



BIOSSENSORES BASEADOS EM NANOTUBOS DE TITANATO E PEROXIDASE
PARA DETECÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

João Victor Nicolini

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador(es): Helen Conceição Ferraz

Neuman Solange de Resende

Rio de Janeiro

Março de 2013

BIOSSENSORES BASEADOS EM NANOTUBOS DE TITANATO E PEROXIDASE
PARA DETECÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

João Victor Nicolini

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof^a. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

Dr^a. Neuman Solange de Resende, D.Sc.

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof. Giancarlo Richard Salazar Banda, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2013

Nicolini, João Victor

Biossensores baseados em nanotubos de titanato e peroxidase para detecção de peróxido de hidrogênio/
João Victor Nicolini. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2013.

XVII, 159 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Helen Conceição Ferraz

Neuman Solange de Resende.

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ COPPE/Programa de Engenharia Química, 2013.

Referências Bibliográficas: p. 114-137.

1. Biossensor. 2. Peróxido de hidrogênio. 3. Horseradish peroxidase. 4. Nanotubos de titanato. I. Ferraz, Helen Conceição *et al.*. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

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

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais esta conquista, por me guiar e colocar pessoas maravilhosas no meu caminho e a Nossa Senhora por sua intercessão.

Aos meus pais, Alceia e Antônio Carlos, pelo incentivo, pelo apoio, pelos valores que me ensinaram, por acreditarem em mim e não medirem esforços para me auxiliar nos estudos. Vocês são meu exemplo de vida e minha motivação.

As minhas irmãs, Ana Célia e Bianca, pelo incentivo, amizade e também por acreditarem em mim. A minha sobrinha, Vithória, por tornar a vida mais bela. A minha avó, Magnólia, por seu exemplo de fé e suas orações, e por tudo que me ensina. A toda minha família pelo incentivo, força, momentos felizes e pela união. Amo todos vocês.

As minhas orientadoras, Helen e Neuman, pelo exemplo de competência, pela orientação, prontidão na ajuda, incentivo e acima de tudo, a amizade.

Ao Laboratório de Fenômenos Interfaciais (GRIFIT) por todo o suporte para a realização desta dissertação. À Amanda, Diego, Priscila e Luciana pela companhia, conversas e amizade e ao Douglas por todo o auxílio na preparação e caracterização dos nanotubos.

Ao Laboratório de Bioprocessos, pela ajuda na condução de alguns experimentos, principalmente a Mônica, Isis, Carla e Karen. Ao Laboratório PAM, principalmente a Mariana, pela ajuda no MEV. Ao Núcleo de Catálise (NUCAT) por todo o suporte na caracterização dos nanotubos.

Aos meus amigos Ghutiéres, Daiani, Rayane, Cristiane, Danuza, Camilla, Ricardo, Rômulo, Letícia, Elbin. Aos meus amigos do mestrado, Tina, Camila, Fernanda, Anderson, André, Débora, Munyky, Martina, Fred, Karla, Carla, Thainá, Marta, Paula, Tafarel, Daniel, Bruno. Obrigado pelos conselhos, ajuda e companheirismo nos momentos de tristeza e alegria.

Aos queridos professores da graduação, Flávia, Mônica, Marquinhos, Marcão, Robson e Mazza por despertarem em mim o amor pela Engenharia Química.

Aos queridos professores da COPPE, por todo o conhecimento adquirido e excelente formação.

Aos funcionários do Programa de Engenharia Química/PEQ da COPPE.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

BIOSENSORES BASEADOS EM NANOTUBOS DE TITANATO E PEROXIDASE PARA DETECÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

João Victor Nicolini

Março/2013

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Neuman Solange de Resende

Programa: Engenharia Química

O desenvolvimento de métodos de alta sensibilidade e seletividade para determinação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tornou-se importante devido a suas variadas aplicações no campo clínico, monitoramento ambiental, indústrias de alimentos, farmacêutica, química e bioquímica. Este trabalho descreve o desenvolvimento de um biossensor amperométrico nanoestruturado para detecção de H_2O_2 , baseado no uso da enzima *horseradish peroxidase* (HRP) imobilizada em nanotubos de titanato (NTT). Os NTT ($H_xTi_yO_{(2y+1)}$) foram sintetizados pelo método hidrotérmico e caracterizados por técnicas físico-químicas. Foram desenvolvidas diferentes estratégias para imobilização da HRP nos NTT, por adsorção não-específica, ligação covalente por ativação de grupos amino e por ativação de grupos carboxílicos. Os sistemas HRP/NTT foram caracterizados indicando que a imobilização por ativação dos grupos amino foi mais promissora para o estudo dos biossensores. Os resultados de testes de desorção confirmam que as moléculas de HRP mantêm-se ativas por até 160 dias. Na caracterização amperométrica, o biossensor exibiu baixo potencial de redução para o H_2O_2 , em torno de $-0,38\text{ V vs Ag/AgCl}$ em pH 7,0, constante de transferência de elétrons de $3,5\text{ s}^{-1}$ e limite de detecção de $27,24\ \mu\text{mol L}^{-1}$. Em 30 dias de estocagem, o biossensor reteve 91% da sua atividade. Desta forma, pode-se afirmar que a utilização do biossensor baseado na enzima HRP e NTT mostrou-se eficiente para a determinação do H_2O_2 , apresentando uma resposta rápida, sensível e seletiva.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

BIOSENSORS BASED ON TITANATE NANOTUBES AND PEROXIDASE TO HYDROGEN PEROXIDE DETECTION

João Victor Nicolini

March/2013

Advisors: Helen Conceição Ferraz
Neuman Solange de Resende

Department: Chemical Engineering

Hydrogen peroxide (H_2O_2) determination has become important due to a number of applications in clinical, environmental monitoring and food, pharmaceutical, chemistry and biochemistry industries. In this study, a nanostructured amperometric biosensor for H_2O_2 detection was obtained, based on the use of the horseradish peroxidase (HRP) immobilized onto titanate nanotubes (TNT). The TNT ($H_xTi_yO_{(2y+1)}$) were synthesized by the hydrothermal method and characterized by physico-chemical techniques. Different strategies were investigated for HRP immobilization onto TNT, including non-specific adsorption, covalent coupling of amino groups activation and of carboxyl groups activation. Amino groups activation was the most suitable for the biosensors production, since it provided a stable support for the enzyme, keeping its catalytic activity for more than 160 days, as verified through desorption tests. Electrochemical evaluation of the biosensor showed a low reduction potential for H_2O_2 around -0,38 vs. Ag/AgCl at pH 7,0, a direct electron transfer constant of $3,5 s^{-1}$, a wide range of concentration and a low detection limit of $27,24 \mu mol L^{-1}$. The biosensor exhibited a shelf life superior to 30 days, retaining 91% of its activity. All together, these results confirm that the produced biosensor based on the HRP enzyme and TNT was efficient for the determination of H_2O_2 , showing a fast, sensitive and selective response.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
	2.1 Sensores químicos	4
	2.2 Biossensores	6
	2.2.1 Características dos biossensores	8
	2.2.2 Classificação dos biossensores	10
	2.2.3 Biossensores eletroquímicos baseados em enzimas	14
	2.3 Imobilização do elemento biológico	20
	2.3.1 Adsorção não específica	21
	2.3.2 Adsorção por ligação covalente	22
	2.3.3 Oclusão	23
	2.4 Peroxidase	24
	2.5 Uso de nanoestruturas em biossensores	28
	2.5.1 Nanotubos de titanato	31
	2.6 Peróxido de hidrogênio	36
	2.6.1 Métodos para determinação do peróxido de hidrogênio	38
	2.6.2 Detecção eletroquímica do peróxido de hidrogênio	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	44
	3.1 Materiais	44
	3.2 Síntese dos Nanotubos de Titanato (NTT)	45
	3.2.1 Síntese da titânia precursora	45
	3.2.2 Síntese dos NTT	45
	3.3 Caracterização Físico-química dos NTT	46
	3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) com detectores de energia dispersiva de raios X (MEV-EDS)	47
	3.3.2 Fisissorção de N ₂	47
	3.3.3 Difração de raios X (DRX)	47

