústria de bebidas para verificar se o produto cumpre os requisitos de qualidade.

Vários métodos para a determinação analítica de sulfito foram relatados na literatura, tais como os espectrofotométricos¹⁰⁸, de eletroforese capilar¹³⁴ e cromatográficos¹³⁵. No entanto, estes possuem algumas desvantagens, tais como custo elevado, longos tempos de análise, necessidade de pré-tratamento da amostra, e em alguns casos baixa sensibilidade, tornando-os impróprios para análises de rotina. A titulação iodométrica¹³⁶ é o método oficial preconizado pela Associação Oficial de Química Analítica (AOAC) para determinação de sulfito em alimentos e bebidas. O método mais comum e generalizado para análise de sulfito foi originalmente desenvolvido por MONIER-WILLIAMS¹³⁷, mas esta titulação

clássica é precedida de destilação da amostra, procedimento bastante moroso que requer um analista muito hábil para garantir boa precisão. Uma limitação importante dos protocolos que envolvem titulação iodométrica é que são mais adequados para amostras incolores, uma vez que o ponto final é detectado pela formação de um complexo iodo-amido de coloração azul intensa. Assim, métodos mais simples têm sido desenvolvidos atualmente para determinação de sulfito em alimentos e bebidas, em especial, procedimentos eletroanalíticos utilizando sensores e biossensores¹³⁸.

Os biossensores desenvolvidos para determinação de sulfito são geralmente, baseados no monitoramento eletroquímico do oxigênio consumido ou de peróxido de hidrogênio produzido durante a reação enzimática catalisada pela enzima sulfito oxidase (SOx), que converte sulfito a sulfato¹³⁹, segundo a Equação 12:



Assim, o desenvolvimento de novos biossensores para a determinação de sulfito é de grande interesse uma vez que levam a determinações rápidas, seletivas e precisas, minimizando custos e o tempo gasto em demoradas etapas de pré-tratamento de amostras^{75,107,140-145}.

OBJETIVOS

CAPÍTULO 2

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi utilizar nanomateriais como os nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro em filme de dihexadecil hidrogenofosfato (DHP) e/ou hidrocloreto de polialilamina (PAH) no desenvolvimento e construção de novas arquiteturas de biossensores eletroquímicos enzimáticos para a determinação de amostras ambientais e alimentares. O emprego destes nanomateriais tem o intuito de melhorar a transferência eletrônica entre o biossensor e o analito, devido às propriedades de eletrocatalise que os mesmos podem promover, obtendo-se assim, biossensores com maior seletividade, o que implica em menor interferência de outras espécies que possam estar presentes na amostra de interesse.

BIOSSENSOR DE TIROSINASE BASEADO EM UM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO, 1-BUTIL-3-METIL-IMIDAZOL E DIHEXADECIL HIDROGENOFOSFATO PARA A DETERMINAÇÃO DE CATECOL

CAPÍTULO 3

3 Biossensor de tirosinase baseado em um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono, 1-butil-3-metilimidazol e dihexadecil hidrogenofosfato para a determinação de catecol

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver um biossensor modificando a superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com a enzima tirosinase (Tyr) imobilizada em nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados (MWCNTs) e o líquido iônico 1-butil-3-metilimidazol (BMIM) em filme de dihexadecil hidrogenofosfato (DHP) para a determinação de catecol.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 Reagentes

Tirosinase 50 kU extraída de cogumelo (CAS: 9002-10-2), dihexadecil hidrogenofosfato (CAS: 2197-63-9), nanotubos de carbono de paredes múltiplas (20-30 nm de diâmetro, espessura da parede 1-2 nm e 0,5-2 μm de comprimento e grau de pureza $\geq 95\%$) (CAS: 308068-56-6), 1etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (98%) (CAS: 25952-53-8), cloreto de 1-butil-3-metilimidazol (CAS: 79917-90), N-hidroxisuccinimida (98%) (CAS: 6066-82-6), catecol (99%) (CAS: 120-80-9) e 4-aminoantipirina (CAS: 83-07-8) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Todos os outros produtos químicos foram de grau analítico. A solução estoque de catecol 0,01 mol L⁻¹ foi preparada em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), que foi obtido utilizando NaH₂PO₄ e Na₂HPO₄. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida por um sistema Milli-Q (resistividade > 18 M Ωcm). O tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) foi empregado como eletrólito suporte em todas as medidas com o biossensor.

3.2.2 Medidas eletroanalíticas

As medidas eletroanalíticas foram executadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT12 (Utrecht, Holanda) Autolab Ecochemie e os dados foram tratados usando o software GPES 4.9.

A determinação dos pHs das soluções foi realizada em um pHmetro digital ORION, modelo EA 940, conectado a um eletrodo combinado de vidro Digimed com um eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹).

3.2.3 Célula eletroquímica

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula de compartimento único de 50 mL, confeccionada em vidro borossilicato e equipada com uma tampa de Teflon[®]. Uma alíquota de 20 mL de eletrólito suporte foi sempre adicionada para a realização das medidas eletroquímicas. Todos os experimentos foram realizados à temperatura controlada de 25 ± 1 °C.

3.2.4 Eletrodos

Utilizou-se um sistema de três eletrodos, com o eletrodo de trabalho sendo o biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE, uma placa de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência à qual todos os potenciais foram referidos.

3.2.5 Morfologia

A caracterização da superfície dos filmes contendo nanotubos de carbono e líquido iônico foi realizada empregando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) de alta resolução, utilizando um equipamento modelo Supra 35-VP (Carl Zeiss, Alemanha) com feixe de elétrons de 25 keV. Um disco de carbono vítreo foi usado para a imobilização da dispersão de BMIM-MWCNTs-DHP e Tir-BMIM-MWCNTs-DHP, usando o mesmo processo de preparo empregado para a preparação dos eletrodos.

3.2.6 Funcionalização dos nanotubos de carbono (tratamento ácido)

Os MWCNTs foram inicialmente purificados com uma solução de HCl 2,0 mol L⁻¹ para remover impurezas metálicas. Em seguida foram submetidos a um pré-tratamento químico utilizando uma mistura de ácido nítrico e ácido sulfúrico concentrados 3:1 (v/v) durante 12 h a temperatura ambiente. Após esse período, a suspensão foi centrifugada, o sólido foi lavado várias vezes com água ultrapura até pH 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 por bombeamento empregando-se uma bomba peristáltica. Finalizando-se o processo, secaram-se os nanotubos funcionalizados por 6 h em uma estufa a 120 °C. Como visto na Seção 1.4.2, o tratamento ácido promove o aparecimento de grupos polares hidrofílicos na superfície dos nanotubos, tais como grupos carboxilas (–COOH), hidroxilas (–OH), quinonas (–C(=O)), nitros (–NO₂), aminas (–NH₂) ou sulfônicos (–SO₃H) nas extremidades ou nos defeitos das paredes da estrutura dos nanotubos³⁸⁻⁴³.

3.2.7 Preparação do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE

Inicialmente, um eletrodo de carbono vítreo (GCE, 5 mm de diâmetro) foi cuidadosamente polido com suspensões de micropartículas de alumina de 0,3 e 0,05 µM respectivamente. Em seguida este foi lavado abundantemente com água ultrapura. O GCE foi então sonicado em álcool isopropílico durante três minutos e posteriormente com água ultrapura por cerca de cinco minutos. Por fim deixou-se secar a temperatura ambiente.

Uma massa de 1,0 mg de MWCNTs e 1,0 mg de DHP foi adicionada a 700 µL de uma solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e a mistura submetida a ultrassom durante 30 minutos de modo a formar uma suspensão estável de MWCNTs-DHP. Em seguida, 100 µL de uma solução de BMIM 50 mg/mL (em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹) foram adicionados e a mistura submetida a ultrassom durante mais 30 minutos. Em seguida, uma alíquota de 200 µL de solução contendo EDC 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ e NHS 2,0 × 10⁻² mol L⁻¹ foram adicionados à suspensão para reação de acoplamento dos grupos carboxílicos, realizada durante 2 h sob agitação magnética. Deste modo, obteve-se uma suspensão estável contendo 1,0 mg de MWCNTs, 1,0 mg de DHP e 5,0 mg de BMIM por mL. Então, uma massa de 1,2 mg da enzima Tyr (2000 U) foi adicionada à dispersão de MWCNTs e agitou-se durante mais 2 h com o auxílio de um agitador mecânico. Durante a mistura, os grupos amino (–NH₂) da enzima Tyr foram ligados covalentemente sobre a superfície dos MWCNTs, através dos grupos carboxílicos (–COOH) pelo acoplamento com EDC/NHS. Finalmente, 20 µL da suspensão de Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP foi gotejado sobre a superfície do GCE com o auxílio de uma micropipeta e deixou-se secar à temperatura ambiente durante 12 h. Na FIGURA 3.1 é apresentado o mecanismo de imobilização da enzima Tyr no eletrodo BMIM-

MWCNTs-DHP/GCE. O biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE foi armazenado a 4 °C em refrigerador em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), quando não em uso.

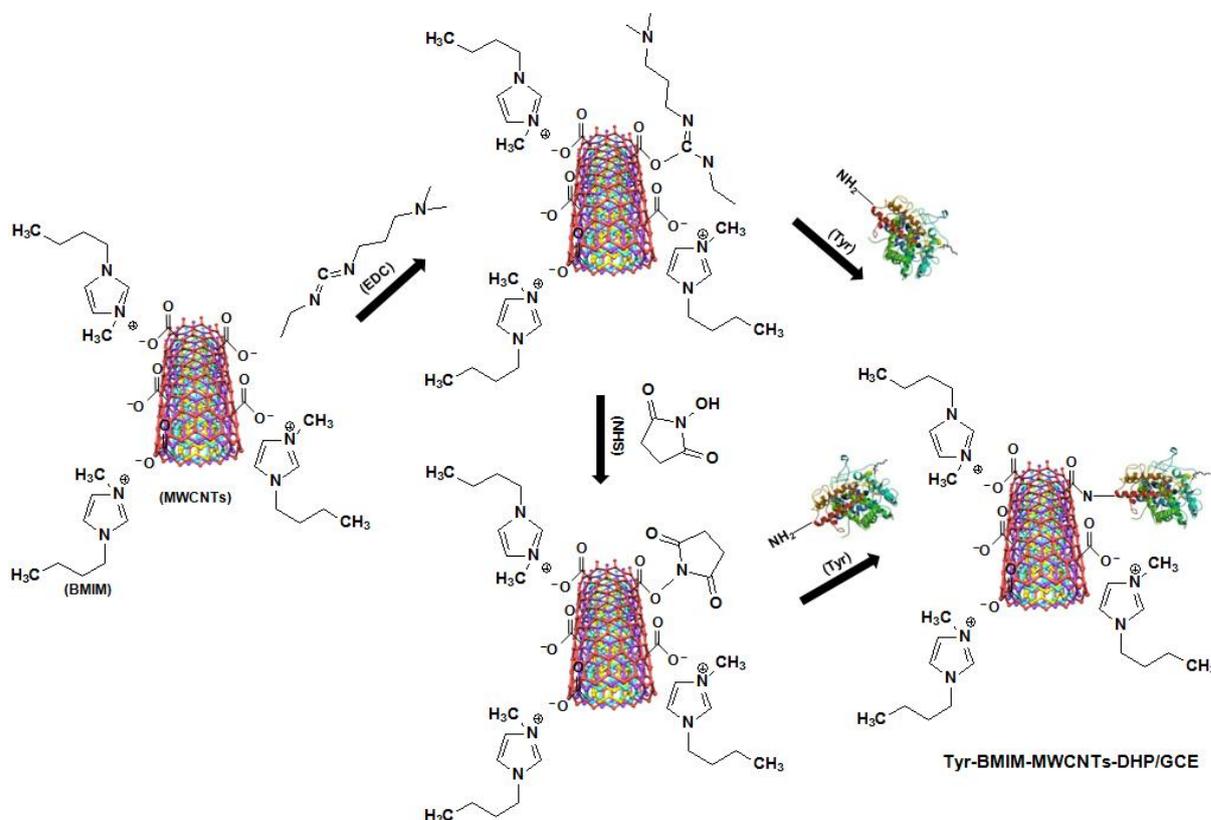


FIGURA 3.1 – Esquema da reação entre BMIM, EDC e NHS com MWCNTs e a enzima Tyr, na preparação do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE.

3.2.8 Preparação das amostras de água fortificadas

Amostras de água natural (A – C) foram coletadas da represa na Universidade Federal de São Carlos (cidade de São Carlos) (GPS A = 21°59'09.47"S 47°52'56.07"W, B = 21°59'10.45"S 47°52'55.31"W e C = 21°59'07.53"S 47°52'51.01"W). Uma amostra de água de torneira (D) foi coletada na mesma universidade. Uma alíquota fixa de 25 mL de cada uma das amostras foi transferida para quatro balões volumétricos de 50 mL. Em seguida, uma alíquota de 5,0 mL de uma solução padrão de catecol $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ foi cuidadosamente adicionada a estes balões. O volume final foi completado com as próprias amostras de modo a se obter uma concentração de catecol de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Então, as amostras foram agitadas, a fim de homogeneizar as soluções. Todas as soluções foram utilizadas sem qualquer pré-tratamento e foram preparadas diariamente para as medidas. A concentração de catecol em cada amostra foi determinada pelo

método de adição de padrão. Para cada amostra, três determinações foram realizadas, e os desvios-padrão foram calculados.

3.2.9 Método de referência

O método espectrofotométrico¹¹⁹ foi utilizado para comparar os resultados obtidos com o método proposto por voltametria de varredura linear (LSV).

Este método envolve a construção de uma curva analítica pela monitoração de antipirina formada pela reação entre 4-aminoantipirina e catecol. A solução do branco, das amostras e dos padrões foram tratadas da seguinte maneira: um volume de 100 mL foi transferido para um Becker de 250 mL e uma alíquota de 2,5 mL de uma solução de $\text{NH}_{3(\text{aq})}$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionada, e o pH ajustado para 7,9 com tampão fosfato. Em seguida, 1,0 mL de uma solução de 4-aminoantipirina $20,0 \text{ g L}^{-1}$ foi adicionada e agitou-se bem, em seguida, adicionou-se 1,0 mL de uma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $80,0 \text{ g L}^{-1}$ e homogenizou-se. Após 15 minutos, as absorbâncias (branco, amostras e padrões) foram determinadas em relação ao branco em 500 nm.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Teste de dispersão

Os CNTs são insolúveis em muitos solventes, sobretudo em água. A literatura relata o uso de diversas substâncias para melhorar a dispersibilidade dos CNTs em solução aquosa, dentre elas Nafion¹⁴⁶, CTAB¹⁴⁷ (brometo de acetil trimetilamônio), quitosana^{13,16}, DHP^{47,61} e PAH^{46,77}.

Foi realizado um ensaio da dispersão dos MWCNTs em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e em solução de DHP. São apresentados na FIGURA 3.2 as imagens dos frascos contendo: MWCNTs dispersos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (A), solução de DHP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) (B) e MWCNTs dispersos em solução de DHP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) (C). Observe-se que os MWCNTs dispersos em tampão fosfato foram para o fundo do frasco após repouso da solução.

Ao se dispersar os MWCNTs com DHP observou-se a formação de uma dispersão estável e homogênea de MWCNTs-DHP, em meio de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

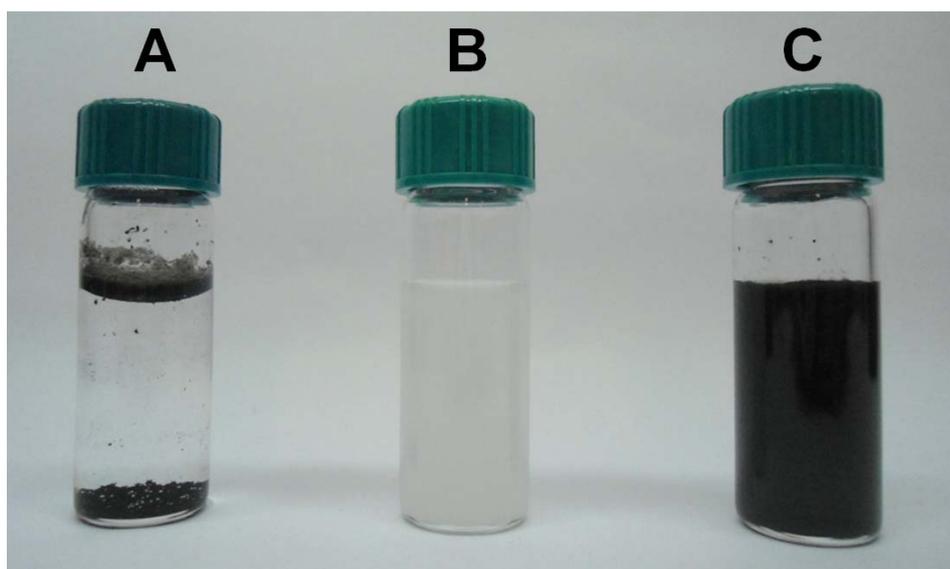


FIGURA 3.2 – Imagens de frascos contendo MWCNTs 1 mg mL^{-1} dispersos em água (A), solução de DHP 1 mg mL^{-1} em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) (B) e MWCNTs 1 mg mL^{-1} dispersos em solução de DHP 1 mg mL^{-1} em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) (C), levados ao ultrassom durante 30 minutos e após repouso de dez minutos.

3.3.2 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado BMIM-MWCNTs-DHP/GCE

Os eletrodos BMIM-MWCNTs-DHP/GCE foram caracterizados eletroquimicamente. A combinação entre os MWCNTs funcionalizados e BMIM resulta em um nanocompósito com boa condutividade e biocompatibilidade⁹⁰, características essas que são de grande interesse, principalmente no desenvolvimento de biossensores já que promovem um aumento da resposta eletroquímica. Além disso, o filme proposto pode aumentar a área eletroativa do eletrodo, como mostrado abaixo.

As áreas eletroativas dos eletrodos GCE, DHP/GCE, BMIM-DHP/GCE, MWCNTs-DHP/GCE e BMIM-MWCNTs-DHP/GCE foram estimadas em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em presença de hexacianoferrato (II) de potássio $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, aplicando-se a equação de Randles-Sevcik^{148,149} (Equação 13) para um processo reversível:

$$I_{pa} = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} AD^{1/2} C v^{1/2}$$

Eq. 13

onde I_{pa} é a corrente de pico anódica (A), n é o número de elétrons envolvidos na reação redox, A é a área eletroativa (cm^2), D é o coeficiente de difusão de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($6,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)¹⁵⁰, ν é a velocidade de varredura de potencial (V s^{-1}) e C é a concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em solução (mol cm^{-3}). Os coeficientes angulares dos gráficos de I_{pa} vs. $\nu^{1/2}$ para o processo de oxidação (dados não apresentados) foram: $4,77 \times 10^{-5}$; $2,29 \times 10^{-5}$; $3,11 \times 10^{-5}$; $7,44 \times 10^{-5}$ e $11,0 \times 10^{-5} \text{ A V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$ para GCE, DHP/GCE, BMIM-DHP/GCE, MWCNTs-DHP/GCE e BMIM-MWCNTs-DHP/GCE, respectivamente. As áreas eletroativas foram estimadas em 0,071; 0,034; 0,046; 0,111 e 0,164 cm^2 para GCE, DHP/GCE, BMIM-DHP/GCE, MWCNTs-DHP/GCE e BMIM-MWCNTs-DHP/GCE, respectivamente (TABELA 3.1). Na FIGURA 3.3 são apresentados os voltamogramas cíclicos para GCE, DHP/GCE, BMIM-DHP/GCE, MWCNTs-DHP/GCE e BMIM-MWCNTs-DHP/GCE, respectivamente para uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . O GCE apresentou uma área eletroativa 2,1 vezes maior do que o eletrodo modificado com DHP (DHP/GCE), o que aponta que a presença do DHP leva a um bloqueio parcial da superfície ativa do GCE, dificultando a transferência eletrônica e causando uma diminuição do sinal analítico. A combinação dos MWCNTs com o BMIM (BMIM-MWCNTs-DHP/GCE) aumentou a área ativa do eletrodo em 2,3 vezes em comparação ao GCE. Esse aumento pode ser atribuído ao desenvolvimento dos MWCNTs promovido pelo BMIM através de interações 'cátions- π ' entre o cátion imidazol do BMIM e os elétrons- π da superfície dos MWCNTs, aumentando assim, a área superficial eletroativa devido ao aumento de sítios eletroativos expostos dos MWCNTs^{49,92,151}.

TABELA 3.1 – Área eletroativa de diferentes eletrodos em meio de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte

Eletrodo	Área ativa (cm^2)
GCE	0,071
DHP/GCE	0,034
BMIM-DHP/GCE	0,046
MWCNTs-DHP/GCE	0,111
BMIM-MWCNTs-DHP/GCE	0,164

Área geométrica = $0,196 \text{ cm}^2$

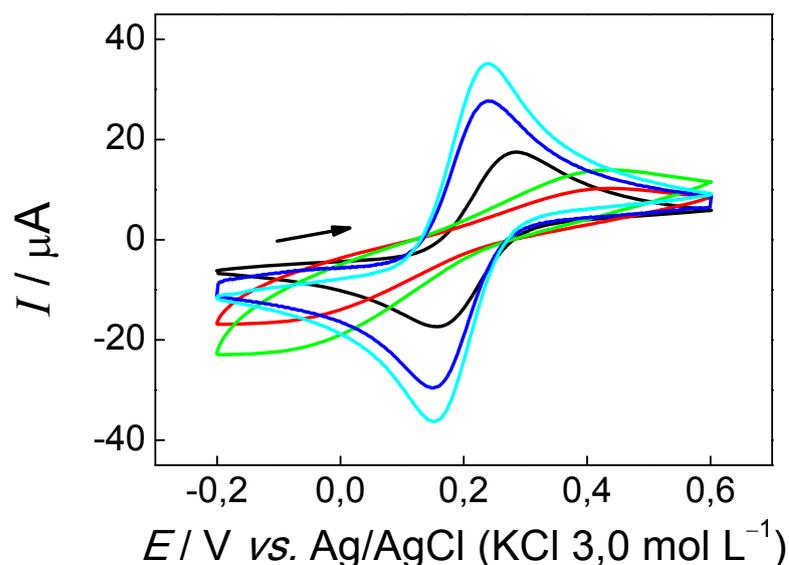


FIGURA 3.3 – Voltamogramas cíclicos, após subtração do branco, para os eletrodos GCE (–), DHP/GCE (–), BMIM-DHP/GCE (–), MWCNTs-DHP/GCE (–) e BMIM-MWCNTs-DHP/GCE (–) para uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

3.3.3 Efeito da concentração de BMIM

A influência da concentração de BMIM no filme foi avaliada na faixa de $3,0$ a 10 mg mL^{-1} , para uma concentração fixa de MWCNTs e DHP de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. A concentração de MWCNTs e DHP foram mantidas nessa mesma razão com base nos trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa^{47,67}. Neste estudo, utilizou-se $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$, em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . A corrente de pico aumentou com o aumento da concentração de BMIM até $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$, conforme apresentado na FIGURA 3.4. Quando a concentração de BMIM foi superior a $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ a corrente de pico diminuiu de forma significativa. Assim, adotou-se uma concentração de BMIM de $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ para estudos posteriores.