3.3.4	Fluorescência de raios X (FRX)	47
3.3.5	Espectroscopia Raman.....	48
3.3.6	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	48
3.3.7	Espectrofotometria na região ultravioleta e visível (UV-vis).....	48
3.3.8	Potencial Zeta.....	48
3.4	Caracterização da enzima HRP	49
3.4.1	Dosagem de proteínas.....	49
3.4.2	Determinação da atividade específica da HRP.....	49
3.4.3	Avaliação dos parâmetros cinéticos da HRP	50
3.5	Imobilização da HRP nos NTT	51
3.5.1	Por adsorção não específica	51
3.5.2	Por adsorção química.....	51
3.5.3	Caracterização da interação da HRP com os NTT.	55
3.6	Preparo do biossensor amperométrico.....	57
3.7	Caracterização eletroquímica.....	58
3.7.1	Nanotubos de Titanato.....	59
3.7.2	Biossensor	59
3.8	Avaliação do biossensor na detecção de H ₂ O ₂	60
3.8.1	Estudo da influência do pH do meio	60
3.8.2	Estudo da reprodutibilidade de preparação do biossensor	60
3.8.3	Estudo da repetibilidade da medida do biossensor	60
3.8.4	Estudo da estabilidade.....	60
3.8.5	Curva de calibração	61
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	63
4.1	Caracterização dos NTT.....	63
4.1.1	Caracterização físico - química.....	63
4.1.2	Caracterização eletrocínética.....	66
4.2	Caracterização da enzima HRP	68

4.2.1	Absorção UV-vis	68
4.2.2	Atividade enzimática	68
4.2.3	Velocidade de reação	69
4.2.4	Estabilidade da HRP	71
4.3	Imobilização da HRP nos NTT por adsorção não-específica	71
4.3.1	Isoterma de adsorção da enzima HRP nos NTT	71
4.3.2	Avaliação da imobilização e Atividade residual	75
4.4	Imobilização covalente da HRP nos NTT por ativação dos grupos carboxílicos.....	77
4.4.1	Caracterização dos NTT funcionalizados	77
4.4.2	Avaliação da imobilização e atividade residual.....	80
4.5	Imobilização covalente da HRP nos NTT por ativação dos grupos amino.....	83
4.5.1	Caracterização dos NTT funcionalizados	83
4.5.2	Isoterma de adsorção da enzima HRP em NTT/ATPMS/GLU.	86
4.5.3	Imobilização e atividade residual	89
4.5.4	Avaliação da imobilização por planejamento experimental.....	91
4.6	Avaliação da estabilidade da HRP imobilizada	92
4.7	Avaliação amperométrica do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP..	95
4.7.1	Caracterização eletroquímica dos NTT.....	95
4.7.2	Avaliação amperométrica do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP	96
4.7.3	Propriedades eletrocatalíticas do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP para redução do H ₂ O ₂ .	101
4.7.4	Influência do pH.....	104
4.7.5	Características analíticas.....	105
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	111
5.1	Conclusões.....	111
5.2	Sugestões para trabalhos futuros.....	112
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
	ANEXO A.....	138

ANEXO B.....	142
ANEXO C	143
ANEXO D	144
ANEXO E.....	151
ANEXO F.....	153
ANEXO G	156
ANEXO H	158
ANEXO I.....	159

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Analogia do processamento do sinal em sensores químicos com o organismo vivo (Adaptado de GRUNDLER, 2007).....	5
Figura 2.2 - Biossensor de glicose baseado no eletrodo de oxigênio de Clark (Adaptado de EGGINS, 1997).	6
Figura 2.3 - Elementos de um biossensor.	8
Figura 2.4 - Modelo para a ação enzimática.	17
Figura 2.5 - Tipos de biossensores enzimáticos.....	18
Figura 2.6 - Grupamentos funcionais presentes em enzimas (adaptado de MELO, 2008).	22
Figura 2.7 - Imobilização de enzimas em: (A) superfície com grupos carboxil utilizando o reagente de acoplamento carbodiimina; (B) em superfície com grupos amino utilizando o reagente de acoplamento carbodiimina; (C) superfície com grupos amino utilizando o reagente de acoplamento glutaraldeído (adaptado de SASSOLAS <i>et al.</i> , 2011).	23
Figura 2.8 - Representação tridimensional da estrutura da HRP C. Grupo hemo localizado pela esfera azul (VEICTH, 2004).....	24
Figura 2.9 - Mecanismo geral do ciclo catalítico da HRP na presença do peróxido de hidrogênio (adaptado de NAVES, 2008).	26
Figura 2.10 - Mecanismo de bioeletroredução do peróxido de hidrogênio na forma: (a) mediada e (b) direta.....	27
Figura 2.11 – Mecanismo que ilustra o processo de formação dos NTT, onde (a) é o material de partida (fase anatásio e/ou bruquita), (b) cristal, (c) nanofolha intermediária e (d) nanotubo. Adaptado de WANG <i>et al.</i> (2004).....	33
Figura 3.1 – (a) Reator utilizado na síntese dos NTT e (b) NTT utilizados nos experimentos.	46
Figura 3.2 - Esquema da reação para determinação da atividade específica da HRP.	50
Figura 3.3 – Processo de imobilização covalente por ativação dos grupos carboxílicos, em que é usado (a) EDC e (b) EDC + NHS como agente de acoplamento.....	52

Figura 3.4 - Processo de imobilização covalente por ativação dos grupos amino.	53
Figura 3.5 – Eletrodo de trabalho.....	58
Figura 4.1 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV/FEG) dos NTT sintetizados.....	63
Figura 4.2 – Espectro de energia dispersiva (MEV/EDS) dos NTT sintetizados.....	64
Figura 4.3 – Difratoograma típico dos NTT sintetizados. As setas indicam as possíveis reflexões observadas.....	64
Figura 4.4 - Espectro de absorção por infravermelho dos NTT sintetizados.....	65
Figura 4.5 – Espectros Raman dos NTT preparados.	65
Figura 4.6 – Curva de titulação dos NTT para obtenção do potencial zeta.....	67
Figura 4.7 - Espectro de absorção na região UV-vis da HRP.....	68
Figura 4.8 - Avaliação do pH de maior atividade da HRP.....	69
Figura 4.9 - Velocidade de reação para as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Os pontos são referentes aos dados experimentais obtidos, enquanto que a linha sólida é o ajuste do modelo de Michaelis – Menten.....	70
Figura 4.10 – Atividade específica da HRP em solução 0,1 mol L ⁻¹ PBS (pH 7,0) armazenada em temperatura ambiente (a) e a 4 °C (b).	71
Figura 4.11 - Cinética de adsorção para a imobilização por adsorção não específica.	72
Figura 4.12 - Isoterma de adsorção para HRP imobilizada nos NTT por adsorção não específica. Os pontos são referentes aos dados experimentais obtidos, enquanto que a linha sólida é o ajuste do modelo LF.....	73
Figura 4.13 – Imagem por MEV dos NTT após imobilização da HRP por adsorção não específica.	76
Figura 4.14 - Análise por EDS dos NTT após imobilização da HRP por adsorção não específica.	76
Figura 4.15 - Espectro de absorção no infravermelho dos (a) NTT, (b) NTT/MPA, (c) NTT/MPA/EDC, (d) NTT/MPA/EDC/NHS.....	78
Figura 4.16 - Medidas do potencial zeta dos (a) NTT, (b) NTT/MPA, (c) NTT/MPA/EDC, (d) NTT/MPA/EDC/NHS.....	79

Figura 4.17 - Imagem por MEV da matriz após imobilização da HRP por ativação dos grupos carboxílicos (a) NTT/MPA/EDC e (b) NTT/MPA/EDC/NHS.	80
Figura 4.18 - Análise por EDS da matriz NTT/MPA/EDC após imobilização covalente da HRP por ativação dos grupos carboxílicos.....	81
Figura 4.19 - Análise por EDS da matriz NTT/MPA/EDC/NHS após imobilização covalente da HRP por dos grupos carboxílicos.....	81
Figura 4.20 - Espectros de absorção no infravermelho dos (a) NTT; (b) NTT/ATPMS; (c) NTT/ATPMS/GLU.....	84
Figura 4.21 - Medidas de potencial zeta do (a) NTT, (b) NTT/ATPMS, (c) NTT/ATPMS/GLU.....	86
Figura 4.22 - Imobilização covalente por ativação dos grupos amino com avaliação da (a) % HRP imobilizada e (b) % atividade específica residual.	87
Figura 4.23 – Isoterma de adsorção para HRP imobilizada nos NTT/ATPMS/GLU. Os pontos são referentes aos dados experimentais obtidos, enquanto que a linha sólida é o ajuste do modelo LF.	88
Figura 4.24 - Imagem por MEV da matriz NTT/ATPMS/GLU após imobilização da HRP por ligação covalente por ativação dos grupos amino.....	89
Figura 4.25 - Análise em EDS da matriz NTT/ATPMS/GLU após imobilização da HRP por ligação covalente ativação dos grupos amino.....	89
Figura 4.26 - Atividade residual (%) das moléculas de HRP livre e imobilizada pelas estratégias de imobilização não específica, covalente por ativação dos grupos amino (NTT/ATPMS/GLU/HRP) e ativação dos grupos carboxílicos (NTT/MPA/EDC/HRP e NTT/EDC/NHS/HRP) em função do tempo de armazenamento a 4°C e PBS (pH 7,0).	93
Figura 4.27 - Espectros de absorção no UV-vis do sobrenadante após 5 h de agitação a temperatura ambiente.....	94
Figura 4.28 – Voltamogramas cíclicos para os eletrodos (a) de pasta de carbono (EPC) e (b) de pasta de carbono modificada com 20% de NTT (EPCNTT), em solução 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} e 0,1 mol L ⁻¹ de KCl na velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹	96
Figura 4.29 – Voltamograma cíclicos do (a) eletrodo de pasta de carbono, (b) eletrodo de pasta de carbono modificado com 20% de NTT e (c) biossensor em 0,1 mol L ⁻¹ PBS (pH 7,0), na velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹	97

Figura 4.30 – Voltamograma cíclico da influência da velocidade de varredura utilizando o biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP em 0,1M PBS (pH 7,0).	99
Figura 4.31 - Relação entre o pico catódico e as velocidades de varredura baseados na Equação de Randles-Sevcik.	100
Figura 4.32 – Voltamograma cíclico para o biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP na (a) ausência e (b) presença de 3×10^{-3} M H_2O_2 em 0,1 M PBS (pH 7,0) na velocidade de varredura de 100mV/s.	102
Figura 4.33 – Voltamograma linear do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP em solução 0,1 M PBS (pH 7,0) contendo H_2O_2 na velocidade de varredura de 100 mV/s.	103
Figura 4.34 – Voltamograma cíclico do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP em solução 0,1 M PBS em pH (a) 6,0, (b) 8,0 e (c) 7,0, contendo 3×10^{-5} mol L^{-1} H_2O_2 na velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}	104
Figura 4.35 - Avaliação do melhor pH para o biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP. Correntes de pico das respostas voltamétricas em solução 0,1 mol L^{-1} PBS contendo 3×10^{-5} mol L^{-1} H_2O_2 na velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}	105
Figura 4.36 - Resposta cronoamperométrica do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP com o potencial de -0,38 V vs. Ag/AgCl em solução 0,1 mol L^{-1} de PBS com sucessivas adições de 40 μ L de H_2O_2 . As setas indicam o momento da adição de H_2O_2	106
Figura 4.37 - Curva de calibração do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP. Relação entre corrente e concentração de H_2O_2	107
Figura 4.38 – Voltamograma cíclico da avaliação da estabilidade do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP armazenado a 4°C em solução 0,1 mol L^{-1} PBS (pH 7,0). As medidas foram realizadas em solução 3×10^{-5} mol L^{-1} de H_2O_2 em 0,1M de PBS (pH 7,0).	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Aplicações dos biossensores.....	7
Tabela 2.2 - Comparação das características dos biossensores com os métodos analíticos convencionais (Adaptado de MOZAZ <i>et al.</i> , 2004).....	10
Tabela 2.3 - Elementos biológicos e transdutores utilizados para fabricação de biossensores (Adaptado de CORCUERA e CAVALIERI, 2003).....	11
Tabela 2.4 - Biossensores amperométricos para detecção do peróxido de hidrogênio baseados em heme proteínas e nanomateriais.....	30
Tabela 2.5 – Propriedades cristalográficas de titânias e titanatos lamelares. Adaptado de MORGADO <i>et al.</i> (2007).....	32
Tabela 2.6 - Comparação de desempenho de biossensores amperométricos de peróxido de hidrogênio baseados em HRP e NTT.....	35
Tabela 2.7 – Agentes oxidantes (Adaptado de MATTOS <i>et al.</i> , 2003).....	36
Tabela 2.8 - Relação de reações enzimáticas que produzem ou consomem peróxido de hidrogênio (Adaptado de GIANNOULD <i>et al.</i> , 2006).....	37
Tabela 2.9 - Comparação de desempenho de vários sensores nanoestruturados para detecção do H ₂ O ₂	42
Tabela 3.1 - Relação dos materiais utilizados.....	44
Tabela 3.2 - Plano fatorial experimental.	54
Tabela 3.3 - Plano fatorial normalizado.	55
Tabela 4.1 - Resultados da análise em FRX do NTT preparados.....	66
Tabela 4.2 - Parâmetros cinéticos estimados pelo modelo de Michaelis - Menten	70
Tabela 4.3 - Parâmetros do modelo LF para a isoterma de adsorção.	73
Tabela 4.4 – Posições das bandas e atribuições dos espectros FTIR.....	78
Tabela 4.5 - Posições das bandas e atribuições dos espectros de absorção no infravermelho.....	85
Tabela 4.6 - Parâmetros do modelo LF para a isoterma de adsorção para HRP imobilizada nos NTT/ATPMS/GLU.....	88

Tabela 4.7 – Imobilização e Atividade residual da HRP imobilizada pelas técnicas empregadas.....	91
Tabela 4.8 - Resultados experimentais para o planejamento experimental realizado para a imobilização covalente da HRP na matriz NTT/ATPMS/GLU.....	92
Tabela 4.9 - Valores de potencial formal para a HRP imobilizada em nanomateriais.	97
Tabela 4.10 – Valores da corrente de pico catódico em função da velocidade de varredura.	99
Tabela 4.11 - Valores de taxa de transferência de elétrons para a HRP imobilizada em diferentes materiais.....	101
Tabela 4.12 – Comparação da performance de vários biossensores amperométricos para detecção do peróxido de hidrogênio.	109
Tabela 4.13 - Valores de constantes de Michaelis-Menten aparente para biossensores para detecção do peróxido de hidrogênio baseados em HRP.....	110