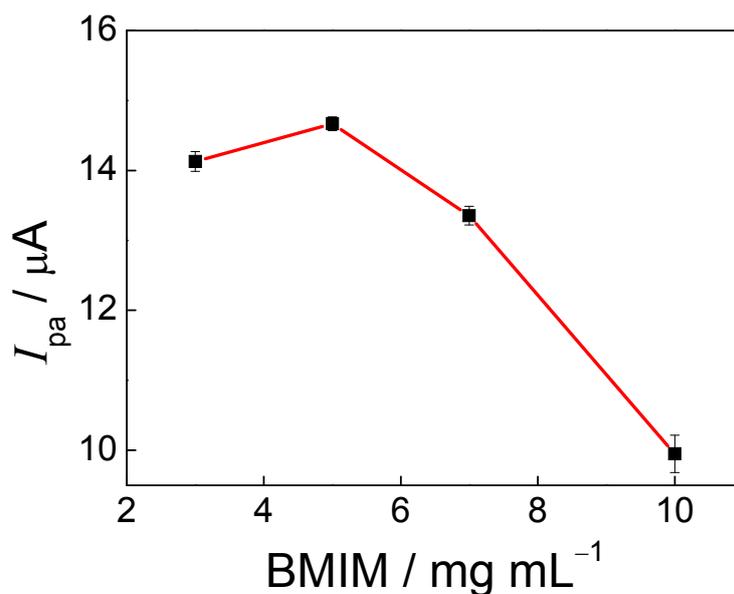


FIGURA 3.4 – Efeito da concentração de BMIM (mg mL^{-1}) utilizada no filme em relação ao sinal analítico.

Verificou-se a estabilidade do filme BMIM-MWCNTs-DHP, já que o IL utilizado é hidrofílico, ou seja, miscível em água. Então, o BMIM-MWCNTs-DHP/GCE foi colocado em uma célula eletroquímica contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} e KCl $0,1$ mol L^{-1} e foram realizados 50 ciclos sucessivos na faixa de potencial de trabalho de $-0,2$ a $0,6$ V a 100 mV s^{-1} usando-se voltametria cíclica. Observou-se que o filme de BMIM-MWCNTs-DHP se mostrou bastante estável na superfície do GCE por diversas medidas, conforme apresentado na FIGURA 3.5. A resposta voltamétrica (corrente e potencial de pico) obtida no BMIM-MWCNTs-DHP/GCE para o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ficou praticamente inalterada após 50 ciclos de potencial. Esses resultados concordam com o trabalho de YU e colaboradores¹⁵² que estudaram o comportamento de filmes formados por ILs miscíveis em água sobre a superfície de GCE. Apesar do IL ser miscível com a água, ele ficou imobilizado no eletrodo provavelmente por atração eletrostática como mostrado na FIGURA 3.1.

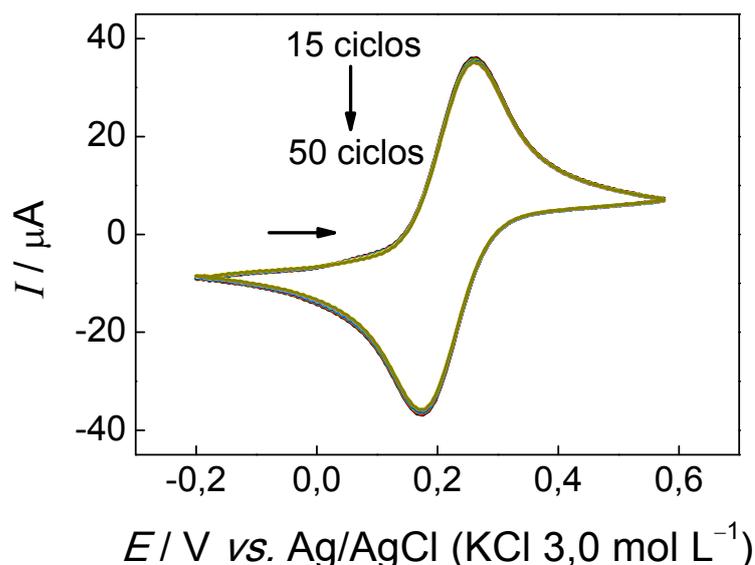


FIGURA 3.5 – Voltamogramas cíclicos obtidos, após subtração do branco, para o eletrodo BMIM-MWCNTs-DHP/GCE, na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

3.3.4 Caracterização eletroquímica do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE

A enzima Tyr foi imobilizada ao filme BMIM-MWCNTs-DHP usando 1etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) conforme descrito anteriormente. Conforme descrito por JANEGITZ e colaboradores⁴⁷, o EDC promove a formação de ligações amida, formando um complexo estável com grupos aminoácidos expostos. Adiciona-se NHS às reações EDC para aumentar a estabilidade do intermediário ativo, levando a um aumento do número de ligações de moléculas carboxiladas com grupos amino expostos das enzimas. Na FIGURA 3.6 são apresentadas as imagens de MEV do BMIM-MWCNTs-DHP (A) e Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP (B) na superfície do GCE. Pode ser observado que os MWCNTs estão distribuídos uniformemente no filme nanocompósito BMIM-MWCNTs-DHP (FIGURA 3.6 A), e que a Tyr imobilizada na superfície do filme de BMIM-MWCNTs-DHP pode ser observada como um material aglomerado (FIGURA 3.6 B).

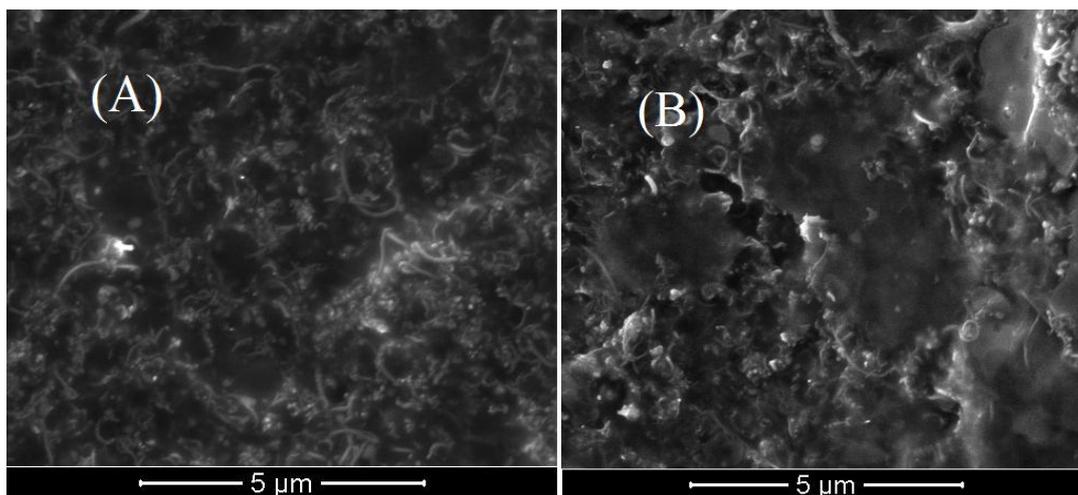


FIGURA 3.6 – Imagens obtidas por MEV da superfície do: (A) BMIM-MWCNTs-DHP/GCE e (B) Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE.

O comportamento eletroquímico do catecol foi avaliado utilizando o biossensor proposto. Na FIGURA 3.7 são apresentados os voltamogramas cíclicos (CVs), obtidos para os biossensores Tyr-MWCNTs-DHP/GCE e Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE, após trinta ciclos, em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) na presença de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Como pode-se observar, a presença de BMIM no biossensor leva a um aumento considerável na resposta eletroquímica. Nas mesmas condições, o Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE (FIGURA 3.7 (–)), apresenta uma resposta voltamétrica mais elevada (maiores correntes de pico anódica e catódica) do que o biossensor na ausência de BMIM (FIGURA 3.7 (–)). Assim, a corrente de pico catódica aumentou de $-3,8 \text{ } \mu\text{A}$ no Tyr-MWCNTs-DHP/GCE para $-7,6 \text{ } \mu\text{A}$ no Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE e a corrente de pico anódica foi de $2,9 \text{ } \mu\text{A}$ para $7,7 \text{ } \mu\text{A}$ para o biossensor contendo BMIM. Os voltamogramas cíclicos se mostraram similares para o eletrodo modificado na ausência da Tyr, BMIM-MWCNTs-DHP/GCE (FIGURA 3.7 (–)), no entanto, as correntes de oxidação e redução são cerca de 30% menores, uma vez que não ocorre um efeito adicional da conversão enzimática de catecol a *o*-quinona (que pode ser reduzida e então re-oxidada).

O biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE apresentou correntes de pico anódica e catódica bem definidas, com magnitudes similares e quase simétricas em $0,300$ e $0,040 \text{ V}$ (velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}), respectivamente, com uma razão de I_{pa}/I_{pc} igual a um, potencial formal de 170 mV e separação entre os picos (ΔE_p) de 260 mV . A presença de BMIM no biossensor mostrou uma melhora

na reversibilidade do sistema, quando comparado ao biossensor na ausência de BMIM, o qual apresentou um ΔE_p de 383 mV.

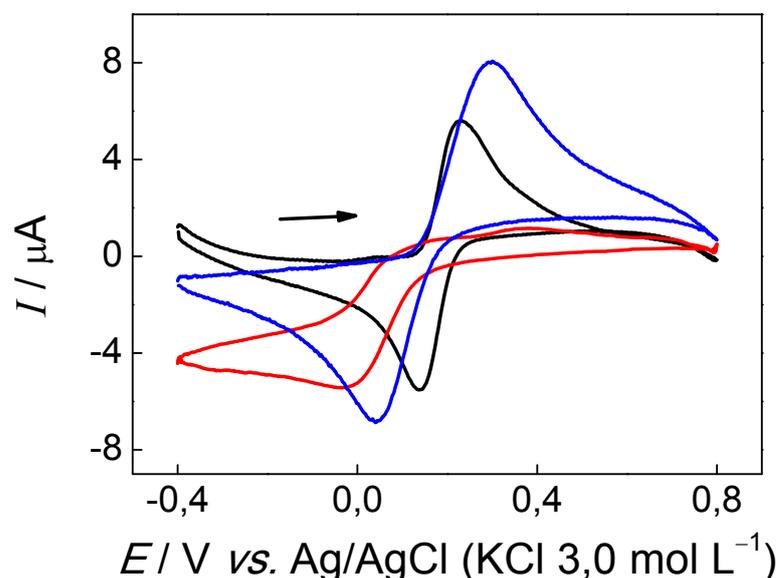


FIGURA 3.7 – Voltamogramas cíclicos, após subtração do branco, do biossensor Tyr-MWCNTs-DHP/GCE (—), do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE (—) e do sensor BMIM-MWCNTs-DHP/GCE (—) após 30 ciclos, na presença de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) como eletrólito suporte e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Estes resultados mostram um efeito sinérgico devido a união do BMIM e os MWCNTs, que combinam a elevada condutividade do líquido iônico com a atividade eletrocatalítica e/ou aumento do sinal analítico promovido pelos MWCNTs.

3.3.5 Efeito da velocidade de varredura

O efeito da velocidade de varredura na resposta analítica do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE foi avaliado na presença de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Houve um deslocamento nos potenciais de pico redox e um aumento da separação pico-a-pico com o aumento da velocidade de varredura (FIGURA 3.8). A dependência das correntes de pico anódica e catódica com a velocidade de varredura de 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 e 200 mV s^{-1} e mostrou uma relação linear (FIGURA 3.8 – inserida) indicando que o processo é controlado pela monocamada redox contendo a Tyr imobilizada e pode ser tratado utilizando as equações de Laviron^{153,154} (Equações 14 – 16):

$$E_{pc} = E^{\circ} + \frac{2.3RT}{\alpha nF} \left\{ \log \frac{\alpha nF}{RTk_s} + \log v \right\} \quad \text{Eq. 14}$$

$$E_{pa} = E^{\circ} - \frac{2.3RT}{(1-\alpha)nF} \left\{ \log \frac{(1-\alpha)nF}{RTk_s} + \log v \right\} \quad \text{Eq. 15}$$

$$\Delta E_p = \frac{2.3RT}{\alpha(1-\alpha)nF} \left\{ \alpha \log(1-\alpha) + (1-\alpha) \log \alpha - \log \frac{RTk_s}{nF} + \log v \right\} \quad \text{Eq. 16}$$

onde E_{pa} e E_{pc} são os potenciais de pico anódico e catódico, respectivamente, $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$, α é o coeficiente de transferência de carga, v é a velocidade de varredura de potencial ($V s^{-1}$), k_s é a constante de transferência heterogênea de elétrons (s^{-1}), R é a constante universal dos gases ideais ($8,314 J mol^{-1} K^{-1}$), F é a constante de Faraday ($96485 C mol^{-1}$) e T é a temperatura em Kelvin ($298,15 K$).

A partir do coeficiente angular do gráfico de potencial de pico anódico e catódico vs. o logaritmo da velocidade de varredura (FIGURA 3.9 – inserida), o valor calculado para α_{an} foi de 0,92 e $\alpha_{cn} = 1,08$ o que sugere fortemente que $n = 2$, verificado a seguir. O valor de k_s estimado foi de $35,1 \pm 0,8 s^{-1}$, calculado a partir do gráfico de ΔE_p vs. o logaritmo da velocidade de varredura (FIGURA 3.9). Este valor é cerca de dez vezes maior do que o relatado anteriormente por WANG e colaboradores¹²⁰ para o eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno e poli(cloreto de dialildimetilamônio) funcionalizado ($k_s = 3,85 s^{-1}$). Este alto valor obtido indica a grande capacidade do biossensor proposto para promover a transferência de elétrons entre a *o*-quinona e a superfície do eletrodo, e pode ser atribuído à estrutura dos MWCNTs funcionalizados que têm um grande número de defeitos, bem como o efeito sinérgico entre os MWCNTs e o BMIM, em promover a eletrocatalise da *o*-quinona.

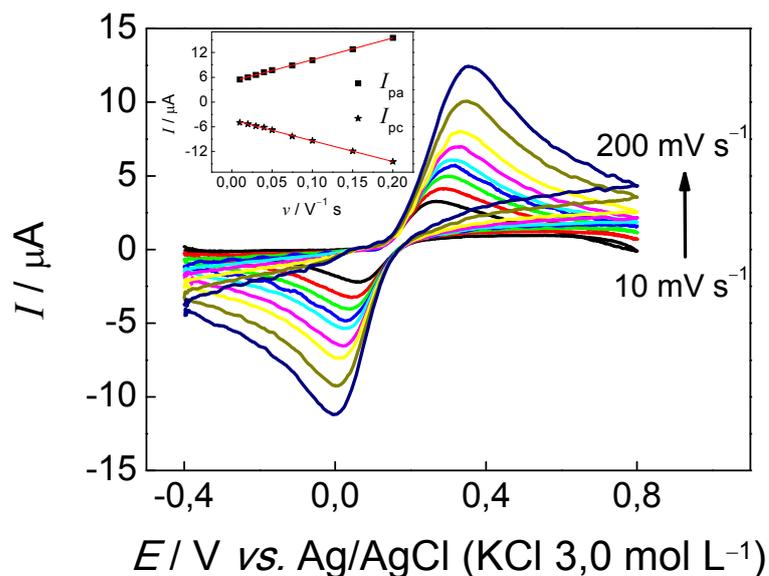


FIGURA 3.8 – CVs, após subtração do branco, do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE em várias velocidades de varredura de 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 e 200 mV s^{-1} , na presença de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Inserido: Correntes de pico anódica e catódica versus a velocidade de varredura.

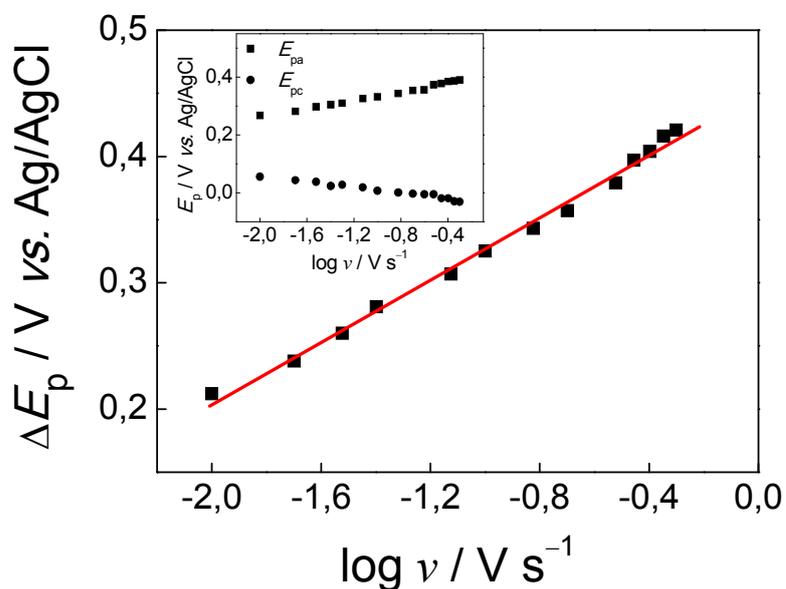


FIGURA 3.9 – ΔE_p versus logaritmo da velocidade de varredura ($\log \nu$). Inserido: Potenciais de pico (E_p) anódico e catódico versus logaritmo da velocidade de varredura ($\log \nu$).

3.3.6 Efeito do pH

A influência do pH da solução (concentração hidrogeniônica) sobre a corrente de pico catódica do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE foi avaliada em presença de solução de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . A literatura reporta que a enzima Tyr perde sua atividade irreversivelmente abaixo de pH 4,5 e acima de pH 9,3^{122,155,156}, então a faixa de pH selecionada neste estudo variou de 5,5 a 8,0. As correntes de pico catódica aumentaram com o aumento do pH até 7,0, como se observa na FIGURA 3.10 A (inserida). Acima de pH 7,0 as correntes de pico diminuíram. Portanto, uma solução tampão fosfato pH 7,0 foi selecionada como eletrólito suporte para estudos posteriores.

O efeito do pH da solução sobre os potenciais de pico anódico e catódico do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE também foi avaliado. Como pode ser observado na FIGURA 3.10, um aumento de pH provoca um deslocamento para potenciais de pico menores. A FIGURA 3.10 B (inserida) apresenta um gráfico de potencial formal ($E^{\circ'} = (E_{pa} + E_{pc}) / 2$) em função do pH. Neste estudo, o potencial formal apresentou uma dependência linear com o pH segundo a equação $E^{\circ'}(\text{V}) = 0,554 - 0,054 \text{ pH}$ com um coeficiente de correlação de 0,996.

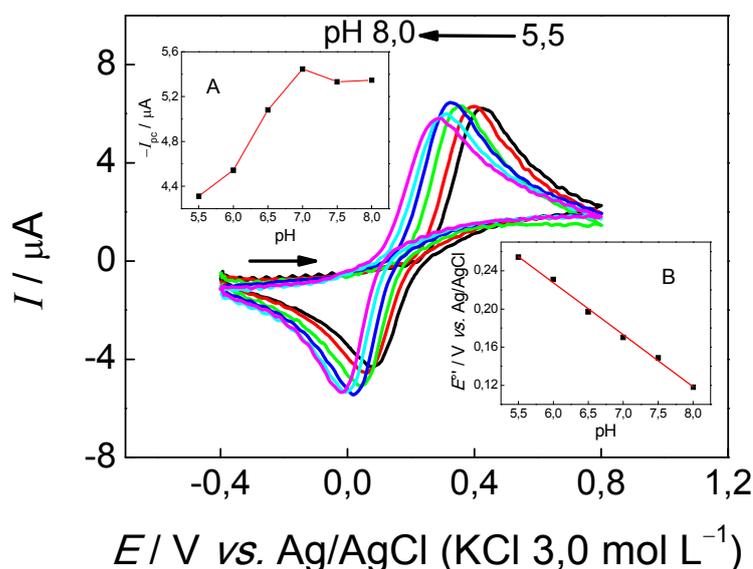


FIGURA 3.10 – CVs do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE em presença de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pHs de 5,5 até 8,0. Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} . Inserido: (A) Influência do pH na corrente de pico catódica. (B) Dependência do $E^{\circ'}$ versus pH.

O valor do coeficiente angular obtido de -54 mV pH^{-1} em consonância com o valor teórico de $-59,2 \text{ mV pH}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, para um processo reversível, indica a participação do mesmo número de prótons e elétrons^{121,124} e corrobora com as reações enzimática (Equação 17) e eletroquímica (Equação 18) em que a *o*-quinona produzida na reação enzimática é reduzida eletroquimicamente a catecol na superfície do eletrodo.



Uma representação esquemática destes processos é mostrada na FIGURA 3.11.

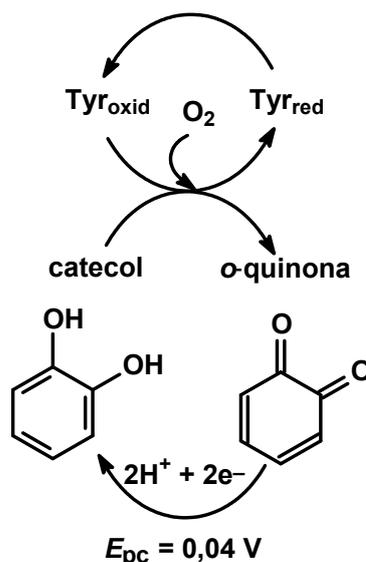


FIGURA 3.11 – Representação esquemática da redução da *o*-quinona produzida na reação enzimática catalisada pela enzima Tyr na presença de oxigênio no biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE. Oxid: forma oxidada e Red: forma reduzida.

3.3.7 Determinação de catecol por voltametria de varredura linear

A dependência da corrente de pico catódica para a redução de *o*-quinona a catecol com a velocidade de varredura em LSV foi avaliada no intervalo

de 10 a 150 mV s^{-1} na presença de catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Observou-se um aumento linear da magnitude da corrente de pico, com o aumento da velocidade de varredura até 100 mV s^{-1} (dados não apresentados). Assim, esta velocidade de varredura foi escolhida para a construção da curva analítica. Na FIGURA 3.12 são apresentados os voltamogramas de varredura linear obtidos e a curva analítica (inserida) obtida para o catecol usando o biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE proposto.

O biossensor proposto utilizando a técnica de LSV apresentou uma resposta linear para catecol no intervalo de concentração de $4,9 \times 10^{-6}$ a $1,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, segundo a equação $\Delta I_{pc} (\mu\text{A}) = 0,69 + 3,28 \times 10^4 C (\text{mol L}^{-1})$ com coeficiente de correlação de 0,998. O limite de detecção obtido (calculado a partir da relação: três vezes o desvio padrão para a solução do branco ($n = 10$), dividido pelo coeficiente angular da equação da curva analítica) foi de $5,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

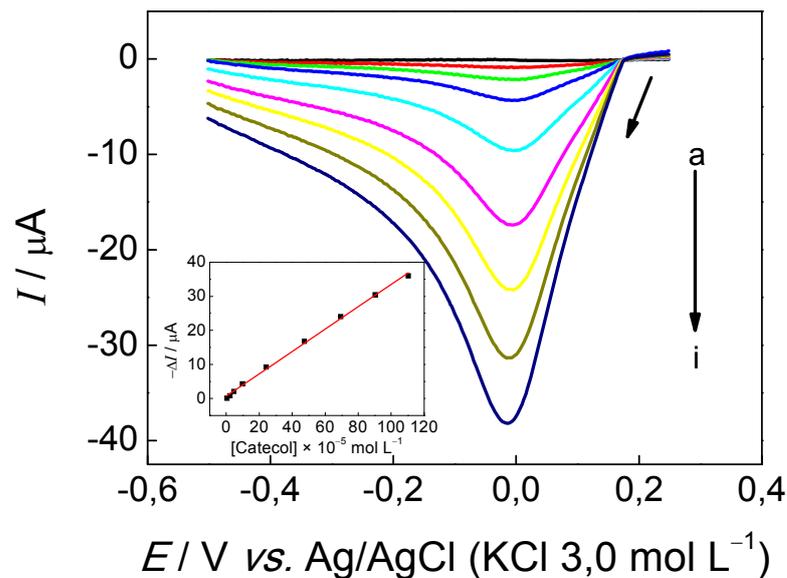


FIGURA 3.12 – Voltamogramas de varredura linear obtidos com o biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo diferentes concentrações de catecol: (a) $4,9 \times 10^{-6}$, (b) $2,2 \times 10^{-5}$, (c) $4,7 \times 10^{-5}$, (d) $9,8 \times 10^{-5}$, (e) $2,4 \times 10^{-4}$, (f) $4,7 \times 10^{-4}$, (g) $6,9 \times 10^{-4}$, (h) $9,0 \times 10^{-4}$ e (i) $1,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Inserido: Curva analítica obtida para o catecol.

3.3.8 Determinação de catecol por voltametria de pulso diferencial

Além de se empregar a LSV, a técnica de DPV também foi utilizada para a construção da curva analítica para o catecol.

Desta forma, um estudo sistemático dos parâmetros experimentais que influenciam a resposta por DPV foi realizado na presença de catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). A velocidade de varredura (ν) foi avaliada no intervalo de 1 a 25 mV s^{-1} , a amplitude de pulso de potencial (a) na faixa de 10 a 150 mV e o tempo de modulação (t) no intervalo de 5 a 50 ms . Os valores ótimos encontrados para estes parâmetros, empregados para a construção da curva analítica foram: $\nu = 15 \text{ mV s}^{-1}$, $a = 90 \text{ mV}$, e $t = 20 \text{ ms}$. Os melhores resultados levaram em conta reprodutibilidade, a estabilidade da linha de base, precisão e sensibilidade do Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE para a determinação de catecol. Na FIGURA 3.13 são apresentados os voltamogramas de pulso diferencial e a curva analítica (inserida) obtidos para catecol usando o biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE proposto.

O biossensor proposto utilizando a técnica de DPV apresentou uma resposta linear para catecol na faixa de concentração de $5,1 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, segundo a equação $\Delta I_{pc} (\mu\text{A}) = 0,24 + 6,95 \times 10^4 C (\text{mol L}^{-1})$ com coeficiente de correlação de 0,994. O limite de detecção obtido (calculado a partir da relação: três vezes o desvio padrão para a solução do branco ($n = 10$), dividido pelo coeficiente angular da curva analítica) foi de $7,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

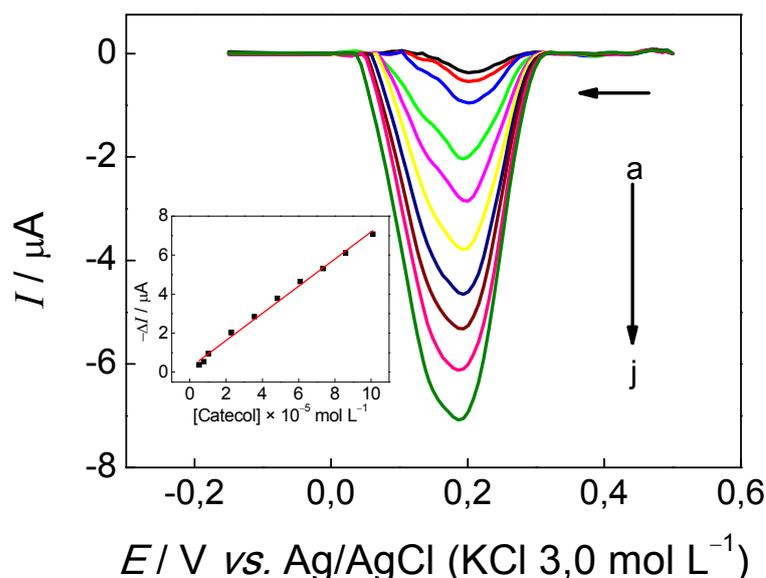


FIGURA 3.13 – Voltamogramas de pulso diferencial, obtidos com o biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo diferentes concentrações de catecol: (a) $5,1 \times 10^{-6}$, (b) $7,6 \times 10^{-6}$, (c) $1,0 \times 10^{-5}$, (d) $2,3 \times 10^{-5}$, (e) $3,5 \times 10^{-5}$, (f) $4,8 \times 10^{-5}$, (g) $6,1 \times 10^{-5}$, (h) $7,3 \times 10^{-5}$, (i) $8,6 \times 10^{-5}$ e (j) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Inserido: Curva analítica obtida para catecol.

Após a otimização dos parâmetros relacionados às duas técnicas empregadas e a construção das curvas analíticas para a determinação de catecol, foi possível realizar uma comparação entre os resultados obtidos. Na TABELA 3.2 são apresentados os dados obtidos empregando-se as técnicas LSV e DPV, nos procedimentos propostos para a determinação de catecol com o biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE.

TABELA 3.2 – Comparação entre as técnicas utilizadas na determinação de catecol empregando o biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE

Condições Analíticas	LSV	DPV
Equação da reta (μA)	$\Delta I_{pc} = 0,69 + 3,28 \times 10^4 C$	$\Delta I_{pc} = 0,24 + 6,95 \times 10^4 C$
LD (mol L^{-1})	$5,8 \times 10^{-7}$	$7,2 \times 10^{-7}$
Faixa linear (mol L^{-1})	$4,9 \times 10^{-6}$ a $1,1 \times 10^{-3}$	$5,1 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$
Sensibilidade ($\mu\text{A mol}^{-1} \text{ L}$)	$3,28 \times 10^4$	$6,95 \times 10^4$

O procedimento proposto empregando a técnica de LSV apresentou maior faixa linear (uma década maior) e melhor limite de detecção. Por esta razão foi empregada na determinação de catecol em amostras de águas naturais. Os parâmetros analíticos do procedimento proposto (LSV) foram comparados aos métodos já descritos na literatura usando diferentes biossensores de Tyr para determinação de catecol (TABELA 3.3).

TABELA 3.3 – Comparação dos parâmetros analíticos obtidos usando diferentes biossensores de tirosinase para determinação de catecol

Eletrodo	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Limite de deteccção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade ($\text{mA mol}^{-1} \text{L}$)	Estabilidade	Referência
Tyr-DNA/CP	1,0 – 50	1,0	–	Tempo de prateleira: 2 meses	110
Tyr-PAPCP/ITO	1,6 – 140	1,2	3,5	80% após 120 dias	112
Tyr/SPPtE	–	1,7	–	50-60% após 150 medidas	123
Tyr-Oscomplexo-funcionalizado/Pt	–	0,01	6,1	–	113
Tyr-Agarose-guar gum/GCE	60 – 800	6,0	–	Tempo de prateleira: 2 meses	125
Tyr-MWCNT-PPy/GCE	3,0 – 50	0,67	8,0	85% após 70 dias	126
Tyr/MWCNTs/AuNPs/AEP/Au	1,0 – 500	0,8	150	80% após 42 dias	127
Tyr-MWCNTs-MNP/SPE	10 – 80	7,6	4,8	Tempo de prateleira: 1 mês	48
Tyr-PO ₄ -PPy/Pt	10 – 120	0,84	47	80% após 30 dias	99
Tyr-PANI/Pt	5,0 – 140	0,05	–	90% após 120 dias	122
Tyr-HTLc/GCE	3,0 – 300	0,1	–	72% após 30 dias	128
Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE	4,9 – 1100	0,58	32,8	*95% após 30 dias	Este trabalho

CP: Pasta de carbono; PAPCP: Poli (*N*-3-aminopropil pirrol-co-pirrol); ITO: Óxido de índio-estanho; SPPtE: Eletrodo impresso de platina; Os: Ósmio; Pt: Eletrodo de platina; PPy: Polipirrol; AuNPs: Nanopartículas de ouro; AEP: Acetona extraída de própolis; Au: Eletrodo de ouro; MNP: Nanopartículas magnéticas; PANI: polianilina; HTLc: Mg–Al–CO₃ hidrotalcita. *190 determinações.

Observa-se que o procedimento proposto empregando o biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE apresentou uma ampla faixa linear, de quase três décadas, maior do que as relatadas em outros procedimentos com biossensores para catecol^{48,99,110,112,113,122,123,125-128}. O limite de detecção obtido neste trabalho também se apresentou inferior aos obtidos com os biossensores^{48,99,110,112,123,125-127} e superior aos obtidos com os biossensores^{113,122,128}. A sensibilidade do método voltamétrico proposto foi maior do que as obtidas na maioria dos métodos da literatura^{48,112,113,126}. Além disso, o biossensor proposto apresentou uma boa estabilidade com diminuição de sua atividade de apenas 5% após 30 dias.

A constante cinética aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}) fornece informação importante sobre a atividade catalítica e afinidade entre enzima e o substrato. O valor de K_M^{app} é inversamente proporcional à probabilidade de formação do produto por ligação entre o centro ativo da enzima e o substrato. É possível estimá-lo a partir da equação de Lineweaver-Burk^{62,125} (Equação 19):

$$\frac{1}{I_s} = \frac{1}{I_{m\acute{a}x}} + \frac{K_M^{app}}{I_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[\text{catecol}]} \quad \text{Eq. 19}$$

onde I_s é a corrente no estado estacionário medida para produto enzimático e $I_{m\acute{a}x}$, é a corrente máxima sob condição de saturação do substrato (catecol).

Os coeficientes angular e linear do gráfico de $1/I_s$ versus $1/[\text{catecol}]$, são iguais a $K_M^{app}/I_{m\acute{a}x}$ e $1/I_{m\acute{a}x}$, respectivamente. Então, K_M^{app} é obtida multiplicando o slope por $I_{m\acute{a}x}$.

O gráfico de Lineweaver-Burk para o biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE foi obtido seguindo a equação $1/I_s = 0,203 + 38,61 \times 1/[\text{catecol}]$ (coeficiente de correlação de 0,995). A TABELA 3.4 apresenta os valores de K_M^{app} relatados na literatura para diferentes biossensores de tirosinase, utilizando catecol como substrato. O valor de K_M^{app} obtido neste trabalho foi de $0,19 \text{ mmol L}^{-1}$, que está de acordo com os valores previamente reportados para biossensores contendo MWCNTs e nanopartículas magnéticas⁴⁸, monocamadas auto-montadas em eletrodo de ouro¹⁵⁷, eletrodos à base de grafite¹⁵⁸ e carbono vítreo reticulado com resina epóxi¹⁵⁹. Maiores valores de K_M^{app} do que o obtido neste trabalho foram reportados por CAMPUZANO et al. para Tyr imobilizada em monocamadas auto-montadas¹⁶⁰, por KIRALP e colaboradores para Tyr imobilizada em polipirrol¹⁶¹ e por outros

autores para Tyr livre¹⁶¹⁻¹⁶⁴. Isto sugere que a enzima imobilizada em BMIM-MWCNTs, tem uma elevada afinidade pelo catecol, devido a um aumento na transferência eletrônica.

TABELA 3.4 – Valores de K_M^{app} para diferentes biossensores de Tyr empregados na determinação de catecol

Biossensor	$K_M^{app}/\text{mmol L}^{-1}$	Reference
Tyr-MWCNTs-MNP/SPE	0,18	48
Tyr-SAMs/Au	0,18	157
Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE	0,19	Este trabalho
Tyr/GE	0,19	158
Tyr/RVC-ER	0,20	159
Tyr livre	0,28	162
Tyr-MPA-SAMs/Au	0,33	160
Tyr livre	0,44	163
Tyr livre	4,0	164
Tyr-PPy/Pt	100	161
Tyr-PPy-MM/Pt	200	161

SPE: Eletrodo impresso; MNP: Nanopartículas magnéticas; Au: Eletrodo de ouro; SAMs: Monocamadas auto-montadas; GE: Eletrodo de grafite; RVC-ER: Carbono vítreo reticulado com resina epóxi; MPA: Ácido 3-mercaptopropiônico; PPy: Polipirrol; MM: metil monômero.

A repetibilidade ($n = 10$) de um biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE foi avaliada em presença de catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). O valor do desvio padrão relativo (RSD) obtido para repetibilidade intra-dias foi de 1,16% e repetibilidade inter-dia foi de 2,94%, indicando uma boa estabilidade do filme. Ademais, a repetibilidade da fabricação de cinco biossensores Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE diferentes na presença de catecol de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) foi também objeto de estudo nesta tese. O desvio padrão relativo (RSD) foi de 4,86%, indicando uma boa repetibilidade do preparo dos biossensores.

3.3.9 Efeito de interferentes em potencial

A interferência em potencial de espécies como os cátions metálicos sódio, potássio, magnésio, cálcio, alumínio, ferro (III) e ânions carbonato, cloreto, fosfato, sulfato, brometo, iodeto, além de ácidos húmicos, na determinação de catecol foi avaliada por LSV em solução tampão de fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) contendo catecol 5,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ fortificada concomitantemente com cada interferente (5,0 × 10⁻³ mol L⁻¹). Os sinais de corrente foram comparados com aqueles obtidos na ausência de cada interferente. Os resultados mostraram que, para todas as espécies testadas uma variação inferior a 5,0% na resposta do sinal analítico foi observada, indicando assim ausência de interferência significativa daqueles concomitantes na determinação de catecol pelo biossensor proposto na concentração avaliada.

3.3.10 Aplicação do método proposto na determinação de catecol em amostras de águas naturais

O biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE foi aplicado na determinação da concentração de catecol em quatro amostras de água (três amostras de águas naturais, A – C, e uma amostra de água da torneira, D), utilizando o método de adição de padrão. Como não foi encontrado catecol nas amostras, alíquotas de 1,0 mL das amostras fortificadas (procedimento descrito anteriormente) foram adicionados à célula eletroquímica contendo 20 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) a fim de se obter uma concentração de catecol de 5,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹. Para cada amostra três determinações foram realizadas, e os desvios-padrão foram calculados. O estudo de adição e recuperação de catecol nas amostras de água foi realizado e as recuperações ficaram entre 96,9% a 108,6%, indicando que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de catecol pelo procedimento analítico proposto.

A TABELA 3.5 apresenta as concentrações de catecol determinadas em amostras de água empregando o método LSV proposto e o método espectrofotométrico¹¹⁹. Após aplicar o teste *t*-pareado¹⁶⁵ para os resultados obtidos, o valor de *t* calculado foi de 2,468 o qual é menor do que o valor crítico (3,182, $\alpha = 0,05$). Pode-se concluir então que não há diferença significativa entre os resultados obtidos, empregando-se os dois métodos analíticos, em um nível de confiança de 95%. Os resultados ilustram que o biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE

proposto é adequado para a determinação de catecol em amostras de águas naturais. Outras vantagens do método eletroquímico são a facilidade de preparação, o custo relativamente baixo, a estabilidade e a vida útil do biossensor.

TABELA 3.5 – Determinação de catecol em amostras de água por LSV usando o biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE e pelo método espectrofotométrico de referência¹¹⁹

Amostras	Catecol (10^{-6} mol L ⁻¹)		
	Método referência*	Método proposto	Erro relativo**
A	50,9 ± 0,2	51,2 ± 0,4	+0,6
B	49,0 ± 0,4	53,8 ± 0,6	+9,8
C	49,1 ± 0,2	51,0 ± 0,3	+3,9
D	51,4 ± 0,6	49,2 ± 0,5	-4,3

* Método espectrofotométrico – média de 3 medidas.

** [(Método proposto – método de referência) × 100] / método de referência.

A estabilidade do biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE foi avaliada pela monitoração da resposta para uma solução de catecol de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) durante 30 dias (190 determinações neste período). A resposta de corrente catódica diminuiu apenas 5,0% após esse tempo. Esta estabilidade é devida a dois fatores principais, o processo de imobilização, que proporciona uma boa imobilização da enzima Tyr no filme BMIM-MWCNT-DHP e a biocompatibilidade entre os MWCNTs e a enzima Tyr.

3.4 CONCLUSÕES

Neste trabalho a enzima Tyr foi imobilizada com sucesso no BMIM-MWCNTs-DHP/GCE. O uso de MWCNTs e BMIM proporcionou um efeito sinérgico ao combinar a alta condutividade e biocompatibilidade do líquido iônico com a atividade electrocatalítica e/ou aumento do sinal analítico promovido pelos MWCNTs. O biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE foi utilizado na determinação de catecol por LSV com respostas lineares na faixa de concentração de $4,9 \times 10^{-6}$ a $1,1 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e limite de detecção de $5,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, além de apresentar boa repetibilidade intra e inter-dia. O biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE foi aplicado para a determinação de catecol em amostras de água, com

bons resultados, apresentando estabilidade e tempo de vida elevados. Além disso, a utilização desta arquitetura de biossensor pode ser uma boa alternativa para a imobilização de outras enzimas ou proteínas.

BIOSSENSOR DE TIROSINASE BASEADO EM UM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO E DIHEXADECIL HIDROGENOFOSFATO PARA A DETERMINAÇÃO DE CATECOL

CAPÍTULO 4

4 Biossensor de tirosinase baseado em um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro e dihexadecil hidrogenofosfato para a determinação de catecol

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver um biossensor modificando a superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com a enzima tirosinase (Tyr) imobilizada em nanopartículas de ouro (AuNPs) e em filme de dihexadecil hidrogenofosfato (DHP) para a determinação de catecol.

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1 Reagentes

Tirosinase 50 kU extraída de cogumelo (CAS: 9002-10-2), catecol (99%) (CAS: 120-80-9), dihexadecil hidrogenofosfato (CAS: 2197-63-9), ácido tetracloroáurico (III) (HAuCl_4) (CAS: 27988-77-8), citrato de sódio (CAS: 6132-04-3), cistamina (CAS: 312619-54-8), glutaraldeído 25% v/v (CAS: 111-30-8) e 4-aminoantipirina (CAS: 83-07-8) foram adquiridos da Sigma–Aldrich. Os sais NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4 utilizados para preparar o eletrólito suporte, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0), foram adquiridos da Merck. Todos os outros produtos químicos foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida por um sistema Milli-Q (resistividade > 18 $\text{M}\Omega \text{ cm}$). O tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,0) foi empregado como eletrólito suporte em todas as medidas com o biossensor. A solução estoque de catecol 0,01 mol L^{-1} foi preparada diariamente em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,0).

4.2.2 Medidas eletroanalíticas

As medidas eletroanalíticas foram executadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT12 (Utrecht, Holanda) Autolab Ecochemie e os dados foram tratados usando o software GPES 4.9.

A determinação dos pHs das soluções foi realizada em um pHmetro digital ORION, modelo EA 940, conectado a um eletrodo combinado de vidro Digimed com um eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L^{-1}).

4.2.3 Célula eletroquímica

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula de compartimento único de 50 mL, confeccionada em vidro borossilicato e equipada com uma tampa de Teflon[®]. Uma alíquota de 20 mL de eletrólito suporte foi sempre adicionada para a realização das medidas eletroquímicas. Todos os experimentos foram realizados à temperatura controlada de 25 ± 1 °C.

4.2.4 Eletrodos

Utilizou-se um sistema de três eletrodos, com o eletrodo de trabalho sendo o biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE, uma placa de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência à 25 °C, ao qual todos os potenciais foram referidos.

4.2.5 Morfologia

A superfície do filme contendo nanopartículas de ouro foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de alta resolução, utilizando um equipamento modelo Supra 35-VP (Carl Zeiss, Alemanha) com feixe de elétrons de 25 keV. Um disco de carbono vítreo foi usado para a imobilização da dispersão de AuNPs-DHP, usando o mesmo processo de preparo empregado para a preparação dos eletrodos.

4.2.6 Síntese das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram obtidas pelo método de Turkevich⁵⁴. Assim, as AuNPs foram obtidas adicionando-se 4,0 mL de uma solução aquosa de HAuCl₄ 0,05 mol L⁻¹ em 200 mL de água destilada a 85 °C, sob agitação. Em seguida, a esta solução foram adicionados 2,0 mL de solução de citrato de sódio 0,3 mol L⁻¹. Essa mistura foi mantida sob constante agitação durante 4 minutos. A cor da solução mudou de amarelo claro para vermelho escuro, obtendo-se dessa forma a dispersão coloidal das AuNPs. Em seguida, o meio reacional foi rapidamente resfriado em banho de gelo até a temperatura ambiente. As AuNPs foram transferidas para um frasco âmbar e armazenadas em temperatura ambiente.

A FIGURA 4.1 mostra uma fotografia de um frasco contendo as nanopartículas de ouro obtidas após a reação de HAuCl_4 com citrato de sódio e posterior resfriamento.



FIGURA 4.1 – Imagem de um frasco contendo uma dispersão coloidal de nanopartículas de ouro.

4.2.7 Preparação do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE

Inicialmente, um eletrodo de carbono vítreo (GCE, 5 mm de diâmetro) foi cuidadosamente polido com suspensões de micropartículas de alumina de 0,3 e 0,05 μM , respectivamente. Em seguida, este foi lavado abundantemente com água ultrapura. O CGE foi então sonicado em álcool isopropílico durante três minutos e posteriormente com água ultrapura por cerca de cinco minutos. Por fim, deixou-se secar à temperatura ambiente.

Uma massa de 1,0 mg de DHP foi adicionada a 1,0 mL de uma solução de AuNPs e a mistura submetida a ultrassom durante 30 minutos de modo a formar uma suspensão estável de AuNPs-DHP. Essa suspensão foi armazenada à 4 °C em refrigerador, quando não estava em uso. Em seguida, adicionou-se 20 μL da suspensão de AuNPs-DHP sobre a superfície do GCE com o auxílio de uma micropipeta e deixou-se secar à temperatura ambiente durante 2 horas. Então, o GCE modificado foi colocado em uma célula eletroquímica contendo KCl 0,1 mol L^{-1} e foram aplicados vinte ciclos na faixa de potencial de trabalho $-0,3$ a $0,7$ V a 100 mV s^{-1} usando-se voltametria cíclica. O eletrodo foi lavado cuidadosamente com

água, deixando-se secar à temperatura ambiente. Subsequentemente, 20 μL de solução de cistamina $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionados na superfície do GCE modificado com AuNPs-DHP e deixou-se secar. O eletrodo foi novamente lavado cuidadosamente com água, deixando-se secar à temperatura ambiente. Então, adicionou-se 20 μL de solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) e deixou-se secar por uma hora. O eletrodo foi lavado cuidadosamente com tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0), deixando-se secar à temperatura ambiente. Finalmente, adicionou-se 20 μL de Tyr (2000 U) no eletrodo e deixou-se secar por mais uma hora. O biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE foi armazenado a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ em refrigerador em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0), quando não estava em uso. O processo de imobilização da enzima Tyr no eletrodo AuNPs-DHP/GCE é apresentado na FIGURA 4.2.

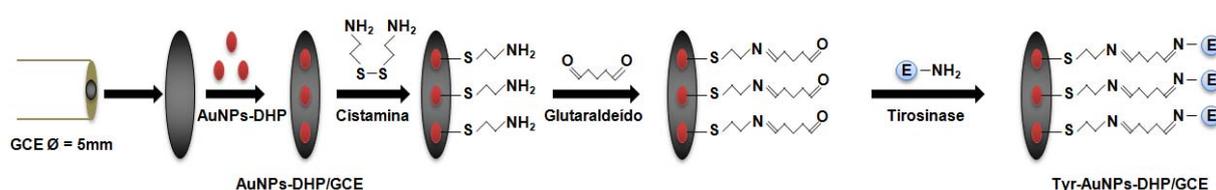


FIGURA 4.2 – Representação esquemática da preparação do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE.

4.2.8 Preparação das amostras de água fortificadas

As amostras de água foram preparadas conforme procedimento descrito na Seção 3.2.8. Os pontos de coleta das amostras de água natural (A – C) da represa na Universidade Federal de São Carlos, são descritos pelas coordenadas: GPS A = $21^\circ 59' 08.06''\text{S}$ $47^\circ 52' 55.13''\text{O}$, B = $21^\circ 59' 10.96''\text{S}$ $47^\circ 52' 52.16''\text{O}$ e C = $21^\circ 59' 11.54''\text{S}$ $47^\circ 52' 42.63''\text{O}$.