1 INTRODUÇÃO

Os biossensores representam uma alternativa interessante aos métodos de detecção tradicionais, por permitir a determinação de componentes químicos e biológicos com rapidez e precisão. Um biossensor pode ser definido como um sensor que combina a alta seletividade de um elemento biológico sensível ao analito de interesse com um transdutor que converte o sinal biológico em sinal elétrico proporcional à concentração do analito (GIANNOUDI *et al.*, 2006). De acordo com o relatório “Analytical Review of World Biosensors Market” (2010), os biossensores representam um avanço no mercado analítico, que deve crescer de 6,7 bilhões dólares em 2009 para 14,4 bilhões de dólares em 2016. Este crescimento está impulsionado principalmente pela sua aplicação na área da saúde, que se destina a exames e diagnósticos médicos, além do monitoramento ambiental (GLOBAL INFORMATION, 2010).

No monitoramento e detecção de substâncias ou contaminantes, a simplificação e uma metodologia analítica que permita um teste rápido, barato e preciso, são elementos fundamentais e foco de atenção de inúmeros trabalhos. De especial interesse é o desenvolvimento de métodos para a determinação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), com grande importância em aplicações farmacêutica, clínica, ambiental, mineração, têxtil e fabricação de alimentos (CHEN *et al.* 2012).

O H_2O_2 é um composto encontrado na natureza e um dos agentes oxidantes mais versáteis existentes. Além disso, desempenha um papel essencial na regulação de diversos processos biológicos e é um produto secundário de algumas reações bioquímicas catalisadas por enzimas, tais como glucose oxidase, lactato oxidase, urato oxidase, colesterol oxidase, dentre outras (CHEN *et al.*, 2012). Em concentrações micromolares, está envolvido no organismo na produção de energia, na regulação do crescimento celular, em danos aos núcleos celulares e no mecanismo de defesa do sistema imunológico (LUO *et al.*, 2009; HUA *et al.*, 2011; LIU e ZWEIER, 2001).

Isto torna evidente que a relação entre a concentração de H_2O_2 e a fisiologia humana tem gerado intensos estudos na sua determinação precisa em baixíssimas concentrações. Além disso, a consciência em relação aos riscos ao meio ambiente e a

necessidade de procedimentos mais seguros de detecção, aliado a novas aplicações, tem aumentado o interesse pela detecção do H_2O_2 nos campos clínicos, ambiental e industrial (ELZANOWSKA *et al.*, 2004).

Muitos métodos têm sido propostos para a determinação do H_2O_2 , que incluem titrimetria, espectrofotometria, quimiluminescência e cromatografia (LI *et al.*, 2007). No entanto, a grande maioria destes métodos necessitam de purificação prévia, instrumentos caros, além de limitações em relação ao pH e à condutividade do meio, e a presença de interferentes que limitam a precisão da análise (GIANNOUDI *et al.*, 2006, CORCUERA e CAVALIERI, 2003). Em contrapartida, as técnicas eletroquímicas oferecem maior sensibilidade, simplicidade, rapidez e baixo custo, uma vez que o H_2O_2 é uma molécula eletroativa (WANG, 2006).

Os estudos eletroquímicos para detecção do H_2O_2 iniciaram-se por sua oxidação ou redução diretamente em eletrodos sólidos. Mas este processo em aplicações analíticas é limitado pela cinética no eletrodo, que é lenta, e pelo alto sobrepotencial, que compromete a sensibilidade na detecção, podendo ter interferências de outras espécies eletroativas em amostras reais. Assim, como forma de melhorar a detecção do H_2O_2 , foram propostas modificações nos eletrodos, a fim de diminuir o sobrepotencial e aumentar a transferência de elétrons. Com este objetivo, vários tipos de materiais são utilizados, tais como metais de transição, óxidos metálicos, porfirinas metálicas, polímeros e enzimas redox (CHEN *et al.*, 2012). Esta modificação dos eletrodos com biomoléculas é uma classe de sensores químicos conhecidos como biossensores.

Os biossensores amperométricos para detecção do H_2O_2 , baseados principalmente nas enzimas peroxidases, têm passado por muitas transformações à procura de maior seletividade e sensibilidade. Assim, as pesquisas têm se destinado à escolha adequada do método de imobilização, pois este deve garantir que a enzima mantenha sua eletroatividade e atividade catalítica, o que garante a estabilidade e tempo de vida do biossensor (SOTOMAYOR e KUBOTA, 2001). E um dos grandes desafios é favorecer a transferência eletrônica direta (TED) entre o centro redox da enzima e o eletrodo. Logo, o desempenho do biossensor depende principalmente das propriedades da camada bioativa associada ao transdutor (KAFI *et al.*, 2008).

Recentemente, avanços na pesquisa interdisciplinar e a evolução contínua nas áreas de engenharia e nanotecnologia têm contribuído para atender a estas

características de melhora de desempenho. Desta forma, os nanomateriais têm atraído grande interesse nas pesquisas pelas suas desejáveis propriedades químicas, físicas e eletrônicas que os tornam diferentes de outros materiais (CHEN *et al.*, 2012). Biossensores baseados em enzimas, como a peroxidase, imobilizada em nanomateriais tem mostrado vantagens distintas para a sensibilidade ao H₂O₂. Dentre os nanomateriais, os nanotubos de titanato demonstram ser promissores para esta aplicação devido à grande área específica, estabilidade térmica e química, propriedades óticas e elétricas, biocompatibilidade, facilidade de obtenção e propriedades de transdução do sinal biológico (LIU *et al.*, 2005).

Assim, o objetivo principal desta pesquisa foi desenvolver um biossensor amperométrico para a detecção do peróxido de hidrogênio baseado no uso da enzima peroxidase de rábano (*horseradish peroxidase*, HRP) e nanotubos de titanato como matriz de imobilização.

Os objetivos específicos foram:

- ✓ Obter nanotubos de titanato para serem utilizados na construção do biossensor;
- ✓ Selecionar o melhor método de imobilização da enzima HRP, com base na atividade e estabilidade da enzima imobilizada;
- ✓ Produzir um biossensor para detecção de peróxido de hidrogênio, caracterizando seu limite de detecção e de quantificação, repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade;
- ✓ Construir uma curva de calibração para o biossensor desenvolvido.

Esta dissertação está dividida em cinco capítulos. Além do presente capítulo, com uma introdução ao assunto e os objetivos, geral e específicos, o capítulo 2, apresenta uma revisão bibliográfica sobre o assunto, mostrando o estado da arte sobre a detecção do H₂O₂, passando por biossensores até o emprego de nanoestruturas, em especial, os nanotubos de titanato. A metodologia empregada é descrita no capítulo 3. O capítulo 4 apresenta os principais resultados obtidos, que comprovam o sucesso na obtenção do biossensor. Por fim, o capítulo 5 apresenta as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sensores químicos

Nos últimos anos, os sensores químicos têm atraído atenção significativa em diversas áreas como no processamento de alimentos, no meio ambiente, na agricultura, em diagnósticos médicos e de defesa (FAM *et al.*, 2011). Desta forma, as atividades de pesquisa estão direcionadas no desenvolvimento de materiais e tecnologias de detecção que atendam a características essenciais, incluindo seletividade, sensibilidade a limites de detecção mais baixos, tempo de resposta o mais curto possível, baixo custo de fabricação, robustez e portabilidade (SINHA *et al.*, 1996).