4.2.9 Método de referência

O método espectrofotométrico¹¹⁹ foi utilizado para comparar os resultados obtidos com o método proposto empregando a amperometria. O procedimento empregado para o método espectrofotométrico está descrito na Seção 3.2.9.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado AuNPs-DHP/GCE

A utilização das AuNPs é interessante uma vez que permite o desenvolvimento de um biossensor baseado na imobilização da enzima Tyr, utilizando cistamina e glutaraldeído. Assim, 1 mL da dispersão coloidal das AuNPs foram levadas ao ultrassom juntamente com 1 mg de DHP para a formação de uma suspensão de AuNPs-DHP. A incorporação de DHP às AuNPs leva a formação de um filme com boa aderência na superfície do GCE. Na FIGURA 4.3 são apresentadas fotografias de frascos contendo dispersão coloidal de AuNPs (A), suspensão de DHP em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) (B) e dispersão coloidal de AuNPs com DHP 1 mg mL⁻¹ (C).

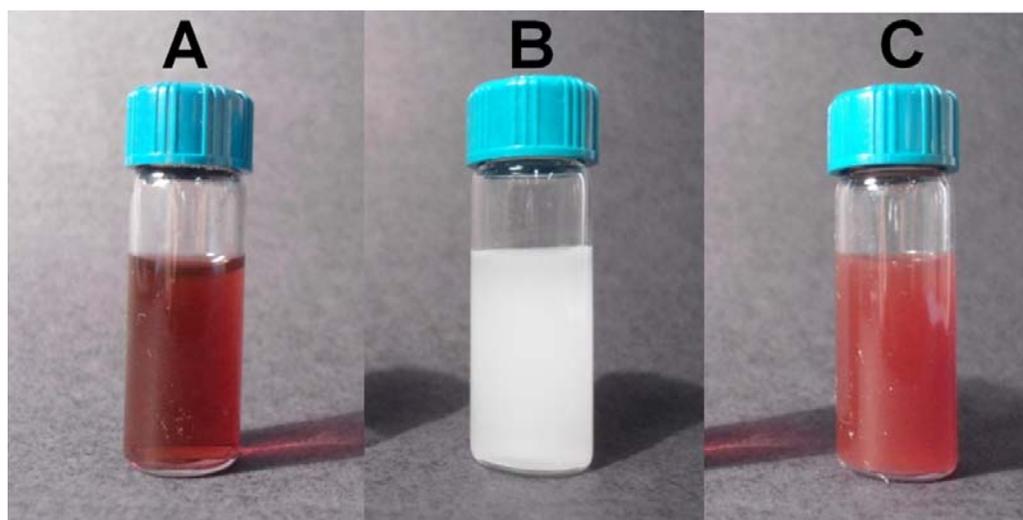


FIGURA 4.3 – Imagens de frascos contendo dispersão coloidal de AuNPs (A), solução de DHP 1 mg mL⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) (B) e 1 mL de dispersão coloidal de AuNPs em suspensão de DHP 1 mg mL⁻¹ (C), levados ao ultrassom durante 2 h e após repouso de dez minutos.

Para a caracterização da superfície do GCE e do GCE modificado com AuNPs utilizou-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de alta resolução. Na FIGURA 4.4 são apresentadas as imagens de MEV das superfícies do GCE (A) e AuNPs/GCE (B). Observa-se uma grande homogeneidade na distribuição

das AuNPs na superfície do GCE (FIGURA 4.4 (B)), com tamanho uniforme e diâmetro médio de 29 nm.

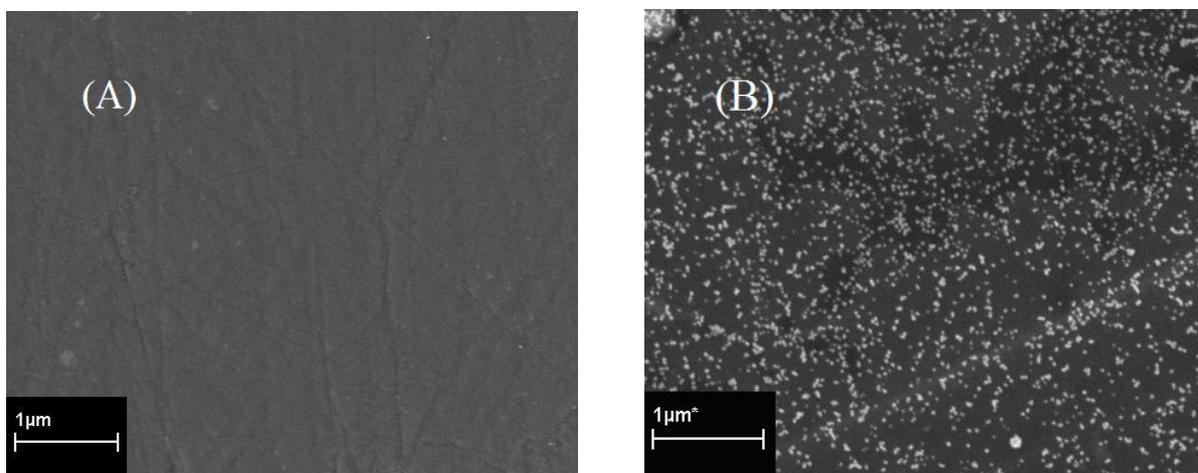


FIGURA 4.4 – Imagens obtidas por MEV da superfície do: (A) GCE e do (B) GCE modificado com AuNPs.

O sensor AuNPs-DHP/GCE foi caracterizado por voltametria cíclica em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Pode-se observar na FIGURA 4.5, que o AuNPs-DHP/GCE demonstrou perfil característico da reação redox do ouro nesse meio, com picos de oxidação (em $1,30 \text{ V}$) e redução do óxido de ouro (em $0,84 \text{ V}$), o que comprova a presença das AuNPs no filme com DHP. As Equações 20 – 22 apresentam as espécies de óxido de ouro formadas¹⁶⁶ na superfície do eletrodo em meio de ácido sulfúrico:



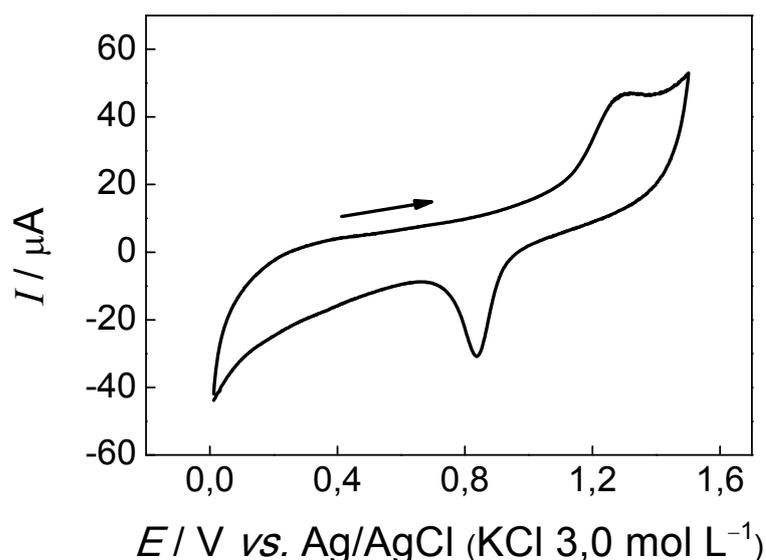


FIGURA 4.5 – Voltamograma cíclico do AuNPs-DHP/GCE em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

As áreas eletroativas dos eletrodos GCE, DHP/GCE e AuNPs-DHP/GCE foram estimadas empregando-se a equação de Randles-Sevcik^{148,149} (Equação 13, apresentada na Seção 3.3.1) para um processo reversível, para uma solução de hexacianoferrato (II) de potássio $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

As áreas eletroativas obtidas foram $0,071$; $0,034$ e $0,034 \text{ cm}^2$ para GCE, DHP/GCE e AuNPs-DHP/GCE, respectivamente (TABELA 4.1). Na FIGURA 4.6 são apresentados os voltamogramas cíclicos para GCE, DHP/GCE e AuNPs-DHP/GCE, respectivamente para uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

TABELA 4.1 – Área eletroativa de diferentes eletrodos em meio de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte

Eletrodo	Área ativa (cm^2)
GCE	0,071
DHP/GCE	0,034
AuNPs-DHP/GCE	0,034

Área geométrica = $0,196 \text{ cm}^2$

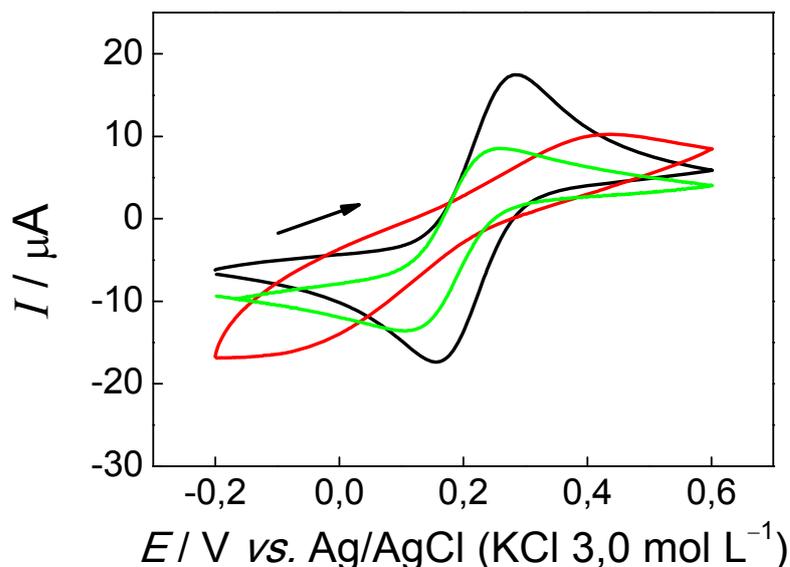


FIGURA 4.6 – Voltamogramas cíclicos, após subtração do branco, para os eletrodos GCE (–), DHP/GCE (–) e AuNPs-DHP/GCE (–) para uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

O GCE apresentou uma área eletroativa maior do que os eletrodos modificados, o que indica que a presença do DHP leva a um bloqueio parcial da superfície ativa do GCE, dificultando a transferência eletrônica e causando uma diminuição do sinal analítico. Não houve diferença entre as áreas eletroativas do DHP/GCE e AuNPs-DHP/GCE. Esses resultados estão em concordância com os recentes trabalhos de JANEGITZ e colaboradores⁶² e de CHIKAE e colaboradores⁵⁷ em que foram utilizados eletrodos modificados com AuNPs.

4.3.2 Caracterização eletroquímica do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE

A enzima Tyr foi imobilizada no filme AuNPs-DHP usando cistamina e glutaraldeído conforme descrito anteriormente. Os átomos de enxofre da cistamina (2,2-diaminoetildissulfeto) se ligam às superfícies das NPs de ouro, assim, grupamentos amino (do lado oposto aos sulfetos) são introduzidos. Então, usa-se o glutaraldeído para se fazer a ligação covalente entre os grupos amino da cistamina e da enzima, conferindo boa estabilidade a variações de pH, força iônica e temperatura^{1,16}. Assim, o comportamento eletroquímico de catecol foi investigado utilizando o biossensor proposto. Na FIGURA 4.7 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos AuNPs-DHP/GCE e Tyr-AuNPs-

DHP/GCE em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) na presença de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Pode-se observar que o AuNPs-DHP/GCE apresentou um par de picos redox de intensidades semelhantes (FIGURA 4.7 (—)). Nas mesmas condições, o Tyr-AuNPs-DHP/GCE (FIGURA 4.7 (—)), apresentou uma diminuição de corrente do pico de oxidação e um aumento de corrente no pico de redução de $-3,3 \text{ }\mu\text{A}$ no AuNPs-DHP/GCE para $-10,9 \text{ }\mu\text{A}$ no Tyr-AuNPs-DHP/GCE. Ademais, também ocorreu um deslocamento do potencial de redução para valores mais negativos, de $-11,0 \text{ mV}$ no AuNPs-DHP/GCE para -110 mV no biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE.

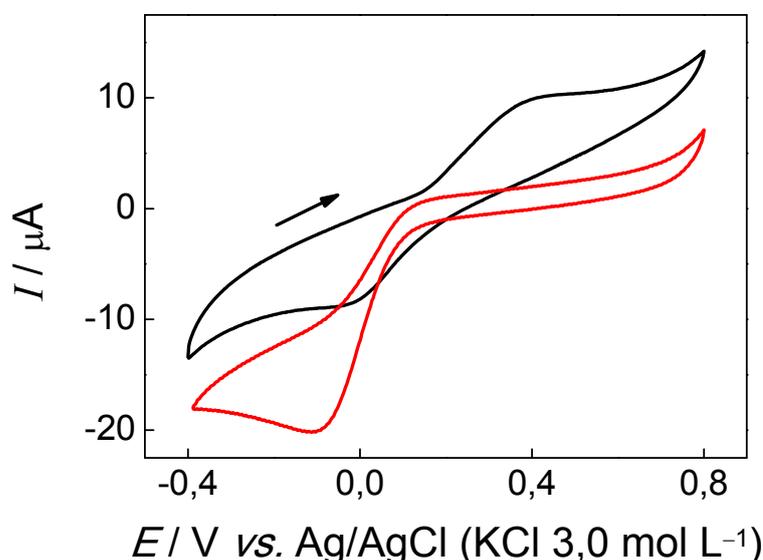


FIGURA 4.7 – Voltamogramas cíclicos, após subtração do branco, do AuNPs-DHP/GCE (—) e do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE (—) em presença de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) como eletrólito suporte e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

No biossensor, a Tyr imobilizada no filme de AuNPs-DHP catalisa a oxidação de catecol para *o*-quinona na presença de oxigênio molecular. A *o*-quinona produzida é então reduzida regenerando o catecol na superfície do biossensor em $-0,10 \text{ V}$, aumentando desta maneira o sinal analítico. As Equações 17 e 18 apresentadas na Seção 3.3.5 descrevem esses processos.

Esse comportamento do Tyr-AuNPs-DHP/GCE (FIGURA 4.7 (—)) é atribuído à redução da *o*-quinona produzida na reação catalisada pela enzima sobre a superfície do eletrodo¹⁶⁷. Assim, há um aumento da concentração de *o*-quinona a partir da reação enzimática, levando a um aumento da corrente de redução. Isso

ocorre devido a presença da enzima imobilizada nas AuNPs, que resulta em uma melhora na cinética de transferência eletrônica e aumento da corrente de redução de o-quinona, que pode ser atribuído à maior área superficial e a condutividade elétrica promovida pelas AuNPs.

4.3.3 Efeito da velocidade de varredura

O efeito da velocidade de varredura foi avaliado para a resposta analítica do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE na presença de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Houve um ligeiro deslocamento nos potenciais de pico catódico com o aumento da velocidade de varredura (FIGURA 4.8). A dependência da corrente de pico catódica com a velocidade de varredura de 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 e 200 mV s^{-1} mostrou uma relação linear (FIGURA 4.8 – inserida) indicando que a reação do eletrodo ocorre na monocamada redox^{47,68,148,167}.

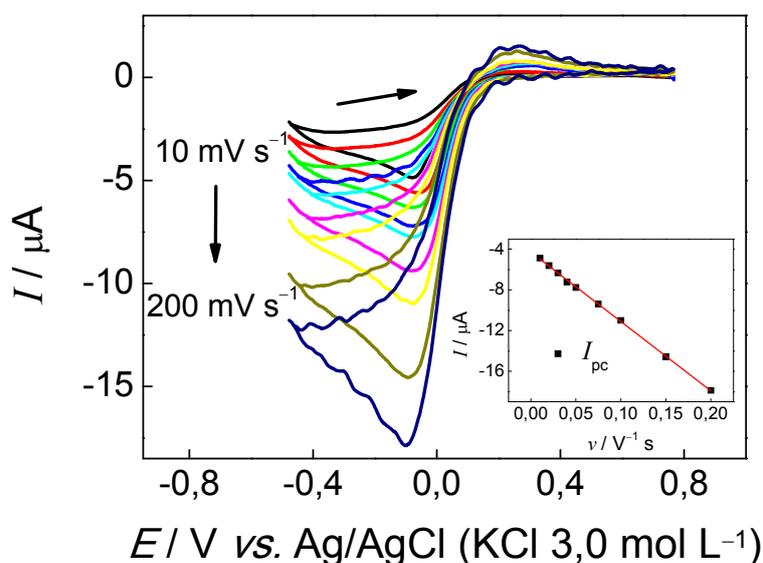


FIGURA 4.8 – CVs, após subtração do branco, do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE em várias velocidades de varredura de 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 e 200 mV s^{-1} e na presença de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Inserido: Corrente de pico catódica vs. a velocidade de varredura.

4.3.4 Efeito do pH

A influência do pH da solução sobre a corrente de pico catódica do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE foi avaliada em presença de solução de catecol

$1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em soluções de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com diferentes pHs, e uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Os pHs foram estudados na faixa de 5,0 a 7,0. Observa-se na FIGURA 4.9 A (inserida) que com a diminuição do pH, houve um aumento de corrente catódica até pH 5,5. Apesar do pH 5,5 apresentar maior intensidade de corrente, o pH 6,0 foi selecionado por apresentar bom sinal analítico e a resposta voltamétrica ser mais reprodutível.

A dependência do potencial de pico catódico em função do pH da solução também foi avaliada. Como pode ser visto na FIGURA 4.9, um aumento do pH da solução tampão causa um deslocamento para potenciais mais negativos no potencial de pico catódico. A FIGURA 4.9 B (inserida) mostra a relação do potencial de pico catódico em função do pH. Nesse estudo, o potencial catódico apresentou uma dependência linear com o aumento do valor do pH da solução tampão, conforme a equação $E_{pc} \text{ (V)} = 0,220 - 0,035 \text{ pH}$ com coeficiente de correlação de 0,977. O valor da inclinação da reta foi de -35 mV pH^{-1} , valor este próximo ao valor teórico ($-29,6 \text{ mV pH}^{-1}$), a 25°C para um processo reversível de transferência eletrônica envolvendo o mesmo número de prótons e elétrons. Esses resultados estão de acordo com trabalhos reportados na literatura^{121,124}.

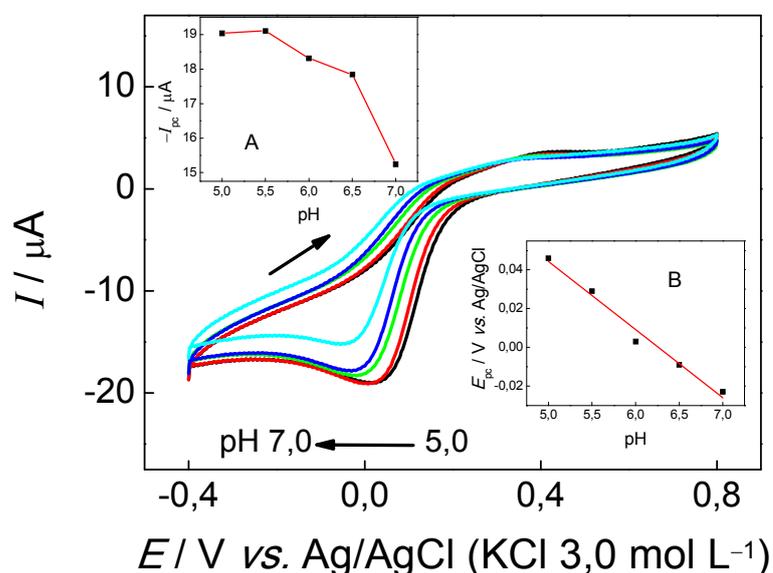


FIGURA 4.9 – CVs do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE na presença de catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pHs de 5,0 à 7,0. Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} . Inserido: (A) Influência do pH sobre a corrente de pico catódica de catecol. (B) Dependência do E_{pc} vs. pH.

4.3.5 Efeito do potencial de trabalho

A influência do potencial de trabalho aplicado foi investigada na faixa entre 0,15 V a -0,35 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0) na presença de catecol 5,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ e velocidade de agitação da solução de 1100 rpm. Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 4.10. Houve um aumento de corrente catódica até o potencial de -0,10 V e a partir de potenciais mais negativos não houve aumento significativo na resposta de corrente, nos quais os valores de corrente praticamente se mantiveram constantes. Desta forma, para obter melhores resultados no desempenho analítico do biossensor, o potencial de trabalho de -0,10 V foi escolhido para construção da curva analítica.

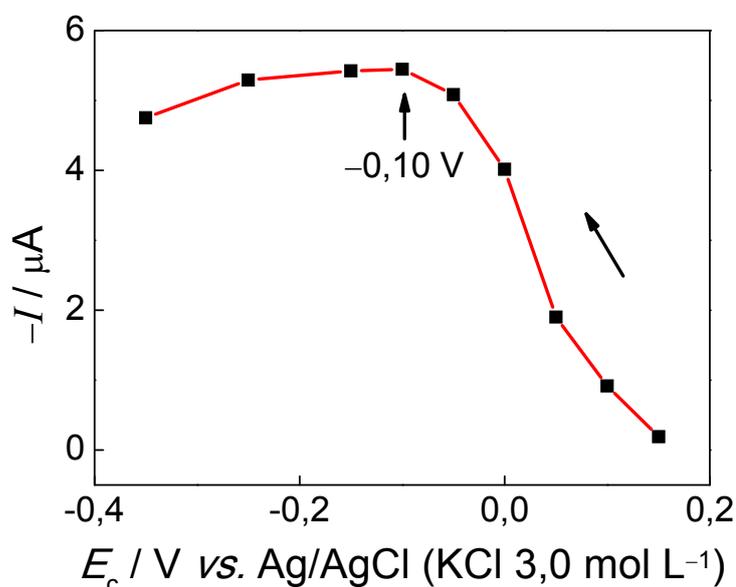


FIGURA 4.10 – Estudo da influência do potencial aplicado na redução de catecol na superfície do Tyr-AuNPs-DHP/GCE. Concentração de catecol 5,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹. Eletrólito suporte: tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 6,0.

4.3.6 Determinação de catecol por amperometria

Após a otimização dos parâmetros experimentais para a determinação de catecol por amperometria utilizando-se o biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE, foram feitas adições sucessivas de catecol para a obtenção do amperograma correspondente e a construção da curva analítica, mantendo-se constante a agitação da solução em 1100 rpm.

O procedimento desenvolvido empregando a amperometria apresentou

uma curva analítica linear para catecol na faixa de concentração de $2,5 \times 10^{-6}$ à $9,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, cuja equação correspondente foi $I_c (\mu\text{A}) = -1,67 \times 10^{-8} + 1,15 \times 10^5 [\text{catecol}] (\text{mol L}^{-1})$ com coeficiente de correlação de 0,999. O limite de detecção obtido (calculado a partir da relação: três vezes o desvio padrão para a solução do branco ($n = 10$), dividido pelo coeficiente angular da curva analítica) foi de $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Na FIGURA 4.11 está apresentado o amperograma obtido e a curva analítica (inserida) para catecol usando o biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE proposto.

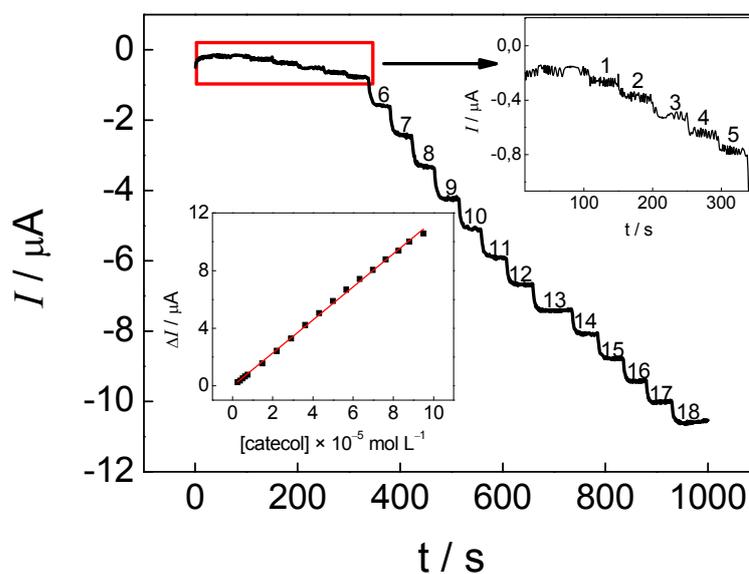


FIGURA 4.11 – Amperograma obtido com o biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0), $E_c = -0,10 \text{ V}$, para diferentes concentrações de catecol: $2,5 \times 10^{-6}$ (1), $3,7 \times 10^{-6}$ (2), $5,0 \times 10^{-6}$ (3), $6,2 \times 10^{-6}$ (4), $7,4 \times 10^{-6}$ (5), $1,5 \times 10^{-5}$ (6), $2,2 \times 10^{-5}$ (7), $2,9 \times 10^{-5}$ (8), $3,6 \times 10^{-5}$ (9), $4,3 \times 10^{-5}$ (10), $5,0 \times 10^{-5}$ (11), $5,7 \times 10^{-5}$ (12), $6,3 \times 10^{-5}$ (13), $7,0 \times 10^{-5}$ (14), $7,6 \times 10^{-5}$ (15), $8,3 \times 10^{-5}$ (16), $8,8 \times 10^{-5}$ (17) e $9,5 \times 10^{-5}$ (18) mol L^{-1} . Velocidade de agitação da solução: 1100 rpm. Inserida: Curva analítica obtida para o catecol.

Na TABELA 4.2 estão apresentados os parâmetros analíticos do procedimento proposto (amperométrico) comparados a diversos métodos já descritos na literatura usando diferentes biossensores de Tyr para a determinação de catecol.

TABELA 4.2 – Comparação dos parâmetros analíticos obtidos usando diferentes biossensores de tirosinase para determinação de catecol

Eletrodo	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Limite de deteccção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade ($\text{mA mol}^{-1} \text{L}$)	Estabilidade	Referência
Tyr-DNA/CP	1,0 – 50	1,0	–	Tempo de prateleira: 2 meses	110
Tyr-PAPCP/ITO	1,6 – 140	1,2	3,5	80% após 120 dias	112
Tyr/SPPtE	–	1,7	–	50-60% após 150 medidas	123
Tyr-Oscomplexo-funcionalizado/Pt	–	0,01	6,1	–	113
Tyr-Agarose-guar gum/GCE	60 – 800	6,0	–	Tempo de prateleira: 2 meses	125
Tyr-MWCNT-PPy/GCE	3,0 – 50	0,67	8,0	85% após 70 dias	126
Tyr/MWCNTs/AuNPs/AEP/Au	1,0 – 500	0,8	150	80% após 42 dias	127
Tyr-MWCNTs-MNP/SPE	10 – 80	7,6	4,8	Tempo de prateleira: 1 mês	48
Tyr-PO ₄ -PPy/Pt	10 – 120	0,84	47	80% após 30 dias	99
Tyr-PANI/Pt	5,0 – 140	0,05	–	90% após 120 dias	122
Tyr-HTLc/GCE	3,0 – 300	0,1	–	72% após 30 dias	128
Tyr-AuNPs-DHP/GCE	2,5 – 95	0,17	115	*93% após 30 dias	Este trabalho

CP: Pasta de carbono; PAPCP: Poli (*N*-3-aminopropil pirrol-co-pirrol); ITO: Óxido de índio-estanho; SPPtE: Eletrodo impresso de platina; Os: Ósmio; Pt: Eletrodo de platina; PPy: Polipirrol; AuNPs: Nanopartículas de ouro; AEP: Acetona extraída de própolis; Au: Eletrodo de ouro; MNP: Nanopartículas magnéticas; PANI: polianilina; HTLc: Mg–Al–CO₃ hidrotalcita. *240 determinações.

Nota-se que o procedimento proposto empregando o biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE apresentou um limite de detecção inferior aos obtidos com os biossensores apresentados em diversos artigos^{48,99,110,112,123,125-127} e ligeiramente superior aos obtidos empregando-se os biossensores descritos^{113,122,128}. A sensibilidade do método amperométrico proposto foi maior do que as obtidas na maioria dos métodos da literatura^{48,99,112,113,126}. Ademais, o biossensor proposto apresentou uma grande estabilidade com diminuição de sua atividade de apenas 7% após 30 dias.

A constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}) que expressa a afinidade entre a enzima e o substrato, foi estimada empregando-se a equação de Lineweaver-Burk^{62,125} (Equação 19), apresentada na Seção 3.3.8.

O gráfico de Lineweaver-Burk para o biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE foi obtido seguindo a equação $1/I_s = 0,0504 + 10,08 \times 1/[catecol]$ (coeficiente de correlação de 0,998). O valor de K_M^{app} obtido neste trabalho foi de $0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ para catecol. Na TABELA 4.3 são apresentados os valores de K_M^{app} relatados na literatura para diferentes biossensores contendo a Tyr, usados para determinação de catecol. O valor K_M^{app} obtido neste trabalho concorda com os valores anteriormente reportados, indicando uma alta afinidade entre o catecol (substrato) e a enzima imobilizada no biossensor.

TABELA 4.3 – Valores de K_M^{app} para diferentes biossensores de Tyr empregados na determinação de catecol

Biossensor	$K_M^{\text{app}}/\text{mmol L}^{-1}$	Referência
Tyr-MWCNTs-MNP/SPE	0,18	48
Tyr-SAMs/Au	0,18	157
Tyr/GE	0,19	158
Tyr-AuNPs-DHP/GCE	0,20	Este trabalho
Tyr/RVC-ER	0,20	159
Tyr livre	0,28	162
Tyr-MPA-SAMs/Au	0,33	160
Tyr livre	0,44	163
Tyr livre	4,0	164
Tyr-PPy/Pt	100	161
Tyr-PPy-MM/Pt	200	161

SPE: Eletrodo impresso; MNP: Nanopartículas magnéticas; Au: Eletrodo de ouro; SAMs: Monocamadas auto-montadas; GE: Eletrodo de grafite; RVC-ER: Carbono vítreo reticulado com resina epóxi; MPA: Ácido 3-mercaptopropiônico; PPy: Polipirrol; MM: metil monômero.

A repetibilidade ($n = 10$) do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE foi avaliada em presença de catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0). O valor do desvio padrão relativo (RSD) obtido para repetibilidade intra-dias foi de 0,48% e repetibilidade inter-dia foi de 1,46%, indicando uma boa estabilidade do filme. Ademais, a repetibilidade da fabricação de três biossensores Tyr-AuNPs-DHP/GCE diferentes na presença de catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) foi também estimada. O desvio padrão relativo encontrado foi de 3,81%, apontando uma ótima repetibilidade do preparo dos biossensores.

4.3.7 Efeito de interferentes em potencial

A interferência em potencial de espécies como cátions metálicos sódio, potássio, magnésio, cálcio, alumínio, ferro (III) e ânions carbonato, cloreto, fosfato, sulfato, brometo, iodeto, além de ácidos húmicos, na determinação de catecol foi avaliada por amperometria em solução tampão de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) contendo catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ enriquecida concomitantemente com cada

interferente ($5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Os sinais de corrente foram comparados com aqueles obtidos na ausência de cada interferente. Os resultados mostraram que, para todas as espécies testadas uma variação inferior a 5% na resposta do sinal analítico foi observada, indicando assim ausência de interferência significativa daqueles concomitantes na determinação de catecol pelo biossensor proposto na concentração avaliada.

4.3.8 Aplicação do método proposto na determinação de catecol em amostras de águas naturais

O biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE foi aplicado na determinação da concentração de catecol em quatro amostras de água (três amostras de águas naturais, A – C, e uma amostra de água da torneira, D), utilizando o método de adição de padrão. Como não foi encontrado catecol nas amostras, alíquotas de 1,0 mL das amostras fortificadas (procedimento descrito anteriormente) foram adicionados à célula eletroquímica contendo 20 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) a fim de se obter uma concentração de catecol de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Para cada amostra três determinações foram realizadas, e os desvios-padrão foram calculados. O estudo de adição e recuperação de catecol nas amostras de água foi realizado e as recuperações variaram entre 99,0% a 102,2%, indicando que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de catecol pelo procedimento analítico proposto.

Os resultados obtidos empregando-se o método proposto e o método de referência¹¹⁹ estão apresentados na TABELA 4.4. As amostras A, B e C, compreendem águas naturais e a amostra D, água de torneira. Após aplicar o teste *t* pareado¹⁶⁵ para os resultados obtidos, o valor de *t* calculado foi de 2,176, menor do que o valor crítico (3,182, $\alpha = 0,05$), indicando que não há diferença significativa entre os resultados obtidos, empregando-se os dois métodos analíticos, em um nível de confiança de 95%. Esses resultados demonstram que o biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE proposto é apropriado para a determinação de catecol em amostras de águas naturais.

TABELA 4.4 – Determinação de catecol em amostras de água por amperometria usando o biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE e pelo método espectrofotométrico de referência¹¹⁹

Amostras	Catecol (10^{-6} mol L ⁻¹)		
	Método referência*	Método proposto	Erro relativo**
A	49,1 ± 0,3	50,8 ± 0,3	+3,5
B	47,4 ± 0,4	49,5 ± 0,2	+4,4
C	48,7 ± 0,2	51,1 ± 0,4	+4,9
D	51,0 ± 0,2	50,5 ± 0,1	-1,0

* Método espectrofotométrico – média de 3 medidas.

** [(Método proposto – método de referência) × 100] / método de referência.

A estabilidade do biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE foi avaliada pela monitoração da resposta para uma solução de catecol de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0) durante um mês (ou 240 determinações neste período). A resposta de corrente catódica diminuiu apenas 7,4% após esse tempo. Esta estabilidade está relacionada a dois fatores principais, o processo de imobilização, que proporciona uma boa imobilização da enzima Tyr no filme AuNPs-DHP e uma biocompatibilidade entre as AuNPs e a enzima Tyr.

4.4 CONCLUSÕES

Neste trabalho a enzima Tyr foi imobilizada com sucesso na superfície do GCE por meio de ligações covalentes com as AuNPs. A técnica de amperometria mostrou-se sensível para a determinação de catecol utilizando o biossensor proposto apresentando um baixo limite de detecção comparado a outros trabalhos descritos na literatura. Os resultados demonstraram que o uso das AuNPs podem oferecer vantagens, como o aumento do sinal analítico e biocompatibilidade com a enzima estudada. O biossensor proposto pôde ser aplicado para a determinação de catecol em amostras de águas naturais e água de torneira (água de distribuição) apresentando baixo erro relativo em relação ao método espectrofotométrico de referência.

**BIOSENSOR DE POLIFENOL OXIDASE BASEADO EM UM
ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM
NANOTUBOS DE CARBONO, NANOPARTÍCULAS DE OURO E
HIDROCLORETO DE POLIALILAMINA PARA A DETERMINAÇÃO DE
SULFITO**

CAPÍTULO 5

5 Biossensor de polifenol oxidase baseado em um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono, nanopartículas de ouro e hidrocloreto de polialilamina para a determinação de sulfito

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver um biossensor modificando a superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com a enzima polifenol oxidase (PPO) imobilizada em nanopartículas de ouro (AuNPs) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) funcionalizados em filme de hidrocloreto de polialilamina (PAH) para a determinação de sulfito.

5.2 PARTE EXPERIMENTAL

5.2.1 Reagentes

Sulfito de sódio (CAS: 7757-83-7), catecol (99%) (CAS: 120-80-9), hidrocloreto de polialilamina (CAS: 71550-12-4), nanotubos de carbono de paredes múltiplas (20-30 nm de diâmetro, espessura da parede 1-2 nm e 0,5-2 μm de comprimento e grau de pureza $\geq 95\%$) (CAS: 308068-56-6), ácido tetracloroáurico (III) (HAuCl_4) (CAS: 27988-77-8), cistamina (CAS: 312619-54-8), polivinilpirrolidona (CAS: 9003-39-8) e glutaraldeído 25% v/v (CAS: 111-30-8) foram adquiridos da Sigma–Aldrich. Os sais NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4 utilizados para preparar o eletrólito suporte, tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0), foram adquiridos da Merck. Todos os outros produtos químicos foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida por um sistema Milli-Q (resistividade $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). O tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) foi empregado como eletrólito suporte em todas as medidas com o biossensor. A solução estoque de sulfito 0,1 mol L^{-1} foi preparada diariamente em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) e padronizada por iodometria¹³⁶ antes do uso. As soluções padrão de sulfito foram preparadas em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) à partir da solução estoque e borbulhadas com gás N_2 ultrapuro para prevenir a oxidação química.

As batatas-doces e as amostras de vinho foram adquiridas no comércio local, em supermercados na cidade de São Carlos – SP.

5.2.2 Equipamentos

As medidas eletroanalíticas foram executadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT12 (Utrecht, Holanda) Autolab Ecochemie e os dados foram tratados usando o software GPES 4.9.

A determinação dos pHs das soluções foi realizada em um pHmetro digital ORION, modelo EA 940, conectado a um eletrodo combinado de vidro Digimed com um eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹).

Para centrifugação do homogenato, utilizou-se uma centrífuga Du Pont Instruments sorval, modelo RC-5B.

As medidas espectrofotométricas para a determinação da atividade da enzima PPO foram realizadas com auxílio de um espectrofotômetro da Femto (modelo 435, Brasil), empregando uma cubeta de quartzo (caminho óptico, 1,0 cm).

5.2.3 Célula eletroquímica

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula de compartimento único de 50 mL, confeccionada em vidro borossilicato e equipada com uma tampa de Teflon[®], contendo orifícios para a desoxigenação da amostra com nitrogênio. Uma alíquota de 20 mL de eletrólito suporte foi sempre adicionada para a realização das medidas eletroquímicas. Todos os experimentos foram realizados à temperatura controlada de 25 ± 1 °C.

5.2.4 Eletrodos

Utilizou-se um sistema de três eletrodos, com o eletrodo de trabalho sendo o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE, uma placa de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência à 25 °C, à qual todos os potenciais foram referidos.

5.2.5 Morfologia

A superfície dos filmes contendo nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de alta resolução, utilizando um equipamento modelo Supra 35-VP (Carl Zeiss, Alemanha) com feixe de elétrons de 25 keV. Um disco de carbono vítreo foi usado

para a imobilização da dispersão de MWCNTs-PAH e AuNPs-MWCNTs-PAH, usando o mesmo processo de preparo empregado para a preparação dos eletrodos.

5.2.6 Funcionalização dos nanotubos de carbono (tratamento ácido)

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas foram purificados conforme descrito na Seção 3.2.6.

5.2.7 Síntese das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram obtidas conforme descrito na Seção 4.2.6.

5.2.8 Preparação do extrato bruto de batata doce

A enzima polifenol oxidase (PPO) foi obtida de batatas-doces, conforme procedimento descrito anteriormente¹⁰⁸, e o extrato bruto obtido foi usado como fonte enzimática. Batatas-doces (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) foram lavadas, descascadas e picadas. Em seguida, 25,0 g de batatas-doces foram homogeneizadas em um liquidificador com 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) contendo 2,5 g de polivinilpirrolidona, durante 2 minutos a 4 °C. Posteriormente, o homogenato foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 18000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. A solução sobrenadante foi armazenada em refrigerador a 4 °C e utilizado como fonte enzimática de PPO. A atividade da PPO foi determinada como descrito anteriormente¹⁰⁸, medindo-se a absorbância da *o*-quinona gerada na reação entre PPO (contida no extrato bruto) e solução de catecol em 410 nm. A concentração de proteína total foi determinada em triplicata pelo método de LOWRY et al.¹⁶⁸ usando albumina de soro bovino como padrão.

5.2.9 Preparação do biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE

Inicialmente, um eletrodo de carbono vítreo (GCE, 5 mm de diâmetro) foi cuidadosamente polido com suspensões de micropartículas de alumina de 0,3 e 0,05 µM respectivamente. Em seguida este foi lavado abundantemente com água ultrapura. O CGE foi então sonicado em álcool isopropílico e posteriormente com água ultrapura por cerca de 5 min. Por fim, deixou-se secar à temperatura ambiente.

Uma massa de 1,0 mg de MWCNTs e 1,0 mg de PAH foi adicionada a 500 μL de uma solução de AuNPs e a mistura submetida a ultrassom durante 10 minutos de modo a formar uma suspensão estável de AuNPs-MWCNTs-PAH. Essa suspensão foi armazenada a 4 $^{\circ}\text{C}$ em refrigerador, quando não estava em uso. Em seguida, adicionou-se 20 μL da suspensão de AuNPs-MWCNTs-PAH sobre a superfície do GCE com o auxílio de uma micropipeta e deixou-se secar a temperatura ambiente durante 2 horas. Então, o GCE modificado foi colocado em uma célula eletroquímica contendo KCl 0,1 mol L^{-1} e foram aplicados vinte ciclos na faixa de potencial de trabalho $-0,3$ a $0,7$ V a uma velocidade de 100 mV s^{-1} usando-se voltametria cíclica. O eletrodo foi lavado cuidadosamente com água, deixando-se secar à temperatura ambiente. Subsequentemente, 20 μL de uma solução de cistamina 10 mmol L^{-1} foram adicionados na superfície do GCE modificado com AuNPs-MWCNTs-PAH e deixou-se secar. Em sequência, o eletrodo foi cuidadosamente lavado com água, deixando-se secar à temperatura ambiente. Então, adicionou-se 20 μL de uma solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) e deixou-se secar por uma hora. Após este tempo, o eletrodo foi lavado com solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0), deixando-se secar à temperatura ambiente. Finalmente, adicionou-se 20 μL do extrato bruto contendo a PPO no eletrodo e deixou-se secar por mais uma hora. O biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE foi armazenado à 4 $^{\circ}\text{C}$ em refrigerador em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0), quando não estava em uso. O processo de imobilização da enzima PPO no eletrodo AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE é apresentado na FIGURA 5.1.

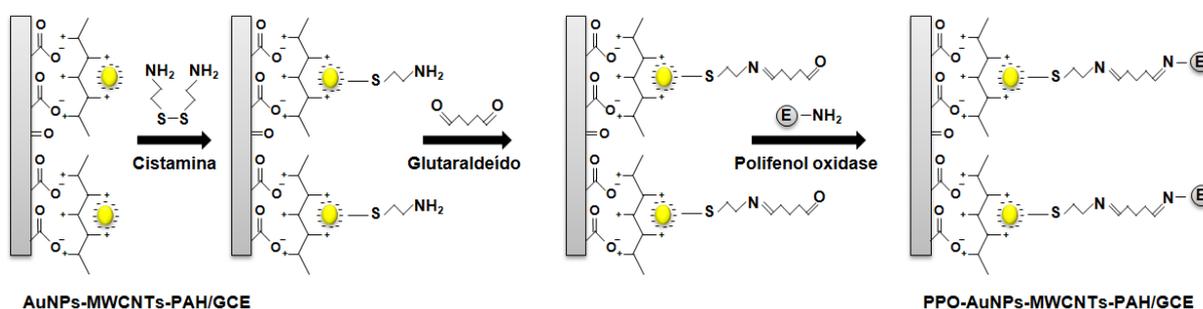


FIGURA 5.1 – Representação esquemática da preparação do biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE.

5.2.10 Amostras

Amostras de vinhos foram utilizadas sem tratamento prévio, assim, uma alíquota de cada amostra foi adicionada diretamente à célula eletroquímica contendo 50 μL de catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), e em seguida os voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos. A concentração de sulfito em cada amostra foi determinada pelo método de adição de padrão. Para cada amostra três determinações foram realizadas, e os desvios-padrão foram calculados.

5.2.11 Método de referência

A titulação iodométrica¹³⁶ foi empregada para comparar os resultados obtidos com o método proposto por voltametria de pulso diferencial (DPV). Uma alíquota de 20 mL de cada amostra contendo sulfito foi transferida para um béquer e o pH ajustado para 4,6. Então a solução da amostra foi transferida para um erlenmeyer e adicionou-se 5,0 mL de solução padrão de iodo. O excesso de iodo foi titulado com solução padrão de tiosulfato de sódio, usando amido como indicador. Estas titulações foram realizadas o mais rápido possível, e o ponto final foi indicado por uma cor azul intensa devido a formação do complexo iodo-amido.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Determinação da atividade da PPO

Inicialmente, a atividade da enzima PPO, o teor de proteína total e a atividade específica do extrato bruto de batata-doce foram determinados de acordo com procedimento estabelecido na literatura¹⁰⁸. Os valores da atividade da PPO e do teor de proteína total foram 1305 unidades de PPO por mL (U mL^{-1}) e $0,442 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente. A atividade específica da PPO de 2952 U mg^{-1} foi calculada pela razão entre a atividade da PPO e a concentração de proteína total.

5.3.2 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado AuNPs-MWCNTs-PAH

Quando as AuNPs e os MWCNTs foram levados ao banho ultrassônico durante 10 minutos, foi observado a formação de uma suspensão estável e

homogênea devido a interação eletrostática entre os grupos carboxílicos na superfície dos MWCNTs funcionalizados e as cadeias de polieletrólito. As AuNPs foram ancoradas na superfície dos nanotubos através de interações eletrostáticas entre o polieletrólito e as nanopartículas, conforme reportado por JIANG et al.⁵⁸.

A integração entre os MWCNTs funcionalizados e o filme AuNPs-PAH permite uma melhor distribuição das AuNPs no filme obtido, com elevada área eletroativa, como será exibido a seguir.

Na FIGURA 5.2 são apresentadas as imagens de MEV do GCE (a), AuNPs-PAH/GCE (b), e AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE (c). É observada uma nítida diferença em relação à rugosidade da superfície destes diferentes eletrodos. Na FIGURA 5.2(c), pode-se observar que um filme denso foi formado e a superfície do GCE foi completamente coberta pelos MWCNTs, quando comparado ao GCE sem modificação (FIGURA 5.2(a)). Ainda na FIGURA 5.2(c), observou-se que as AuNPs estão distribuídas homogeneamente sobre os MWCNTs e possuem tamanho uniforme, com diâmetro médio de 29 nm. Além disso, as AuNPs se dispersam bem nos MWCNTs funcionalizados, quando comparado com AuNPs-PAH/GCE (FIGURA 5.2(b)).

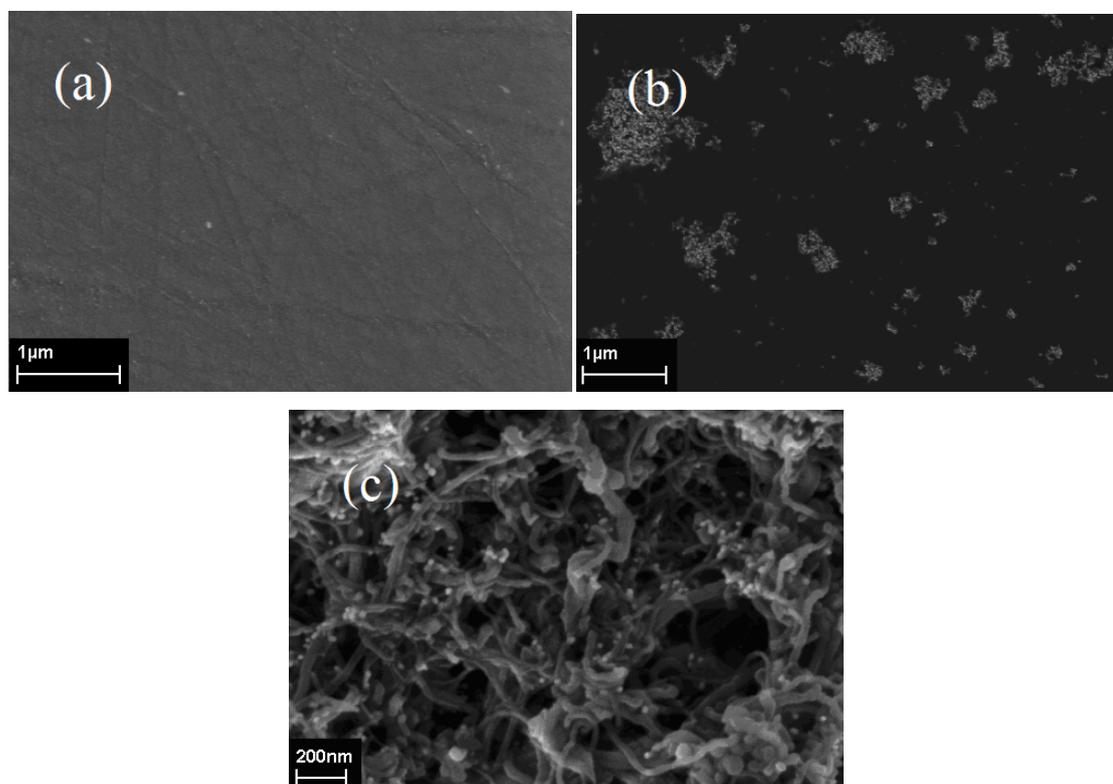


FIGURA 5.2 – Imagens obtidas por MEV da superfície do: (a) GCE , (b) AuNPs-PAH/GCE e (c) AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE.