Os sensores podem ser definidos como dispositivos que recebem e respondem a um sinal ou estímulo, podendo ser encontrados desde em organismos vivos, caracterizando sensores naturais, até os fabricados pelo homem, caracterizando os sensores artificiais. O objetivo do sensor é responder a algum tipo de propriedade física de entrada, um estímulo, e convertê-lo em sinal elétrico compatível com circuitos eletrônicos. Este sinal de saída pode ser na forma de potencial, corrente e carga (FRADEN, 2004). Os Sensores químicos transformam a informação química, desde a concentração de um componente específico à composição total, em um sinal analiticamente útil possuindo como componentes básicos um receptor e um transdutor físico-químico, conforme Figura 2.1 (GRUNDLER, 2007).

Uma analogia ao sistema biológico é usualmente realizada para identificar como é construído um sensor químico, sendo ilustrada na Figura 2.1. No organismo vivo, o órgão sensor recepta o estímulo que é transformado em sinal elétrico. Este sinal é conduzido e amplificado pelas células nervosas (neurônios) na forma de pulsos de potencial. No cérebro, a informação é avaliada e posteriormente executada. Na comparação de como adquirem e processam os sinais, os organismos vivos e sensores artificiais possuem grande semelhança. No último, encontra-se um receptor que responde aos parâmetros ambientais por mudança de algumas de suas propriedades inerentes. Em seguida, esta informação é transformada em sinal elétrico por um transdutor. Nos sensores mais modernos, encontram-se partes que amplificam

o sinal. E por fim, o sinal é processado por um computador, assim como no cérebro do sistema biológico (GRUNDLER, 2007).

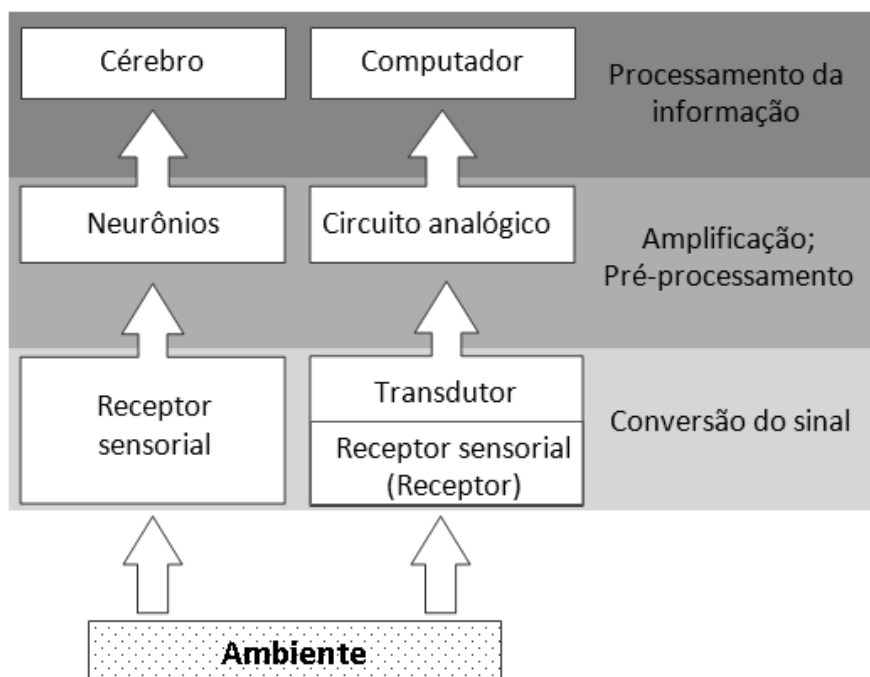


Figura 2.1 – Analogia do processamento do sinal em sensores químicos com o organismo vivo (Adaptado de GRUNDLER, 2007).

Desta forma, os sensores químicos são constituídos de duas partes fundamentais: parte receptora e parte transdutora. Na parte receptora, a informação química é transformada na forma de energia. Já a parte transdutora é capaz de transformar esta forma de energia em um sinal analiticamente útil (HULANICKI *et al.*, 1991). A parte receptora dos sensores químicos pode ser baseada em vários princípios de detecção:

- ✓ Físico, que consiste na medida de, por exemplo, absorbância, temperatura, condutividade, dentre outros;
- ✓ Químico, baseado na reação química com o analito de interesse;
- ✓ Bioquímico, em que um processo bioquímico é a origem do sinal analítico. Sensores com esta característica constituem um subgrupo conhecido com biossensores.

O uso dos sensores tem se expandido enormemente nos últimos anos, e de particular interesse os biossensores.

2.2 Biossensores

O desenvolvimento de meios de isolamento e purificação de proteínas e outros elementos biológicos têm permitido integrar estes elementos aos sistemas de transdução de sensores químicos, possibilitando produzir os biossensores (CORCUERA e CAVALIERI, 2003). Os biossensores representam um avanço em um campo em constante crescimento que combina fundamentos químicos, biológicos, ciências físicas com engenharia e ciências computacionais para satisfazer as necessidades de várias áreas de aplicação (LOWE, 2007).

O termo biossensor foi introduzido por Leland C. Clark Jr. em 1956 com a invenção do eletrodo amperométrico de oxigênio. Clark realizou intensos estudos na detecção de diferentes analitos pela modificação deste eletrodo com enzimas. Assim, em 1962, Clark e Lyons construíram um sensor de glicose em que este eletrodo era envolto por uma membrana de diálise com a enzima glucose oxidase (GOx) imobilizada (NEWMAN e TURNER, 2007; LOWE, 2007). Este biossensor, conforme Figura 2.2, é baseado no fato de que a GOx catalisa a oxidação da glicose em ácido glicônico (EGGINS, 1997). O oxigênio dissolvido na solução entre os eletrodos é reduzido, e a corrente resultante é proporcional à concentração de oxigênio, que é diretamente proporcional à concentração de glicose. Esta medida foi feita num potencial aproximado de $-0,7\text{ V vs. Ag/AgCl}$.

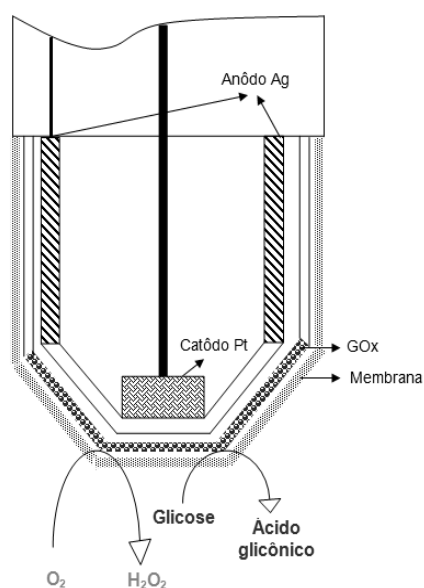


Figura 2.2 - Biossensor de glicose baseado no eletrodo de oxigênio de Clark (Adaptado de EGGINS, 1997).

Mais tarde, Updike e Hicks (LOWE, 2007) adaptaram ao biossensor de Clark e Lyon um segundo eletrodo de O₂ para corrigir variações de oxigênio na amostra.