Outra caracterização das AuNPs foi a obtenção de um voltamograma cíclico do AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Conforme apresentado na FIGURA 5.3, o eletrodo apresentou o perfil característico da reação redox do ouro nesse meio, com picos de oxidação (em $1,05 \text{ V}$) e redução do óxido de ouro (em $0,56 \text{ V}$), Equações descritas na Seção 4.3.1. Esse resultado indica a presença das AuNPs no filme MWCNTs-PAH.

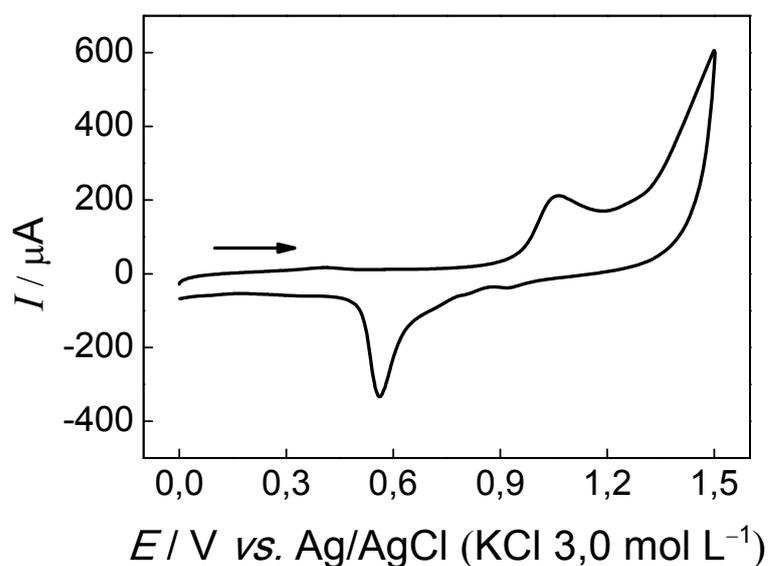


FIGURA 5.3 – Voltamograma cíclico do AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, com $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

As áreas eletroativas dos eletrodos GCE, PAH/GCE, AuNPs-PAH/GCE e AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE foram estimadas em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em presença de hexacianoferrato (II) de potássio $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, aplicando-se a equação de Randles-Sevcik^{148,149} (Equação 13, apresentada na Seção 3.3.1) para um processo reversível.

Os coeficientes angulares dos gráficos de I_{pa} vs. $\nu^{1/2}$ para o processo de oxidação (dados não apresentados) foram: $1,09 \times 10^{-4}$; $1,24 \times 10^{-4}$; $1,34 \times 10^{-4}$ e $4,72 \times 10^{-4} \text{ A V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$ para GCE, PAH/GCE, AuNPs-PAH/GCE e AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE, respectivamente. As áreas eletroativas obtidas foram $0,162$; $0,185$; $0,201$ e $0,705 \text{ cm}^2$ para GCE, PAH/GCE, AuNPs-PAH/GCE e AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE, respectivamente (TABELA 5.1). É importante destacar que o GCE usado neste

procedimento não foi o mesmo dos dois procedimentos anteriores (Capítulos 3 e 4). A integração entre os MWCNTs e as AuNPs levaram a um aumento da área ativa do eletrodo (AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE) em 4,3 vezes em comparação ao GCE.

TABELA 5.1 – Área eletroativa de diferentes eletrodos em meio de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte

Eletrodo	Área ativa (cm^2)
GCE	0,162
PAH/GCE	0,185
AuNPs-PAH/GCE	0,201
AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE	0,705

Área geométrica = $0,196 \text{ cm}^2$

5.3.3 Resposta eletroquímica de catecol no AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE

O comportamento eletroquímico do catecol no AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE foi investigado por voltametria cíclica (VC) e sua resposta comparada ao GCE, PAH/GCE e AuNPs-PAH/GCE. Na FIGURA 5.4 são apresentados os voltamogramas cíclicos para GCE (–), PAH/GCE (–), AuNPs-PAH/GCE (–) e AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE (–), respectivamente, em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) na presença de catecol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

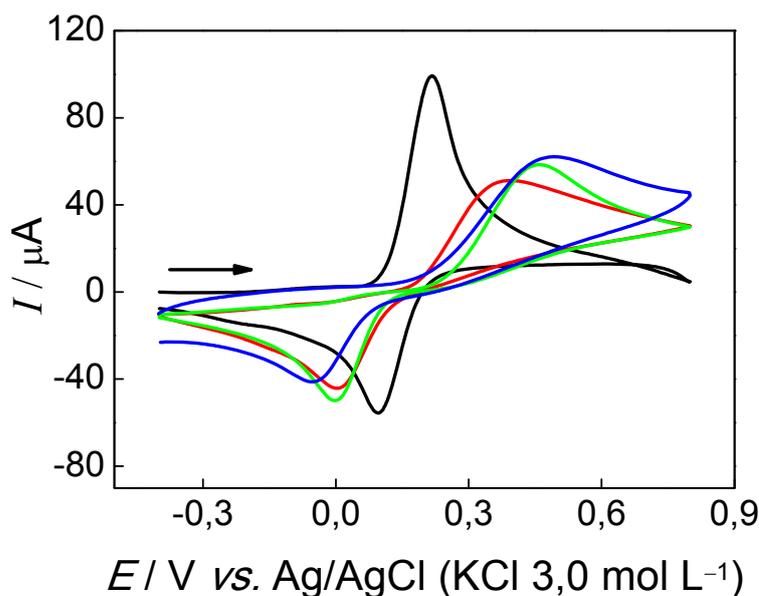


FIGURA 5.4 – Voltamogramas cíclicos, após subtração do branco, para catecol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) empregando-se GCE (—), PAH/GCE (—), AuNPs-PAH/GCE (—) e AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE (—), com velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} .

Como pode ser observado, no GCE (FIGURA 5.4(—)), o catecol exibe um pico de oxidação em cerca de $0,380 \text{ V}$ e o correspondente produto de oxidação (*o*-quinona) exibe um pico catódico em aproximadamente $0,004 \text{ V}$. A separação entre os potenciais de pico (ΔE_p) (diferença entre o potencial de pico anódico (E_{pa}) e o potencial de pico catódico (E_{pc})), é de $0,376 \text{ V}$, o que indica que catecol exibe um comportamento eletroquímico irreversível no GCE. Respostas semelhantes ao GCE foram observadas com PAH/GCE (FIGURA 5.4(—)) e AuNPs-PAH/GCE (FIGURA 5.4(—)). Por outro lado, no AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE (FIGURA 5.4(—)), a reversibilidade eletroquímica do catecol é melhorada, pois houve uma redução do ΔE_p e aumento da corrente de pico associada a esse eletrodo, o que mostra uma atividade catalítica desse eletrodo para oxidação de catecol. A corrente de pico de redução aumentou de $-44,5 \text{ } \mu\text{A}$ no GCE para $-55,8 \text{ } \mu\text{A}$ no AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE, enquanto que o ΔE_p diminuiu de $0,376 \text{ V}$ no GCE para $0,155 \text{ V}$ no AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE. Estes resultados demonstram que existe uma melhora significativa na resposta do eletrodo quando os MWCNTs são incorporado no filme de AuNPs-PAH, indicando que a modificação do GCE com AuNPs-MWCNTs-PAH pode melhorar significativamente a taxa de transferência de elétrons.

5.3.4 Oxidação eletroquímica de catecol no biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE na ausência e presença de sulfito

A enzima PPO foi imobilizada no filme de AuNPs-MWCNTs-PAH usando cistamina e glutaraldeído conforme descrito na Seção 4.2.7. O biossensor proposto foi então utilizado para avaliar o comportamento de catecol. Além disso, a inibição da atividade da PPO pelo sulfito foi investigada para determinação indireta de sulfito em amostras de vinho. O sulfito de sódio, bem como outros compostos que possuem átomos de enxofre (grupo sulfidrílica ou tiol), têm grande afinidade pelos átomos de cobre do centro ativo da PPO e ao se ligarem com este, levam a uma forte inibição. Procedimentos baseados na inibição de uma enzima normalmente oferecem alta sensibilidade e/ou seletividade. Vários estudos baseados na inibição de enzimas oxirredutase tais como polifenol oxidase^{103,104,108,109}, peroxidase^{105,169} e lacase¹⁷⁰ foram relatados na literatura.

Na FIGURA 5.5 é apresentada a diferença nas respostas voltamétricas entre AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE e o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE proposto sob condições experimentais idênticas. Como pode ser observado, quando a enzima PPO foi imobilizada na superfície do AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE, houve um aumento considerável na magnitude de resposta das correntes. O biossensor (FIGURA 5.5(-)) apresenta uma resposta voltamétrica mais elevada (maior corrente de pico anódica e catódica) do que o AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE (FIGURA 5.5(-)) em presença de catecol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e tampão de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) como eletrólito suporte e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Isso ocorre devido a oxidação de catecol para o-quinona na reação enzimática em presença de oxigênio e subsequente redução eletroquímica da o-quinona para catecol na superfície do eletrodo em 0,08 V.

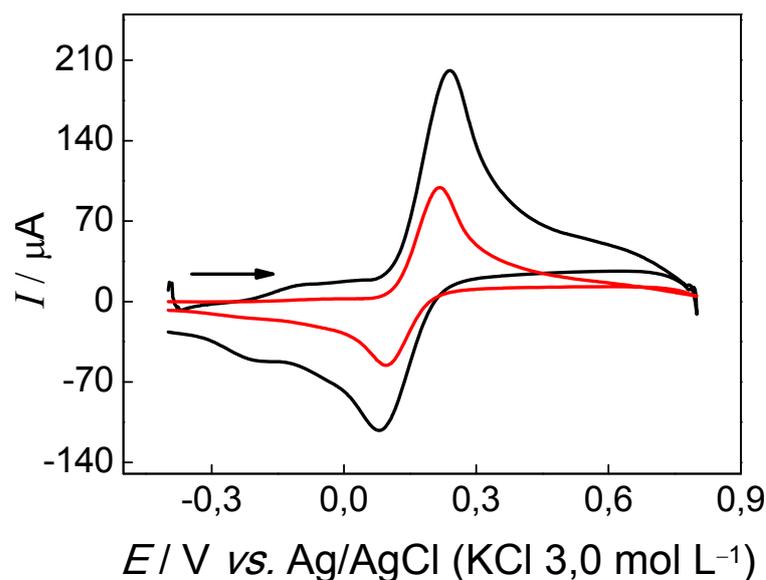


FIGURA 5.5 – Voltamogramas cíclicos, após subtração do branco, do PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE (–) e AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE (–) na presença de catecol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) como eletrólito suporte e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

O efeito da adição de sulfito no comportamento eletroquímico de catecol foi avaliado utilizando o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), conforme apresentado na FIGURA 5.6. Como pode-se observar, o voltamograma cíclico do PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE em eletrólito suporte, não apresenta picos anódicos ou catódicos. Na FIGURA 5.6 (–), o catecol é oxidado pela PPO em presença de oxigênio molecular, para *o*-quinona e este produto é em seguida reduzido eletroquimicamente a catecol. Por outro lado, quando se adiciona sulfito nas concentrações de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (–); $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (–); $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (–) e $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (–) à solução de catecol, há uma diminuição das correntes de pico anódica e catódica.

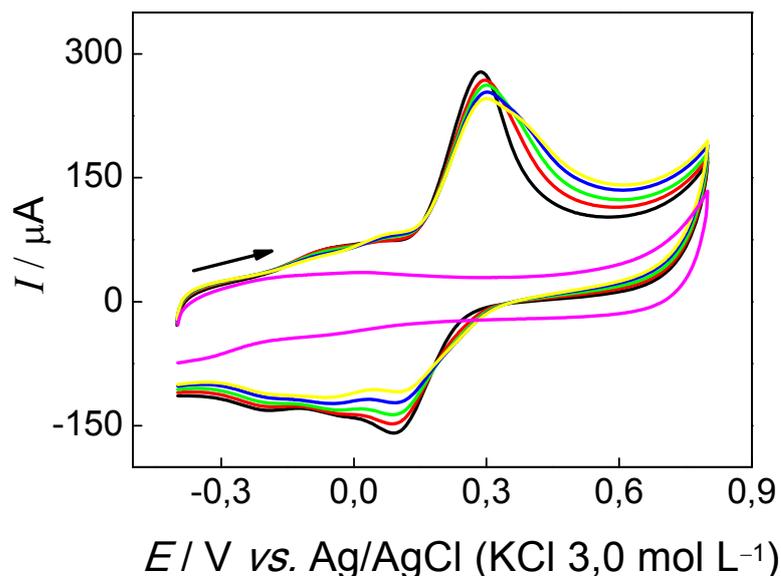


FIGURA 5.6 – Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE, em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) (—); catecol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) (—) e na presença de sulfito $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (—); $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (—); $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (—) e $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (—) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Um diagrama esquemático da reação catalítica entre catecol e sulfito que ocorre na superfície do biossensor é apresentado na FIGURA 5.7. De acordo com trabalhos anteriores reportados na literatura^{109,171,172}, o sulfito pode atuar na inibição direta da enzima PPO, na reação de redução de *o*-quinona a catecol e/ou pode reagir com a *o*-quinona formando um composto *o*-quinona-sulfito, pois o sulfito é um nucleófilo forte^{108,171}.

Estudos de voltametria cíclica foram realizados com o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE para uma solução contendo apenas sulfito, na mesma faixa de potencial de trabalho (sob as mesmas condições) e não apresentaram resposta eletroquímica para esse analito na faixa de potencial investigada.

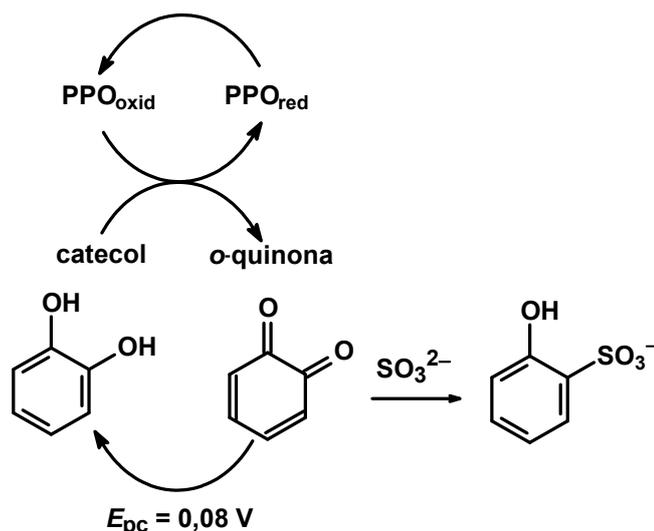


FIGURA 5.7 – Representação esquemática da reação enzimática entre catecol, *o*-quinona, enzima PPO e o sulfito no biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE. Oxid: forma oxidada e Red: forma reduzida. Figura adaptada da tese de VIEIRA¹⁷³.

5.3.5 Efeito do pH

O pH é um parâmetro crítico na determinação da atividade enzimática. Assim, o efeito do pH na resposta analítica do biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE foi avaliado na faixa de pH de 5,0 a 8,0 em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ utilizando voltametria cíclica, na presença de solução de catecol 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹. O gráfico de corrente de pico catódica vs. pH é mostrado na FIGURA 5.8. Pode-se observar que com o aumento do valor do pH, há um aumento no valor do pico de corrente catódica até pH 7,0. Assim, este pH foi selecionado para experimentos posteriores.

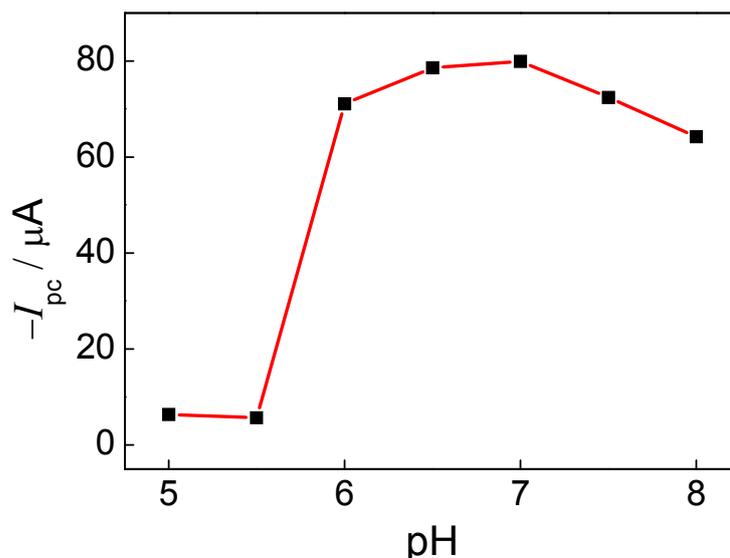


FIGURA 5.8 – Efeito do pH na resposta analítica de catecol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com o pH, empregando-se o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE, com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

5.3.6 Efeito da velocidade de varredura

O efeito da velocidade de varredura foi avaliado na resposta analítica do biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE na presença de catecol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em diferentes velocidades de varredura (5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 e 200 mV s^{-1}). Com o aumento da velocidade de varredura, ocorreu um deslocamento gradual nos potenciais de pico redox com aumento da separação pico-a-pico (dados não apresentados). A dependência das correntes de pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potenciais exibiu uma relação linear indicando que o transporte de massa é controlado por difusão das espécies¹⁵³ sobre a superfície do biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE. Ademais, o gráfico do logaritmo da corrente de pico versus o logaritmo da velocidade de varredura apresentou comportamento linear com inclinação de 0,62, valor próximo do previsto na literatura (0,5) para o transporte de massa controlado pela difusão de espécies.

5.3.7 Determinação indireta de sulfito por voltametria de pulso diferencial

Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos utilizando o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE apresentaram características semelhantes às

obtidas inicialmente por voltametria cíclica. A otimização dos parâmetros experimentais que influenciam a resposta por DPV foi realizada na presença de catecol $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Avaliou-se a velocidade de varredura (ν) no intervalo de 1 a 7 mV s^{-1} , a amplitude de pulso de potencial (a) entre 10 a 75 mV e o tempo de modulação (t) na faixa de 5 a 85 ms . Os valores ótimos obtidos para esses parâmetros foram: $\nu = 1 \text{ mV s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $t = 75 \text{ ms}$. Os parâmetros experimentais otimizados anteriormente levaram em conta reprodutibilidade, estabilidade da linha base, precisão, sensibilidade, sendo assim utilizados na construção da curva analítica para sulfito utilizando o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE. Ao estabilizar a resposta de catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), os voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos em presença de várias concentrações de sulfito. Verificou-se que a corrente decresce com o aumento da concentração de sulfito. O biossensor proposto utilizando a técnica de DPV apresentou uma resposta linear para sulfito na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-7}$ a $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com a correspondente equação $I_{pa} (\mu\text{A}) = 6,34 \times 10^{-8} + 0,122 C (\text{mol L}^{-1})$ com coeficiente de correlação de 0,996. O limite de detecção obtido (calculado a partir da relação: três vezes o desvio padrão para a solução do branco ($n = 10$), dividido pelo coeficiente angular da curva analítica) foi de $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, baixo suficiente para a determinação de sulfito em amostras de vinho. Na FIGURA 5.9 são mostrados os voltamogramas de pulso diferencial obtidos e a curva analítica (inserida) para sulfito usando o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE proposto.

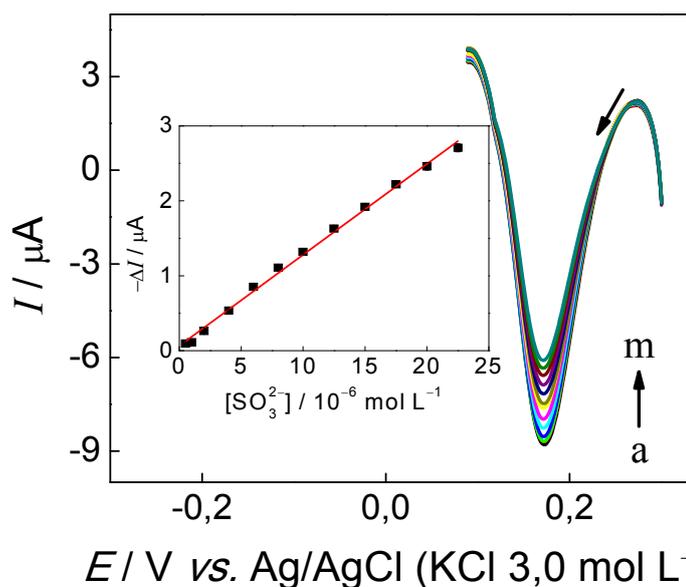


FIGURA 5.9 – Voltamogramas de pulso diferencial, obtidos com o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (a) e diferentes concentrações de sulfito: $5,0 \times 10^{-7}$ (b), $1,0 \times 10^{-6}$ (c), $2,0 \times 10^{-6}$ (d), $4,0 \times 10^{-6}$ (e), $6,0 \times 10^{-6}$ (f), $8,0 \times 10^{-6}$ (g), $1,0 \times 10^{-5}$ (h), $1,2 \times 10^{-5}$ (i), $1,5 \times 10^{-5}$ (j), $1,7 \times 10^{-5}$ (k), $2,0 \times 10^{-5}$ (l) e $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (m). Inserida: Curva analítica obtida para sulfito.

O resultado da determinação analítica de sulfito pelo método proposto apresentou baixo limite de detecção, significativamente menor do que os obtidos pelos métodos previamente desenvolvidos baseados na determinação direta utilizando biossensores^{75,107,140-144}, como mostrado na TABELA 5.2, ou utilizando outros eletrodos quimicamente modificados¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Considerando-se as vantagens do biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE tais como simplicidade de preparação e utilização, baixo custo, estabilidade e tempo de vida, este pode ser utilizado para a determinação indireta de sulfito em amostras de vinho.

TABELA 5.2 – Comparação dos parâmetros analíticos obtidos usando diferentes biossensores para a determinação de sulfito

Eletrodo	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
SO-citc/eletrodo impresso	40 – 5900	40	177
SO-politiramina/GCE platinizado	2,0 – 300	1,0	140
SO-membrana de Teflon/sonda de oxigênio	200 – 1800	200	107
SO/eletrodo de pasta de carbono	10 – 1000	10	141
SO-polipirrol/eletrodo de disco de platina	0,9 – 400	0,9	142
SO-filme fino de mercúrio/GCE	200 – 2800	200	143
SO-polianilina/eletrodo de alumínio	6,0 – 5000	2,0	144
SO-citc-SAMs/eletrodo de fio de ouro	1,0 – 60	1,0	75
SDH/citc-SAMS/eletrodo de ouro	0,5 – 5,5	$4,4 \times 10^{-5}$	145
PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE	0,5 – 22	0,4	Este trabalho

SO: sulfito oxidase; Citc: Citocromo c; SAMs: camadas automontadas;

SDH: sulfito desidrogenase.