Assim, o eletrodo de Clark foi um considerável ponto de partida para o estudo destes dispositivos, e desde então, a busca pelo desenvolvimento de novos biossensores para um crescente número de aplicações nas áreas de saúde, meio ambiente e alimentação torna este mercado promissor (NEWMAN e TURNER, 2007; KISSINGER, 2001). Os biossensores representam um campo em rápida expansão, com uma taxa de crescimento anual estimada em 60% (KISSINGER, 2001). Desta forma, intensos estudos têm sido realizados nas mais diferentes áreas, para aplicação dos biossensores, como pode ser observado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Aplicações dos biossensores

Aplicação	Referência
Biomedicina	
Detecção de dopamina	LIU <i>et al.</i> , 2006
Detecção de glicose	LIU <i>et al.</i> , 1997
Drogas oxidáveis	ERDEM <i>et al.</i> , 2000
Detecção de glutamato	KARYAKIN <i>et al.</i> , 2000
Detecção de lactose	LIU <i>et al.</i> , 1997
Detecção de ácido úrico	WANG e HASEBE, 2012
Detecção de oxalato	FIORITO e TORRESI, 2004
Detecção de ácido ascórbico	LIU <i>et al.</i> , 2011
Diagnóstico de hepatite C	ULIANA <i>et al.</i> , 2008b
Farmacêutica	
Detecção de fenol e peróxido de hidrogênio	WANG <i>et al.</i> , 2012a
Detecção de traços de progesterona	GILLIS <i>et al.</i> , 2002
Detecção de traços de paracetamol	VIEIRA <i>et al.</i> , 2003
Monitoramento ambiental	
Detecção de pesticidas na água	NISTOR e EMNÉUS, 1999
Detecção de fungicida em meios aquosos	LIMA <i>et al.</i> , 2007
Detecção de metais pesados em meios aquosos	MALITESTA e GUASCITO, 2005
Qualidade dos alimentos	
Detecção de agentes biológicos e contaminantes	CASTILLO, 2004
Detecção de substâncias químicas	
Detecção de formaldeído	ROMÁN <i>et al.</i> , 2011

Com esta abordagem integrada, os biossensores têm visado satisfazer as exigências para aplicações em amostras reais e começam a tornar-se uma poderosa e versátil ferramenta analítica (CASTILLO, 2004).

2.2.1 Características dos biossensores

Segundo a IUPAC, “o termo biossensor é empregado a dispositivos que são capazes de fornecer uma informação analítica usando um elemento de reconhecimento biológico que está em contato direto com um elemento de transdução” (THEVENOT *et al.*, 2001).

O biossensor é formado basicamente por dois elementos intimamente associados: componente biológico ou bioreceptor e o transdutor, conforme Figura 2.3. O componente biológico tem a finalidade de detectar a substância de interesse (analito) por meio de uma reação bioquímica gerando um sinal, que pode ser uma variação na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, variação de massa, mudança de estado de oxidação, dentre outros. O transdutor converte este sinal em uma resposta quantificável proporcional à concentração do analito, do tipo corrente, potencial, variação de temperatura, dentre outras (SILVA, 2010; LOWE, 2007; CORCUERA e CAVALIERI, 2003).

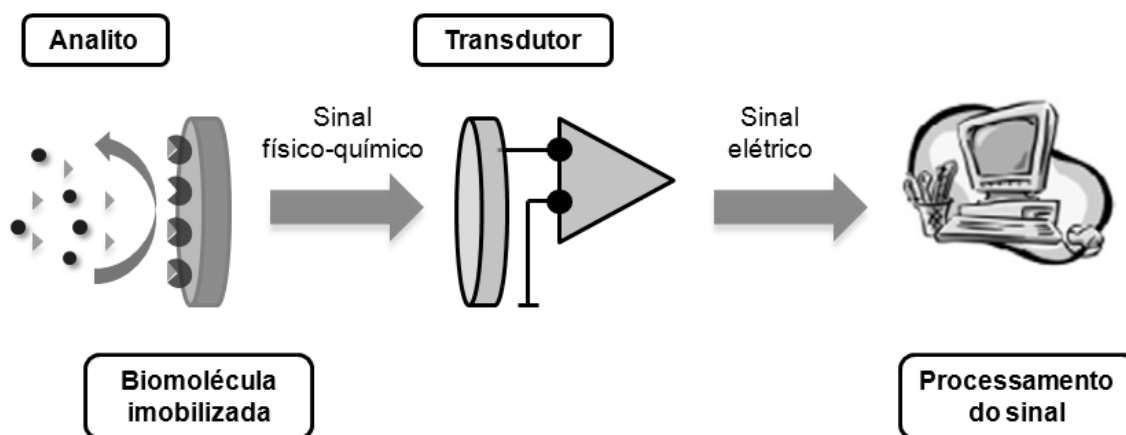


Figura 2.3 - Elementos de um biossensor.

O que diferencia os biossensores dos demais sensores químicos e métodos analíticos convencionais é a especificidade ou seletividade da análise (THEVENOT *et al.*, 2001). Isso se deve ao componente biológico, onde sua interação com o substrato é altamente específica, evitando interferências de outras substâncias, como acontece

em outros métodos analíticos (EGGINS, 1997; CASTILLO, 2004; BRUCKNER-LEA, 2004; LIMA e NUNES, 2006). A seletividade do biossensor é a habilidade para discriminar um entre diferentes substratos (SILVA, 2010).

O uso do biorreconhecimento resulta em respostas rápidas (CASTILLO, 2004) e combina a seletividade das reações bioquímicas com a facilidade e simplicidade operacional (BRUCKNER-LEA, 2004; LIMA e NUNES, 2006; CASTILLO, 2004). Isto possibilita a resposta à presença de apenas algumas moléculas e resulta em determinações do analito de interesse em baixos limites de detecção (FRADEN, 2003; PADDLE, 1996; BRUCKNER-LEA, 2004). A sensibilidade é influenciada pelo transdutor (CASTILLO, 2004).

A necessidade de produtos químicos e reagentes pode ser drasticamente reduzida quando são empregados biossensores. Isso faz destes uma alternativa promissora, de baixo custo de operação e manutenção (BRUCKNER-LEA, 2004). Outra característica é a portabilidade dos biossensores, com possibilidade de determinar os analitos diretamente em amostras complexas, não necessitando de longos e custosos pré-tratamentos. Isso se deve em especial à tendência de miniaturização, principalmente na área biomédica, pois as amostras biológicas estão disponíveis em pequenas quantidades, e danos ao tecido devem ser minimizados em caso de monitoramento "in vivo" (CASTILLO, 2004). A seguir, na Tabela 2.2 é apresentada uma comparação das características dos biossensores em relação aos métodos analíticos convencionais.

Tabela 2.2 - Comparação das características dos biossensores com os métodos analíticos convencionais (Adaptado de MOZAZ *et al.* ,2004).

	Vantagens	Desvantagens
Biossensores	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Preparação mínima de amostras; ✓ Análise direta; ✓ Facilidade de utilização; ✓ Portabilidade; ✓ Uso de pequena quantidade da amostra; ✓ Baixo custo; ✓ Resultados rápidos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Baixa estabilidade do material biológico; ✓ Determinação de um único analito; ✓ Pouca disponibilidade comercial.
Métodos analíticos convencionais	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Estabilidade biológica sem restrição; ✓ Determinação de analitos variados; ✓ Disponibilidade comercial. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Preparo e concentração prévia da amostra; ✓ Necessidade de pessoal capacitado; ✓ Metodologia laboratorial; ✓ Uso de grande quantidade de amostra; ✓ Alto custo; ✓ Maior tempo de análise.

2.2.2 Classificação dos biossensores

Nos biossensores, diferentes elementos biológicos podem ser combinados com vários tipos de transdutores. Um resumo de elementos biológicos e transdutores usados na fabricação de biossensores são apresentados na Tabela 2.3.

A maneira como o transdutor enxerga o sinal, depende de como a imobilização do elemento de biorreconhecimento é feita, para que ele continue ativo por certo período em determinadas condições ambientais, como pH e temperatura. Logo, são de grande importância a escolha adequada do elemento de biorreconhecimento, do método de imobilização e do método de transdução.

Tabela 2.3 - Elementos biológicos e transdutores utilizados para fabricação de biossensores (Adaptado de CORCUERA e CAVALIERI, 2003).

Elementos biológicos	Transdutores
Enzimas	Eletroquímicos
Antibióticos	Amperométrico
Receptores	Potenciométrico
Células	Íon seletivo
Membranas	Transistor de efeito de campo (FET)
Tecidos	Condutimétrico
Organismos	Óptico
Organellas	Fibra óptica
Ácidos Nucléicos	Ressonância de superfície de plasma (SPR)
Moléculas orgânicas	Fibra óptica SPR
	Calorimétrico
	Condução de calor
	Isotérmico
	Acústico
	Onda acústica de superfície
	Microbalança piezocristal

2.2.2.1 Elemento biológico

Os elementos de reconhecimento biológico podem ser agrupados de acordo o tipo de interação com o analito alvo. É esta interação que assegura a seletividade dos biossensores (CASTILLO, 2004).

- ✓ Biocatalisadores: enzimas, microorganismos e tecidos. Este grupo catalisa reações bioquímicas, atuando na redução ou no aumento da energia de ativação de uma reação química;
- ✓ Bioligantes ou bioafinidade: anticorpos, ácidos nucleicos e lectinas. Estas moléculas têm sua atividade associada a algum tipo de interação com uma biomacromolécula.

Na escolha do elemento de biorreconhecimento, algumas observações devem ser feitas acerca deste, como a disponibilidade de sítios reativos para reagir ou interagir com o analito ou substrato, a estabilidade no meio em que a detecção será realizada, além das condições de medição e possibilidade de modificação/imobilização nos transdutores ou suportes sem afetar o seu desempenho (SALGADO, 2001)

Uma das características essenciais para um biossensor é a sua habilidade em discriminar um entre diferentes substratos. Desta forma, as enzimas foram e continuam sendo o elemento de reconhecimento biológico mais empregado na construção de biossensores, formando o biossensor enzimático, que serão mais detalhados na Seção 2.2.3. Em seguida, os anticorpos apresentam-se em grande utilização, se ligando especificamente e fortemente com o antígeno específico, mas sem efeito catalítico. Os ácidos nucleicos são utilizados com menor frequência, pela dificuldade de isolamento, mas operam seletivamente devidos às características dos pares de bases nitrogenadas. Menos utilizados, os receptores são proteínas encontradas na membrana plasmática de bicamadas lipídicas e possuem propriedades específicas de reconhecimento (GALLI, 2011).

2.2.2.2. Elemento transdutor

Na escolha do transdutor deve-se verificar sua adequação para adaptação do material biológico, sendo capaz de detectar qualquer variação que ocorra durante a reação biológica. De acordo com o tipo de transdutor utilizado, o biossensor é classificado como piezoelétrico/gravimétrico, eletroquímico, impedantiométrico, óptico e térmico (LOWE, 2007).

O biossensor óptico é baseado na medição de luz absorvida ou emitida como consequência de uma reação bioquímica. As ondas de luz são guiadas por meio de fibras ópticas para detectores apropriados. Estes biossensores apresentam o inconveniente por não serem aplicáveis em meios turvos. O biossensor térmico ou biossensor calorimétrico detecta um analito em função do calor desenvolvido devido à reação bioquímica do analito com a enzima adequada. Biossensores térmicos não podem ser usados em sistemas com mudança de calor pequena, e não são fáceis de manusear. Os biossensores piezoelétricos operam com o princípio de geração de dipolos elétricos ao submeter um cristal natural anisotrópico ao estresse mecânico. A absorção do analito aumenta a massa do cristal e altera a sua frequência básica de oscilação (CHAUBEY e MALHOTRA, 2001).

Os biossensores baseados em transdutores eletroquímicos são os mais empregados, pois apresentam resposta rápida, possuem a vantagem de serem econômicos e a possibilidade de automação permitindo sua aplicação em um grande número de amostras (MELO 2008; PEREZ, 2000).

Durante o processo de bio-interação, espécies eletroquímicas, como elétrons são consumidos ou gerados produzindo um sinal eletroquímico que pode por sua vez, pode ser medido por um detector eletroquímico. Biossensores eletroquímicos tem como principais vantagens a simplicidade de operação, a possibilidade de uso em meios turvos, além disso, são passíveis de miniaturização e se adaptam às necessidades para detecção em tempo real. Dependendo da propriedade eletroquímica a ser medida pelo sistema detector, os biossensores eletroquímicos podem ser divididos em amperométricos, condutimétricos ou potenciométricos (ARYA *et al.*, 2007).

a) Biossensor amperométrico. A amperometria se baseia na medição da corrente resultante de uma reação redox de espécies eletroativas. É realizada através da manutenção de um potencial constante baseado em um eletrodo de trabalho em relação a um eletrodo de referência. A corrente resultante é diretamente correlacionada com a concentração em massa do analito (THEVENOT *et al.*, 2001).

O biossensor amperométrico é mais rápido, mais sensível, não precisa esperar que o equilíbrio termodinâmico seja obtido e apresenta baixo custo devido à simplicidade dos dispositivos e instrumentos. Além disso, mostra uma resposta linear em uma faixa relativamente ampla de concentração do analito (CHAUBEY e MALHOTA, 2002).

Como são operados pela difusão do analito na superfície do eletrodo, os biossensores amperométricos exibem alguns inconvenientes como a utilização de potenciais um pouco elevados que podem oxidar espécies diferentes; além disso, a corrente pode ser afetada pela velocidade com que ocorre a difusão do analito na superfície do eletrodo. Para contornar esses inconvenientes, têm surgido muitos estudos relativos à utilização de nanoestruturas como forma de aumentar a eletroatividade entre os componentes do biossensor amperométrico, que serão discutidos na Seção 2.5. Outra maneira mais usual é a utilização de membranas limitantes de difusão que evitam a saturação do elemento biológico, mais aplicado no caso de enzimas. Além disso, a literatura apresenta o estudos no emprego de mediadores (PEREZ, 2000).

b) Biossensor condutimétrico. O transdutor condutimétrico mede a variação da condutividade do eletrólito em uma célula eletroquímica (FRADEN, 2003). Desta forma, utilizam-se principalmente enzimas que produzem ou consomem espécies

iônicas, em suas reações bioquímicas, alterando a condutividade global da solução. Por esses sinais serem de magnitude pouco estável, e de depender fortemente da temperatura, poucos biossensores condutimétricos tem sido desenvolvidos (MELO, 2008).

c) Biossensor potenciométrico. A medição potenciométrica baseia-se na determinação da diferença de potencial entre um eletrodo indicador e um eletrodo de referência, ou dois eletrodos de referência separados por uma membrana seletiva, quando não há corrente significativa fluindo entre eles (FRADEN, 2003). Os biossensores potenciométricos baseados em íons-seletivos (ISE) desenvolvem um potencial no eletrodo de trabalho por acumulação de carga aumentando a densidade de carga na superfície do eletrólito. Assim, em biossensores baseados em enzimas, por exemplo, espécies químicas ou íons são produzidas ou consumidas pelas enzimas durante a reação catalítica. Conseqüentemente, uma diferença de potencial é criada entre o eletrodo de referência e o eletrodo de íon-seletivo ou de trabalho, sendo transformada em um sinal mensurável (ARYA *et al.*,2007).