A repetibilidade ($n = 10$) de um biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE foi avaliada para uma solução de sulfito $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O desvio padrão relativo obtido (RSD) para repetibilidade intra-dias foi de 1,4% e repetibilidade inter-dia foi de 2,4%, indicando assim uma boa estabilidade do filme. Além disso, a repetibilidade da fabricação de cinco biossensores PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE diferentes na presença de sulfito $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foi avaliada. O desvio padrão relativo foi de 3,9%, apontando uma elevada repetibilidade do preparo dos biossensores.

5.3.8 Efeito de interferentes em potencial

O efeito de interferentes em potencial foi investigado por adição destes compostos em uma solução padrão de catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Foram testados ácido ascórbico, sorbato de sódio, etanol e sacarose, já que são comumente encontrados em amostras de vinho e as proporções testadas (solução padrão: composto interferente) foram 10:1, 1:1 e 1:10.

Os sinais de corrente foram comparados com aqueles obtidos na ausência de cada interferente.

Para o ácido ascórbico, a concentração de 1:10 causou uma interferência de -10% no sinal analítico, isso porque é um agente redutor e compete com sulfito na reação enzimática entre catecol e enzima PPO. No entanto, as amostras de vinho analisadas não possuíam ácido ascórbico em sua composição, e por isso não houve qualquer efeito de interferência na determinação de sulfito. Para amostras que contenham ácido ascórbico, pode-se removê-lo passando-se a amostra através de uma coluna empacotada com pepino, como relatado anteriormente por FATIBELLO-FILHO e VIEIRA¹⁰⁸. O ácido ascórbico é oxidado a ácido dehidroascórbico pela enzima ascorbato oxidase, presente em grande quantidade no pepino.

Para as demais espécies testadas uma variação inferior a 5,0% na resposta do sinal analítico foi observada, indicando assim ausência de interferência significativa daqueles concomitantes na determinação de sulfito pelo biossensor proposto nas concentrações avaliadas.

5.3.9 Aplicação do método proposto na determinação indireta de sulfito em amostras de vinho

O biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE foi aplicado para a determinação indireta de sulfito em seis amostras de vinho, sendo quatro vinhos brancos e dois tintos. O método de adição de padrão foi empregado para se determinar a concentração de sulfito em cada amostra de vinho. Não houve interferência de outras espécies eletroativas nas amostras de vinho analisadas. Para cada amostra três determinações foram realizadas, e os desvios-padrão foram calculados. O estudo de adição e recuperação do sulfito nas amostras de vinho foi realizado, com recuperações entre 91,8% a 108,2%, indicando que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação do sulfito pelo procedimento analítico proposto.

Na TABELA 5.3 estão apresentadas as concentrações de sulfito determinadas em amostras de vinho empregando o método proposto (DPV) e o método de referência¹³⁶. As amostras A-D compreendem vinhos brancos e amostras E-F vinhos tintos. Nota-se que não foram observadas diferenças significativas entre a concentração de sulfito encontrada nas amostras de vinho empregando-se os

métodos proposto (DPV) e de referência (titulação iodométrica). Aplicando-se o teste *t*-pareado¹⁶⁵ para os resultados obtidos, o valor de *t* calculado (0,654) foi menor do que o valor crítico (2,571, $\alpha = 0,05$). Conclue-se então que, não há diferença significativa entre os resultados obtidos, empregando-se os dois métodos analíticos, em um nível de confiança de 95%. As vantagens do método eletroquímico são menor tempo de análise e a cor da amostra que não apresenta nenhuma influência na análise. Os resultados mostram que o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE desenvolvido é adequado para a determinação de sulfito em amostras de vinho.

TABELA 5.3 – Determinação de sulfito em amostras de vinho por DPV usando o biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE e pelo método iodométrico de referência¹³⁶

Amostras	Sulfito (mg L ⁻¹)		
	Método referência*	Método proposto	Erro relativo**
A	175 ± 4	176 ± 2	0,6
B	168 ± 5	166 ± 5	-1,2
C	124 ± 6	129 ± 3	4,0
D	230 ± 5	227 ± 4	-1,3
E	229 ± 6	226 ± 3	-1,3
F	188 ± 7	184 ± 4	-2,1

* Método iodométrico – média de 3 medidas.

** [(Método proposto – método de referência) × 100] / método de referência.

A estabilidade da dispersão AuNPs-MWCNTs-PAH foi estudada ao longo de duas semanas. Em cada determinação, um GCE foi preparado e a resposta analítica determinada para uma solução padrão de catecol $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). Não foi observada redução significativa nos picos de oxidação ou redução. A resposta de corrente catódica diminuiu cerca de 10%, ao longo deste período, indicando a boa estabilidade da suspensão AuNPs-MWCNTs-PAH que pode ser atribuída principalmente à interação eletrostática entre os grupos carboxílicos dos MWCNTs funcionalizados, as AuNPs carregadas negativamente e o polieletrólito catiônico (PAH) que contém cargas positivas (grupos amino)⁵⁸.

A estabilidade do biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE foi avaliada monitorando-se a resposta em solução de catecol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) durante quatro semanas. Após cada medida, o biossensor foi lavado e armazenado à $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). A resposta de corrente catódica diminuiu apenas 11% após 30 dias, o que indica que o procedimento de imobilização da enzima PPO proporciona um efeito positivo na estabilidade do biossensor a longo prazo.

5.4 CONCLUSÕES

Neste trabalho a enzima PPO foi imobilizada no AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE para construção de um biossensor. Usando este biossensor, um aumento do sinal eletroquímico de catecol foi obtido em relação ao AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE. A resposta analítica estável do biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE para catecol é uma característica interessante para a determinação indireta de sulfito utilizando o método de DPV. Resultados satisfatórios foram obtidos nos estudos de adição e recuperação, exibindo valores semelhantes aos encontrados pelo método iodométrico. Este biossensor exibiu boas propriedades analíticas, tais como resposta rápida, alta estabilidade e uma boa faixa de detecção para sulfito, além de ser adequado para análises de rotina, evitando a utilização de equipamentos caros ou morosos procedimentos de preparo de amostras. Além disso, o uso do filme AuNPs-MWCNTs-PAH pode ser interessante para se imobilizar outras biomoléculas em trabalhos futuros.

CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

CAPÍTULO 6

6 CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

6.1 CONCLUSÕES GERAIS

Novas arquiteturas de biossensores eletroquímicos enzimáticos foram desenvolvidas com êxito baseando-se em nanomateriais como nanotubos de carbono de paredes múltiplas e/ou nanopartículas de ouro. As enzimas empregadas foram tirosinase (comercial) e polifenol oxidase (obtida de batatas-doces). Os biossensores foram utilizados na determinação de catecol em amostras de águas naturais e de sulfito em amostras de vinho.

A incorporação do líquido iônico 1-butil-3-metil-imidazol no filme de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e dihexadecil hidrogenofosfato levou a um aumento da resposta analítica e diminuição do potencial de trabalho devido o efeito sinérgico entre BMIM e MWCNTs.

O biossensor Tyr-BMIM-MWCNTs-DHP/GCE apresentou uma faixa linear de $4,9 \times 10^{-6}$ a $1,1 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e limite de detecção de $5,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para catecol utilizando a voltametria linear de varredura. Decorridos 30 dias (ou 190 determinações), a resposta do biossensor foi 95,0 % da resposta inicial. A constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}) calculada foi de 0,19 mmol L⁻¹.

O filme de nanopartículas de ouro e dihexadecil hidrogenofosfato se mostrou uma alternativa interessante para imobilização de enzimas com uso de cistamina e glutaraldeído.

O biossensor Tyr-AuNPs-DHP/GCE foi linear para a concentração de catecol em um intervalo de concentração de $2,5 \times 10^{-6}$ a $9,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e limite de detecção de $1,7 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para catecol utilizando a amperometria. Após 30 dias (ou 240 determinações), a resposta do biossensor caiu 7,4% da resposta inicial.

O filme de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, nanopartículas de ouro e hidrocloreto de polialilamina se mostrou uma alternativa interessante para imobilização enzimática, devido a grande estabilidade do filme gerado através das interações eletrostáticas entre os grupos funcionais dos MWCNTs, as AuNPs e o PAH.

O biossensor PPO-AuNPs-MWCNTs-PAH/GCE apresentou uma faixa linear de $5,0 \times 10^{-7}$ a $2,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $4,0 \times 10^{-7}$ mol

L^{-1} para sulfito. Passados 30 dias, a resposta do biossensor diminuiu para 89,0% do valor inicial.

6.2 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Propor novos biossensores a partir de outros materiais nanoestruturados, como por exemplo, nanopartículas metálicas (Pt, Ag, Bi), grafeno e/ou negro de fumo.

Aplicar os biossensores desenvolvidos para a determinação de amostras com interesse farmacêutico e alimentícios, como dopamina, adrenalina, cafeína, catequinas entre outros.

Utilizar outros surfactantes e/ou polieletrólitos para emprego em novos filmes.

Estudar outros líquidos iônicos para o desenvolvimento de sensores e/ou biossensores eletroquímicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO 7

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FATIBELLO-FILHO, O. & CAPELATO, M.D., "Biossensores". *Quim. Nova.* **15**(1): 28, 1992.
2. THEVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R.A. & WILSON, G.S., "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification". *Biosens. Bioelectron.* **16**(1-2): 121, 2001.
3. EGGINS, B.R., *Biosensors: An Introduction*. 1996, New York: Wiley-Teubner. 212.
4. OLIVEIRA-NETO, G. & YAMANAKA, H., "Enzimas e materiais biológicos imobilizados: biossensores". *Quim. Nova.* **11**(4): 432, 1988.
5. CLARK, L.C. & LYONS, C., "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery". *Ann.NY Acad.Sci.* **102**(1): 29, 1962.
6. UPDIKE, S.J. & HICKS, G.P., "Enzyme electrode". *Nature.* **214**(5092): 986, 1967.
7. GUILBAULT, G.G. & MONTALVO, J.G., "A urea-specific enzyme electrode". *J. Am. Chem. Soc.* **91**(8): 2164, 1969.
8. MEHRVAR, M. & ABDI, M., "Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors". *Anal. Sci.* **20**(8): 1113, 2004.
9. AMINE, A.; MOHAMMADI, H.; BOURAIS, I. & PALLESCHI, G., "Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring". *Biosens. Bioelectron.* **21**(8): 1405, 2006.
10. SOTOMAYOR, M.D. & KUBOTA, L.T., "Enzymeless biosensors: a novel area for the development of amperometric sensors". *Quim. Nova.* **25**(1): 123, 2002.
11. ALFAYA, A.A.S. & KUBOTA, L.T., "The utilization of materials obtained by the sol-gel process in biosensors construction". *Quim. Nova.* **25**(5): 835, 2002.
12. MARQUES, P. & YAMANAKA, H., "Biosensors based on the enzymatic inhibition process". *Quim. Nova.* **31**(7): 1791, 2008.
13. PAULIUKAITE, R.; GHICA, M.E.; FATIBELLO-FILHO, O. & BRETT, C.M.A., "Electrochemical impedance studies of chitosan-modified electrodes for application in electrochemical sensors and biosensors". *Electrochim. Acta.* **55**(21): 6239, 2010.
14. 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.
15. GHICA, M.E.; PAULIUKAITE, R.; FATIBELLO-FILHO, O. & BRETT, C.M.A., "Application of functionalised carbon nanotubes immobilised into chitosan films in amperometric enzyme biosensors". *Sens. Actuator B-Chem.* **142**(1): 308, 2009.
16. PAULIUKAITE, R.; GHICA, M.E.; FATIBELLO-FILHO, 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.
17. 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.
18. MERKOCI, A.; PUMERA, M.; LLOPIS, X.; PEREZ, B.; DEL VALLE, M. & ALEGRET, S., "New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes". *Trac-Trends Anal. Chem.* **24**(9): 826, 2005.
19. WANG, J., "Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review". *Electroanalysis.* **17**(1): 7, 2005.

20. GONG, K.P.; YAN, Y.M.; ZHANG, M.N.; SU, L.; XIONG, S.X. & MAO, L.Q., "Electrochemistry and electroanalytical applications of carbon nanotubes: A review". *Anal. Sci.* **21**(12): 1383, 2005.
 21. WILDGOOSE, G.G.; BANKS, C.E.; LEVENTIS, H.C. & COMPTON, R.G., "Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis". *Microchim. Acta.* **152**(3-4): 187, 2006.
 22. BAUGHMAN, R.H.; ZAKHIDOV, A.A. & DE HEER, W.A., "Carbon nanotubes - the route toward applications". *Science.* **297**(5582): 787, 2002.
 23. YUN, Y.H.; DONG, Z.Y.; SHANOV, V.; HEINEMAN, W.R.; HALSALL, H.B.; BHATTACHARYA, A.; CONFORTI, L.; NARAYAN, R.K.; BALL, W.S. & SCHULZ, M.J., "Nanotube electrodes and biosensors". *Nano Today.* **2**(6): 30, 2007.
 24. 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.
 25. HAMADA, N.; SAWADA, S. & OSHIYAMA, A., "New one-dimensional conductors - graphitic microtubules". *Phys. Rev. Lett.* **68**(10): 1579, 1992.
 26. BELIN, T. & EPRON, F., "Characterization methods of carbon nanotubes: a review". *Mater. Sci. Eng. B-Solid State Mater. Adv. Technol.* **119**(2): 105, 2005.
 27. QUINTERO, J.A.A., *Determinação voltamétrica de fibratos em formulações farmacêuticas utilizando eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono*, in *Departamento de Química*. 2012, Universidade Federal de São Carlos: São Carlos. p. 73.
 28. THESS, A.; LEE, R.; NIKOLAEV, P.; DAI, H.J.; PETIT, P.; ROBERT, J.; XU, C.H.; LEE, Y.H.; KIM, S.G.; RINZLER, A.G.; COLBERT, D.T.; SCUSERIA, G.E.; TOMANEK, D.; FISCHER, J.E. & SMALLEY, R.E., "Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes". *Science.* **273**(5274): 483, 1996.
 29. BETHUNE, D.S.; KIANG, C.H.; DEVRIES, M.S.; GORMAN, G.; SAVOY, R.; VAZQUEZ, J. & BEYERS, R., "Cobalt-catalyzed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layerwalls". *Nature.* **363**(6430): 605, 1993.
 30. IJIMA, S., "Helical microtubules of graphitic carbon". *Nature.* **354**(6348): 56, 1991.
 31. LI, Y.L.; KINLOCH, I.A. & WINDLE, A.H., "Direct spinning of carbon nanotube fibers from chemical vapor deposition synthesis". *Science.* **304**(5668): 276, 2004.
 32. HERBST, M.H.; MACEDO, M.L.F. & ROCCO, A.M., "Technology of carbon nanotubes: Trends and perspectives of a multidisciplinary area". *Quim. Nova.* **27**(6): 986, 2004.
 33. BYL, O.; LIU, J. & YATES, J.T., "Etching of carbon nanotubes by ozone - A surface area study". *Langmuir.* **21**(9): 4200, 2005.
 34. XIA, W.; HAGEN, V.; KUNDU, S.; WANG, Y.M.; SOMSEN, C.; EGGELER, G.; SUN, G.G.; GRUNDMEIER, G.; STRATMANN, M. & MUHLER, M., "Controlled etching of carbon nanotubes by iron-catalyzed steam gasification". *Adv. Mater.* **19**(21): 3648, 2007.
 35. TSANG, S.C.; HARRIS, P.J.F. & GREEN, M.L.H., "Thinning and opening of carbon nanotubes by oxidation using carbon-dioxide". *Nature.* **362**(6420): 520, 1993.
 36. XU, C.L.; CHEN, J.F.; CUI, Y.; HAN, Q.Y.; CHOO, H.; LIAW, P.K. & WU, D.H., "Influence of the surface treatment on the deposition of platinum nanoparticles on the carbon nanotubes". *Adv. Eng. Mater.* **8**(1-2): 73, 2006.
 37. LOBO, A.O.; RAMOS, S.C.; ANTUNES, E.F.; MARCIANO, F.R.; TRAVAIROLDI, V.J. & CORAT, E.J., "Fast functionalization of vertically aligned multiwalled carbon nanotubes using oxygen plasma". *Mater. Lett.* **70**: 89, 2012.
-

38. SHIRAZI, Y.; TOFIGHY, M.A.; MOHAMMADI, T. & PAK, A., "Effects of different carbon precursors on synthesis of multiwall carbon nanotubes: purification and functionalization". *Appl. Surf. Sci.* **257**(16): 7359, 2011.
 39. WANG, L.; FENG, S.A.; ZHAO, J.H.; ZHENG, J.F.; WANG, Z.J.; LI, L. & ZHU, Z.P., "A facile method to modify carbon nanotubes with nitro/amino groups". *Appl. Surf. Sci.* **256**(20): 6060, 2010.
 40. SANTANGELO, S.; MESSINA, G.; FAGGIO, G.; RAHIM, S.H.A. & MILONE, C., "Effect of sulphuric-nitric acid mixture composition on surface chemistry and structural evolution of liquid-phase oxidised carbon nanotubes". *J. Raman Spectrosc.* **43**(10): 1432, 2012.
 41. JIANG, X.; GU, J.; BAI, X.; LIN, L. & ZHANG, Y., "The influence of acid treatment on multi-walled carbon nanotubes". *Pigm. Resin. Technol.* **38**(3): 165, 2009.
 42. KIM, B. & SIGMUND, W.M., "Functionalized multiwall carbon nanotube/gold nanoparticle composites". *Langmuir.* **20**(19): 8239, 2004.
 43. 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". *Synth. Met.* **156**(14-15): 938, 2006.
 44. MASHETER, A.T.; ABIMAN, P.; WILDGOOSE, G.G.; WONG, E.; XIAO, L.; REES, N.V.; TAYLOR, R.; ATTARD, G.A.; BARON, R.; CROSSLEY, A.; JONES, J.H. & COMPTON, R.G., "Investigating the reactive sites and the anomalously large changes in surface pK(a) values of chemically modified carbon nanotubes of different morphologies". *J. Mater. Chem.* **17**(25): 2616, 2007.
 45. 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.
 46. SARTORI, E.R.; VICENTINI, F.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Indirect determination of sulfite using a polyphenol oxidase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles within a poly(allylamine hydrochloride) film". *Talanta.* **87**: 235, 2011.
 47. 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". *Sens. Actuator B-Chem.* **158**(1): 411, 2011.
 48. PEREZ-LOPEZ, B. & MERKOCI, A., "Magnetic nanoparticles modified with carbon nanotubes for electrocatalytic magnetoswitchable biosensing applications". *Adv. Funct. Mater.* **21**(2): 255, 2011.
 49. ZHAO, Q.; ZHAN, D.P.; MA, H.Y.; ZHANG, M.Q.; ZHAO, Y.F.; JING, P.; ZHU, Z.W.; WAN, X.H.; SHAO, Y.H. & ZHUANG, Q.K., "Direct proteins electrochemistry based on ionic liquid mediated carbon nanotube modified glassy carbon electrode". *Front. Biosci.* **10**: 326, 2005.
 50. XIA, Y.N.; XIONG, Y.J.; LIM, B. & SKRABALAK, S.E., "Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics?". *Angew. Chem.-Int. Edit.* **48**(1): 60, 2009.
 51. TOKONAMI, S.; YAMAMOTO, Y.; SHIIGI, H. & NAGAOKA, T., "Synthesis and bioanalytical applications of specific-shaped metallic nanostructures: A review". *Anal. Chim. Acta.* **716**: 76, 2012.
 52. CHEON, J. & LEE, J.H., "Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology". *Accounts Chem. Res.* **41**(12): 1630, 2008.
-

53. JU-NAM, Y. & LEAD, J.R., "Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications". *Sci. Total Environ.* **400**(1-3): 396, 2008.
 54. TURKEVICH, J.; STEVENSON, P.C. & HILLIER, J., "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold". *Discuss. Faraday Soc.*, (11): 55, 1951.
 55. BRUST, M.; WALKER, M.; BETHELL, D.; SCHIFFRIN, D.J. & WHYMAN, R., "Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system". *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.*, (7): 801, 1994.
 56. WELCH, C.W. & COMPTON, R.G., "The use of nanoparticles in electroanalysis: a review". *Anal. Bioanal. Chem.* **384**(3): 601, 2006.
 57. 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.
 58. JIANG, K.Y.; EITAN, A.; SCHADLER, L.S.; AJAYAN, P.M.; SIEGEL, R.W.; GROBERT, N.; MAYNE, M.; REYES-REYES, M.; TERRONES, H. & TERRONES, M., "Selective attachment of gold nanoparticles to nitrogen-doped carbon nanotubes". *Nano Lett.* **3**(3): 275, 2003.
 59. COMPTON, R.G.; WILDGOOSE, G.G.; REES, N.V.; STREETER, I. & BARON, R., "Design, fabrication, characterisation and application of nanoelectrode arrays". *Chem. Phys. Lett.* **459**(1-6): 1, 2008.
 60. GUO, S.J. & DONG, S.J., "Biomolecule-nanoparticle hybrids for electrochemical biosensors". *Trac-Trends Anal. Chem.* **28**(1): 96, 2009.
 61. 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.
 62. 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". *Diam. Relat. Mat.* **25**: 128, 2012.
 63. PENN, S.G.; HE, L. & NATAN, M.J., "Nanoparticles for bioanalysis". *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**(5): 609, 2003.
 64. PINGARRON, J.M.; YANEZ-SEDENO, P. & GONZALEZ-CORTES, A., "Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors". *Electrochim. Acta.* **53**(19): 5848, 2008.
 65. VICENTINI, F.C.; JANEGITZ, B.C.; BRETT, C.M.A. & FATIBELLO-FILHO, O., "Tyrosinase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and 1-butyl-3-methylimidazolium chloride within a dihexadecylphosphate film". *Sens. Actuator B-Chem.* **188**(0): 1101, 2013.
 66. WU, Y.H., "Nano-TiO₂/dihexadecylphosphate based electrochemical sensor for sensitive determination of pentachlorophenol". *Sens. Actuator B-Chem.* **137**(1): 180, 2009.
 67. ARDILA, J.A.; OLIVEIRA, G.G.; MEDEIROS, R.A. & FATIBELLO-FILHO, O., "Determination of gemfibrozil in pharmaceutical and urine samples by square-wave adsorptive stripping voltammetry using a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes within a dihexadecyl hydrogen phosphate film". *J. Electroanal. Chem.* **690**: 32, 2013.
-

68. 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.
 69. WU, Y.H.; LIU, X.Q.; ZHANG, L. & WANG, C.T., "An amperometric biosensor based on rat cytochrome p450 1A1 for benzo a pyrene determination". *Biosens. Bioelectron*. **26**(5): 2177, 2011.
 70. KASHANIAN, S.; TARIGHAT, F.A.; RAFIPOUR, R. & ABBASI-TARIGHAT, M., "Biomimetic synthesis and characterization of cobalt nanoparticles using apoferritin, and investigation of direct electron transfer of Co(NPs)-ferritin at modified glassy carbon electrode to design a novel nanobiosensor". *Mol. Biol. Rep*. **39**(9): 8793, 2012.
 71. FANG, M.M.; KIM, C.H.; SAUPE, G.B.; KIM, H.N.; WARAKSA, C.C.; MIWA, T.; FUJISHIMA, A. & MALLOW, T.E., "Layer-by-layer growth and condensation reactions of niobate and titanoniobate thin films". *Chem. Mat*. **11**(6): 1526, 1999.
 72. SILVA, C.P. & CARAPUCA, H.M., "Glassy carbon electrodes coated with poly(allylamine hydrochloride), PAH: Characterization studies and application to ion-exchange voltammetry of trace lead(II) at combined PAH/mercury film electrodes". *Electrochim. Acta*. **52**(3): 1182, 2006.
 73. SARTORI, E.R.; TAKEDA, H.H. & FATIBELLO-FILHO, O., "Glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a poly(allylamine hydrochloride) film for the voltammetric determination of sulfite in foods". *Electroanalysis*. **23**(11): 2526, 2011.
 74. SUN, P.; HU, N.F. & LIU, H.Y., "pH-switchable bioelectrocatalysis based on weak polyelectrolyte multilayers". *Electroanalysis*. **23**(2): 513, 2011.
 75. SPRICIGO, R.; DRONOV, R.; LISDAT, F.; LEIMKUEHLER, S.; SCHELLER, F. & WOLLENBERGER, U., "Electrocatalytic sulfite biosensor with human sulfite oxidase co-immobilized with cytochrome c in a polyelectrolyte-containing multilayer". *Anal. Bioanal. Chem*. **393**(1): 225, 2009.
 76. KIM, J.B.; PREMKUMAR, T.; LEE, K. & GECKELER, K.E., "A facile approach to single-wall carbon nanotube/poly(allylamine) nanocomposites". *Macromol. Rapid Commun*. **28**(3): 276, 2007.
 77. OLIVEIRA, G.G.; SARTORI, E.R.; TANAKA, F.Y. & FATIBELLO-FILHO, O., "Glassy carbon electrode modified with functionalized multiwalled carbon nanotubes within a poly(allylamine hydrochloride) film for the determination of propylthiouracil in pharmaceuticals by cathodic stripping voltammetry". *Chem. Sens.*, (15): 1, 2012.
 78. SARTORI, E.R. & FATIBELLO-FILHO, O., "Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid and sulfite in beverages employing a glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes within a poly(allylamine hydrochloride) film". *Electroanalysis*. **24**(3): 627, 2012.
 79. 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". *Sens. Actuator B-Chem*. **161**(1): 755, 2012.
 80. GRUNLAN, J.C.; LIU, L. & REGEV, O., "Weak polyelectrolyte control of carbon nanotube dispersion in water". *J. Colloid Interface Sci*. **317**(1): 346, 2008.
 81. SHIDDIKY, M.J.A. & TORRIERO, A.A.J., "Application of ionic liquids in electrochemical sensing systems". *Biosens. Bioelectron*. **26**(5): 1775, 2011.
 82. TORRIERO, A.A.J. & BOND, A.M., *Electroanalytical Chemistry Research Trend*. 2009, New York: Nova Science Publisher Inc.
-

83. ENDRES, F.; MACFARLANE, D. & ABBOTT, A., *Electrodeposition from Ionic Liquids*. 2008, Weinheim: Wiley-VCH. 410.
 84. WEI, D. & IVASKA, A., "Applications of ionic liquids in electrochemical sensors". *Anal. Chim. Acta.* **607**(2): 126, 2008.
 85. FRANZOI, A.C.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; MOCCELINI, S.K.; FERNANDES, S.C.; VIEIRA, I.C. & DUPONT, J., "Incorporation of ionic liquids in the construction of electrochemical sensors". *Quim. Nova.* **34**(6): 1042, 2011.
 86. ASIKKALA, J., *Application of Ionic Liquids and Microwave Activation in Selected Organic Reactions*, in *Department of Chemistry*. 2008, University of Oulu: Oulu, Finland. p. 170.
 87. ANTHONY, J.L.; MAGINN, E.J. & BRENNECKE, J.F., "Solution thermodynamics of imidazolium-based ionic liquids and water". *J. Phys. Chem. B.* **105**(44): 10942, 2001.
 88. SEDDON, K.R.; STARK, A. & TORRES, M.J., "Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids". *Pure Appl. Chem.* **72**(12): 2275, 2000.
 89. YANG, Z. & PAN, W.B., "Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis". *Enzyme Microb. Technol.* **37**(1): 19, 2005.
 90. WU, X.E.; ZHAO, F.; VARCOE, J.R.; THUMSER, A.E.; AVIGNONE-ROSSA, C. & SLADE, R.C.T., "Direct electron transfer of glucose oxidase immobilized in an ionic liquid reconstituted cellulose-carbon nanotube matrix". *Bioelectrochemistry.* **77**(1): 64, 2009.
 91. GUPTA, M.K.; KHOKHAR, S.K.; PHILLIPS, D.M.; SOWARDS, L.A.; DRUMMY, L.F.; KADAKIA, M.P. & NAIK, R.R., "Patterned silk films cast from ionic liquid solubilized fibroin as scaffolds for cell growth". *Langmuir.* **23**(3): 1315, 2007.
 92. TUNCKOL, M.; DURAND, J. & SERP, P., "Carbon nanomaterial-ionic liquid hybrids". *Carbon.* **50**(12): 4303, 2012.
 93. WANG, C.H.; WU, C.H.; WU, J.W.; LEE, M.T.; CHANG, J.K.; GER, M.D. & SUN, C.L., "The effects of ionic liquid on the electrochemical sensing performance of graphene- and carbon nanotube-based electrodes". *Analyst.* **138**(2): 576, 2013.
 94. MAGUERROSKI, K.D.; FERNANDES, S.C.; FRANZOI, A.C. & VIEIRA, I.C., "Pine nut peroxidase immobilized on chitosan crosslinked with citrate and ionic liquid used in the construction of a biosensor". *Enzyme Microb. Technol.* **44**(6-7): 400, 2009.
 95. MUSAMEH, M.M.; KACHOOSANGI, R.T.; XIAO, L.; RUSSELL, A. & COMPTON, R.G., "Ionic liquid-carbon composite glucose biosensor". *Biosens. Bioelectron.* **24**(1): 87, 2008.
 96. 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.
 97. 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.
 98. LU, L.M.; ZHANG, L.; ZHANG, X.B.; HUAN, S.Y.; SHEN, G.L. & YU, R.Q., "A novel tyrosinase biosensor based on hydroxyapatite-chitosan nanocomposite for the detection of phenolic compounds". *Anal. Chim. Acta.* **665**(2): 146, 2010.
 99. 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.
-

100. YANG, L.J.; XIONG, H.Y.; ZHANG, X.H. & WANG, S.F., "A novel tyrosinase biosensor based on chitosan-carbon-coated nickel nanocomposite film". *Bioelectrochemistry*. **84**: 44, 2012.
 101. ARECCHI, A.; SCAMPICCHIO, M.; DRUSCH, S. & MANNINO, S., "Nanofibrous membrane based tyrosinase-biosensor for the detection of phenolic compounds". *Anal. Chim. Acta*. **659**(1-2): 133, 2010.
 102. FATIBELLO-FILHO, O. & VIEIRA, I.D., "Analytical use of vegetal tissue and crude extract as enzymatic source". *Quim. Nova*. **25**(3): 455, 2002.
 103. VIEIRA, I.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Flow injection spectrophotometric determination of total phenols using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as enzymatic source". *Anal. Chim. Acta*. **366**(1-3): 111, 1998.
 104. VIEIRA, I.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "L-cysteine determination using a polyphenol oxidase-based inhibition flow injection procedure". *Anal. Chim. Acta*. **399**(3): 287, 1999.
 105. FATIBELLO-FILHO, O. & VIEIRA, I.C., "L-ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*)". *J. Braz. Chem. Soc.* **11**(4): 412, 2000.
 106. KOZAN, J.V.B.; SILVA, R.P.; SERRANO, S.H.P.; LIMA, A.W.O. & ANGNES, L., "Biosensing hydrogen peroxide utilizing carbon paste electrodes containing peroxidases naturally immobilized on coconut (*Cocos nucifera* L.) fibers". *Anal. Chim. Acta*. **591**(2): 200, 2007.
 107. SEZGINTURK, M.K. & DINCKAYA, E., "Direct determination of sulfite in food samples by a biosensor based on plant tissue homogenate". *Talanta*. **65**(4): 998, 2005.
 108. FATIBELLO-FILHO, O. & VIEIRA, I.C., "Flow injection spectrophotometric determination of sulfite using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as a source of polyphenol oxidase". *Anal. Chim. Acta*. **354**(1-3): 51, 1997.
 109. TEKE, M.; SEZGINTURK, M.K. & DINCKAYA, E., "Sulfite determination by a biosensor based on bay leaf tissue homogenate: very simple and economical method". *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **37**(3): 138, 2009.
 110. DANTONI, P.; SERRANO, S.H.P.; OLIVEIRA-BRETT, A.M. & GUTZ, I.G.R., "Flow-injection determination of catechol with a new tyrosinase/DNA biosensor". *Anal. Chim. Acta*. **366**(1-3): 137, 1998.
 111. VIEIRA, I.C.; FATIBELLO-FILHO, O.; GRANATO, A.C. & LUPETTI, K.O., "Titulação amperométrica de compostos fenólicos usando polifenol oxidase de vegetal como titulante". *Eclética Quim.* **29**(2): 7, 2004.
 112. RAJESH; TAKASHIMA, W. & KANETO, K., "Amperometric phenol biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase onto an electrochemically prepared novel copolymer poly (N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film". *Sens. Actuator B-Chem.* **102**(2): 271, 2004.
 113. YILDIZ, H.B.; CASTILLO, J.; GUSCHIN, D.A.; TOPPARE, L. & SCHUHMANN, W., "Phenol biosensor based on electrochemically controlled integration of tyrosinase in a redox polymer". *Microchim. Acta*. **159**(1-2): 27, 2007.
 114. CHRISWELL, C.D.; CHANG, R.C. & FRITZ, J.S., "Chromatographic determination of phenols in water". *Anal. Chem.* **47**(8): 1325, 1975.
 115. GATTI, R.; GIOIA, M.G.; DI PIETRA, A.M. & CAVRINI, V., "Analysis of phenols in pharmaceuticals by liquid chromatography after pre-column labelling and on-
-

- line post-column photochemical derivatization". *Anal. Chim. Acta.* **447**(1-2): 89, 2001.
116. NACZK, M. & SHAHIDI, F., "Extraction and analysis of phenolics in food". *J. Chromatogr. A.* **1054**(1-2): 95, 2004.
117. CHRISTODOULEAS, D.; FOTAKIS, C.; ECONOMOU, A.; PAPADOPOULOS, K.; TIMOTHEOU-POTAMIA, M. & CALOKERINOS, A., "Flow-based methods with chemiluminescence detection for food and environmental analysis: a review". *Anal. Lett.* **44**(1-3): 176, 2011.
118. KRONHOLM, J.; REVILLA-RUIZ, P.; PORRAS, S.P.; HARTONEN, K.; CARABIAS-MARTINEZ, R. & RIEKKOLA, M.L., "Comparison of gas chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis in analysis of phenolic compounds extracted from solid matrices with pressurized hot water". *J. Chromatogr. A.* **1022**(1-2): 9, 2004.
119. GREENBERG, A.E.; CLESCERI, L.S. & EATON, A.D., *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th ed. 1995, USA: American Public Health Association.
120. WANG, L.T.; ZHANG, Y.; DU, Y.L.; LU, D.B.; ZHANG, Y.Z. & WANG, C.M., "Simultaneous determination of catechol and hydroquinone based on poly (diallyldimethylammonium chloride) functionalized graphene-modified glassy carbon electrode". *J. Solid State Electrochem.* **16**(4): 1323, 2012.
121. QI, H.L. & ZHANG, C.X., "Simultaneous determination of hydroquinone and catechol at a glassy carbon electrode modified with multiwall carbon nanotubes". *Electroanalysis.* **17**(10): 832, 2005.
122. TAN, Y.Y.; KAN, J.Q. & LI, S.Q., "Amperometric biosensor for catechol using electrochemical template process". *Sens. Actuator B-Chem.* **152**(2): 285, 2011.
123. SOLNA, R.; SAPELNIKOVA, S.; SKLADAL, P.; WINTHER-NIELSEN, M.; CARLSSON, C.; EMNEUS, J. & RUZGAS, T., "Multienzyme electrochemical array sensor for determination of phenols and pesticides". *Talanta.* **65**(2): 349, 2005.
124. CHEN, M.F.; LI, X. & MA, X.Y., "Selective determination of catechol in wastewater at silver doped polyglycine modified film electrode". *Int. J. Electrochem. Sci.* **7**(3): 2616, 2012.
125. TEMBE, S.; INAMDAR, S.; HARAM, S.; KARVE, M. & D'SOUZA, S.F., "Electrochemical biosensor for catechol using agarose-guar gum entrapped tyrosinase". *J. Biotechnol.* **128**(1): 80, 2007.
126. OZONER, S.K.; YALVAC, M. & ERHAN, E., "Flow injection determination of catechol based on polypyrrole-carbon nanotube-tyrosinase biocomposite detector". *Curr. Appl. Phys.* **10**(1): 323, 2010.
127. KHEIRI, F.; SABZI, R.E.; JANNATDOUST, E. & SEDGHI, H., "Acetone extracted propolis as a novel membrane and its application in phenol biosensors: the case of catechol". *J. Solid State Electrochem.* **15**(11-12): 2593, 2011.
128. HAN, R.X.; CUI, L.; AI, S.Y.; YIN, H.S.; LIU, X.G. & QIU, Y.Y., "Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized in hydrotalcite-like compounds film for the determination of polyphenols". *J. Solid State Electrochem.* **16**(2): 449, 2012.
129. MACHADO, R.M.D.; TOLEDO, M.C.F. & VICENTE, E., "Sulfitos em alimentos". *Braz. J. Food Technol.* **9**(4): 265, 2006.
130. PASIUKBRONIKOWSKA, W. & RUDZINSKI, K.J., "Absorption of SO₂ into aqueous systems". *Chem. Eng. Sci.* **46**(9): 2281, 1991.
-

131. DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N. & BRANEN, A.L., *Antimicrobials in Food*. 3 ed. 2005, New York: CRC Press. 706.
 132. FAVERO, D.M.; RIBEIRO, C.S.G. & AQUINO, A.D., "Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população". *Seg. Al. Nutr.* **18**(1): 11, 2011.
 133. ABIA – Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação., in *Compêndio da Legislação Brasileira de Alimentos*. 2011.
 134. TRENERRY, V.C., "The determination of the sulphite content of some foods and beverages by capillary electrophoresis". *Food Chem.* **55**(3): 299, 1996.
 135. KOCH, M.; KOPPEN, R.; SIEGEL, D.; WITT, A. & NEHLS, I., "Determination of total sulfite in wine by ion chromatography after in-sample oxidation". *J. Agric. Food Chem.* **58**(17): 9463, 2010.
 136. AOAC, *Official methods of analysis of AOAC international*. sixteenth ed. 1995, USA: AOAC International.
 137. MONIER-WILLIAMS, G.W., "The determination of sulphur dioxide in foods". *Analyst.* **52**(615): 343, 1927.
 138. ISAAC, A.; LIVINGSTONE, C.; WAIN, A.J.; COMPTON, R.G. & DAVIS, J., "Electroanalytical methods for the determination of sulfite in food and beverages". *Trac-Trends Anal. Chem.* **25**(6): 589, 2006.
 139. FENG, C.J.; TOLLIN, G. & ENERNARK, J.H., "Sulfite oxidizing enzymes". *Biochim. Biophys. Acta.* **1774**(5): 527, 2007.
 140. SITUMORANG, M.; HIBBERT, D.B.; GOODING, J.J. & BARNETT, D., "A sulfite biosensor fabricated using electrodeposited polytyramine: application to wine analysis". *Analyst.* **124**(12): 1775, 1999.
 141. ZHAO, M.; HIBBERT, D.B. & GOODING, J.J., "Determination of sulfite in beer samples using an amperometric flow channel biosensor employing sulfite oxidase". *Anal. Chim. Acta.* **556**(1): 195, 2006.
 142. AMEER, Q. & ADELOJU, S.B., "Galvanostatic entrapment of sulfite oxidase into ultrathin polypyrrole films for improved amperometric biosensing of sulfite". *Electroanalysis.* **20**(23): 2549, 2008.
 143. DINCKAYA, E.; SEZGINTURK, M.K.; AKYILMAZ, E. & ERTAS, F.N., "Sulfite determination using sulfite oxidase biosensor based glassy carbon electrode coated with thin mercury film". *Food Chem.* **101**(4): 1540, 2007.
 144. BAHMANI, B.; MOZTARZADEH, F.; RABIEE, M. & TAHRIRI, M., "Development of an electrochemical sulfite biosensor by immobilization of sulfite oxidase on conducting polyaniline film". *Synth. Met.* **160**(23-24): 2653, 2010.
 145. KALIMUTHU, P.; TKAC, J.; KAPPLER, U.; DAVIS, J.J. & BERNHARDT, P.V., "Highly sensitive and stable electrochemical sulfite biosensor incorporating a bacterial sulfite dehydrogenase". *Anal. Chem.* **82**(17): 7374, 2010.
 146. 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.
 147. CAI, C.X. & CHEN, J., "Direct electron transfer of glucose oxidase promoted by carbon nanotubes". *Anal. Biochem.* **332**(1): 75, 2004.
 148. BARD, A.J. & FAULKNER, L.R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2 ed. 2001, New York: John Wiley & Sons Inc.
 149. BRETT, C.M.A. & BRETT, A.M.O., *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*. 1993, Oxford: Oxford University Press. 464.
 150. KONOPKA, S.J. & MCDUFFIE, B., "Diffusion coefficients of ferricyanide and ferrocyanide ions in aqueous media, using twin-electrode thin-layer electrochemistry". *Anal. Chem.* **42**(14): 1741, 1970.
-

151. TAO, H.; WEI, W.Z.; ZENG, X.D.; LIU, X.Y.; ZHANG, X.J. & ZHANG, Y.M., "Electrocatalytic oxidation and determination of estradiol using an electrode modified with carbon nanotubes and an ionic liquid". *Microchim. Acta.* **166**(1-2): 53, 2009.
 152. YU, P.; LIN, Y.Q.; XIANG, L.; SU, L.; ZHANG, J. & MAO, L.Q., "Molecular films of water-miscible ionic liquids formed on glassy carbon electrodes: Characterization and electrochemical applications". *Langmuir.* **21**(20): 9000, 2005.
 153. GOSSER, D.K., *Cyclic Voltammetry*. 1994, New York: VCH.
 154. LAVIRON, E., "General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems". *J. Electroanal. Chem.* **101**(1): 19, 1979.
 155. KERTESZ, D. & ZITO, R., "Mushroom polyphenol oxidase I. purification and general properties". *Biochim. Biophys. Acta.* **96**(3): 447, 1965.
 156. LIU, Z.J.; LIU, B.H.; KONG, J.L. & DENG, J.Q., "Probing trace phenols based on mediator-free alumina sol-gel derived tyrosinase biosensor". *Anal. Chem.* **72**(19): 4707, 2000.
 157. JI, X.P.; LI, X.R.; WANG, N.; NI, R.X.; LIU, X.H. & XIONG, H.A., "Attachment of tyrosinase on mixed self-assembled monolayers for the construction of electrochemical biosensor". *Chin. Chem. Lett.* **21**(10): 1239, 2010.
 158. BURESTEDT, E.; NARVAEZ, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L.; EMNEUS, J.; DOMINGUEZ, E. & MARKOVARGA, G., "Rate-limiting steps of tyrosinase-modified electrodes for the detection of catechol". *Anal. Chem.* **68**(9): 1605, 1996.
 159. SERRA, B.; JIMENEZ, S.; MENA, M.L.; REVIEJO, A.J. & PINGARRON, J.M., "Composite electrochemical biosensors: a comparison of three different electrode matrices for the construction of amperometric tyrosinase biosensors". *Biosens. Bioelectron.* **17**(3): 217, 2002.
 160. 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.
 161. KIRALP, S.; TOPPARE, L. & YAGCI, Y., "Immobilization of polyphenol oxidase in conducting copolymers and determination of phenolic compounds in wines with enzyme electrodes". *Int. J. Biol. Macromol.* **33**(1-3): 37, 2003.
 162. BROWN, R.S.; MALE, K.B. & LUONG, J.H.T., "A substrate recycling assay for phenolic-compounds using tyrosinase and NADH". *Anal. Biochem.* **222**(1): 131, 1994.
 163. ESPIN, J.C.; MORALES, M.; GARCIA-RUIZ, P.A.; TUDELA, J. & GARCIA-CANOVAS, F., "Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase". *J. Agric. Food Chem.* **45**(4): 1084, 1997.
 164. SMITH, J.L. & KRUEGER, R.C., "Separation and purification of phenolases of common mushroom". *J. Biol. Chem.* **237**(4): 1121, 1962.
 165. ANDERSON, R.L., *Practical Statistics for Analytical Chemists*. 1987, New York: Van Nostrand Reinhold.
 166. WANG, Y.; LABORDA, E.; CROSSLEY, A. & COMPTON, R.G., "Surface oxidation of gold nanoparticles supported on a glassy carbon electrode in sulphuric acid medium: contrasts with the behaviour of 'macro' gold". *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**(9): 3133, 2013.
-

167. SONG, W.; LI, D.W.; LI, Y.T.; LI, Y. & LONG, Y.T., "Disposable biosensor based on graphene oxide conjugated with tyrosinase assembled gold nanoparticles". *Biosens. Bioelectron.* **26**(7): 3181, 2011.
 168. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J., "Protein measurement with the folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* **193**(1): 265, 1951.
 169. YANG, Y.H.; YANG, M.H.; WANG, H.; JIANG, J.H.; SHEN, G.L. & YU, R.Q., "An amperometric horseradish peroxidase inhibition biosensor based on a cysteamine self-assembled monolayer for the determination of sulfides". *Sens. Actuator B-Chem.* **102**(1): 162, 2004.
 170. SANTHIAGO, M. & VIEIRA, I.C., "L-Cysteine determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on laccase from *Aspergillus oryzae*". *Sens. Actuator B-Chem.* **128**(1): 279, 2007.
 171. NEMATOLLAHI, D.; TAMMARI, E. & KARBASI, H., "Electrooxidation of catechols in the presence of sulfite: presentation of a facile and green method for aromatic sulfonation". *Int. J. Electrochem. Sci.* **2**(12): 986, 2007.
 172. PILIZOTA, V. & SUBARIC, D., "Control of enzymatic browning of foods". *Food Technol. Biotechnol.* **36**(3): 219, 1998.
 173. VIEIRA, I.C., *Desenvolvimento e aplicação de métodos enzimáticos para determinação de fenóis, sulfito e catecolaminas usando extrato bruto da batata doce (Ipomoea batatas (L.)Lam.)*, in *Departamento de Química*. 1997, Universidade Federal de São Carlos: São Carlos. p. 190.
 174. ORDEIG, O.; BANKS, C.E.; DEL CAMPO, F.J.; MUNOZ, F.X.; DAVIS, J. & COMPTON, R.G., "Sulfite determination at in situ plated copper modified gold ultramicroelectrode arrays". *Electroanalysis.* **18**(3): 247, 2006.
 175. ZHOU, H.; YANG, W.W. & SUN, C.Q., "Amperometric sulfite sensor based on multiwalled carbon nanotubes/ferrocene-branched chitosan composites". *Talanta.* **77**(1): 366, 2008.
 176. SAFAVI, A.; MALEKI, N.; MOMENI, S. & TAJABADI, F., "Highly improved electrocatalytic behavior of sulfite at carbon ionic liquid electrode: application to the analysis of some real samples". *Anal. Chim. Acta.* **625**(1): 8, 2008.
 177. ABASS, A.K.; HART, J.P. & COWELL, D., "Development of an amperometric sulfite biosensor based on sulfite oxidase with cytochrome c, as electron acceptor, and a screen-printed transducer". *Sens. Actuator B-Chem.* **62**(2): 148, 2000.
-