Desta forma, a escolha adequada do transdutor, também constitui uma etapa chave no desenvolvimento do biossensores, pois está em íntimo contato com o elemento biológico (KAOUTIT *et al.*,2007).

2.2.3 Biossensores eletroquímicos baseados em enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos com alta massa molar formadas por longas cadeias de aminoácidos, constituindo, portanto, um tipo de proteína natural. Elas aceleram as reações químicas promovendo o alcance do equilíbrio sem alterá-las, através da diminuição da energia de ativação. Esta habilidade catalítica das enzimas é devido à sua estrutura protéica. As enzimas possuem o sítio ativo, que corresponde a uma pequena porção de sua superfície. O sítio ativo contém um grupo prostético, que freqüentemente é constituído de um ou mais átomos de metal. Desta forma o sítio ativo é o responsável por catalisar reações químicas específicas (DUTTA, 2008, EGGINS, 1996, LEHNINGER, 2006).

Um aspecto muito importante em enzimas é sua atividade catalítica ou atividade enzimática. Uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que converte 1 μ mol de substrato (S) em produto (P) em 1 minuto, sob condições específicas de

temperatura e pH. A atividade específica é o número de unidade em 1 mg de proteína (CASS, 2007).

O mecanismo de ação de diversas enzimas tem sido estudado. Dentre eles, o mais comum é o de Michaelis e Menten, que envolve um único substrato se transformando em um único produto. Inicialmente, admite-se que a enzima e o substrato reagem reversivelmente, formando um complexo enzima-substrato, que por sua vez, ou se decompõe ou reage com outra substância, liberando a enzima livre, conforme Equação 2.1 (BISSWANGER, 2002):



onde E é a enzima, $E.S$ é o complexo enzima-substrato, P é o produto, k é a constante de velocidade.

A variação dos reagentes em função do tempo é expressa pelas equações diferenciais dadas pelas Equações 2.2 a 2.5 (BISSWANGER, 2002).

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A][E] + k_{-1}[EA] \quad \text{Equação 2.2}$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[A][E] + (k_{-1} + k_2)[EA] \quad \text{Equação 2.3}$$

$$\frac{d[EA]}{dt} = k_1[A][E] - (k_{-1} + k_2)[EA] \quad \text{Equação 2.4}$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[EA] = \nu \quad \text{Equação 2.5}$$

onde ν é definido como a taxa de aumento do produto que é diretamente proporcional a concentração do complexo $[EA]$ de acordo com a Equação 2.5. A equação da velocidade pode ser obtida considerando condições de equilíbrio, onde são considerados (1) E , S , ES alcançam o equilíbrio muito rapidamente em comparação com a velocidade com a qual ES se transforma em $E+P$, sendo a etapa lenta, (2) a velocidade instantânea em qualquer tempo

depende da concentração de ES, sendo $v = k_2 [EA]$, onde k_2 é a constante de velocidade catalítica. Pela conservação de massa, a enzima total está distribuída entre E e ES : $[E]_t = [E] + [ES]$.

Considerando a equação de velocidade dividida por $[E]_t$, obtemos:

$$\frac{v}{[E]_t} = \frac{k_2}{[E] + [ES]} [ES] \quad \text{Equação 2.6}$$

No equilíbrio, o complexo enzima-substrato pode ser expresso em termos de $[S]$, $[E]$ e K_m , onde K_m é a constante de dissociação do complexo ES , conforme Equação 2.7:

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad \therefore [ES] = \frac{[S][E]}{K_m} \quad \text{Equação 2.7}$$

Substituindo a Equação 2.7 em 2.6, e considerando a Equação 2.5, tem-se:

$$\frac{v}{k_p [E]_t} = \frac{\frac{[S]}{K_m}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad \text{Equação 2.8}$$

Sabendo que $k_p [E]_t = V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima que será observada quando toda a enzima estiver presente sob a forma de ES , chega-se à Equação de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação 2.9}$$

Em 1984, Emil Fisher propôs o tipo de interação que ocorre entre a enzima e seu substrato, com o propósito de explicar a ação enzimática (VIEIRA, 2006). Este modelo estabelece que o sítio ativo da enzima e o substrato possuem formas geométricas semelhantes, onde o substrato se encaixa perfeitamente ao sítio ativo da enzima. A Figura 2.4 ilustra o processo.

A classe de enzimas óxido-redutases é muito utilizada para a construção de biossensores amperométricos, pois elas catalisam uma reação química redox, envolvendo uma etapa de transferência de elétrons no ciclo natural da enzima. Os três grupos de óxido-redutases mais usadas são as oxidases, desidrogenases e peroxidases. As peroxidases catalisam a conversão de compostos orgânicos e inorgânicos na presença de peróxido de hidrogênio ou peróxidos orgânicos de cadeia pequena (EGGINS, 1996; CORCUERA e CAVALIERI, 2003; PADDLE, 1996).

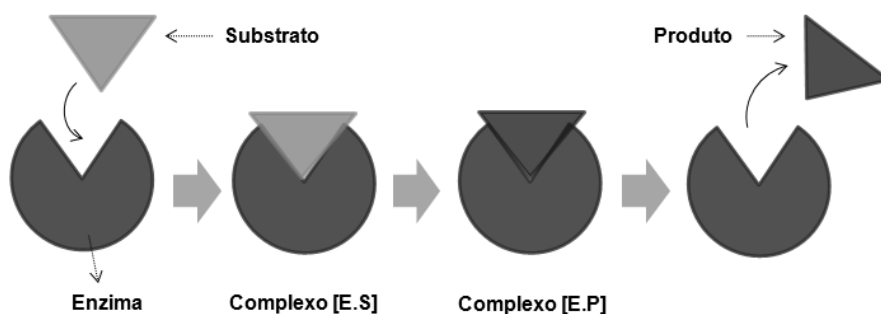


Figura 2.4 - Modelo para a ação enzimática.

Dentre as vantagens do uso de enzimas em biossensores, incluem-se a sua natureza biorrenovável, a capacidade de modificar as propriedades catalíticas ou especificidade do substrato por meio da engenharia genética, e amplificação catalítica da resposta do biossensor pela modulação da atividade da enzima em relação ao analito alvo (ROGERS, 2006).

Na aplicação de biossensores enzimáticos, devem-se verificar alguns fatores que afetam a estabilidade das enzimas, no que diz respeito à variação das condições físico-químicas do meio reacional. Esta desvantagem pode ser contornada usando as condições adequadas de pH e temperatura, além da escolha adequada do método de imobilização em transdutores e, mais recentemente em estruturas biocompatíveis, que garantam a manutenção da atividade enzimática (MELO, 2008).

2.2.3.1 Classificação dos biossensores enzimáticos

Para biossensores enzimáticos, o acoplamento eletrônico entre o material biológico e o eletrodo nos biossensores pode ser realizado por meio de diferentes

mecanismos de transferência de elétrons, baseados nos quais são classificados como primeira, segunda e terceira geração (CHAUBEY e MALHOTRA, 2001).

Nos biossensores de primeira geração, conforme Figura 2.5, o acoplamento eletrônico entre a enzima e o eletrodo é baseado na eletroatividade do substrato da enzima ou no produto gerado da reação enzimática (GALLI, 2011). O sinal amperométrico é produzido pela oxidação ou redução do substrato, monitorando o consumo de O_2 ou a produção de H_2O_2 . A seletividade do elemento de biorreconhecimento é comprometida pela alta voltagem aplicada, oxidando outras espécies presentes no meio. Além disso, a concentração de O_2 deve ser controlada, pois é o fator limitante da medida (CASTILLO *et al.*, 2004).

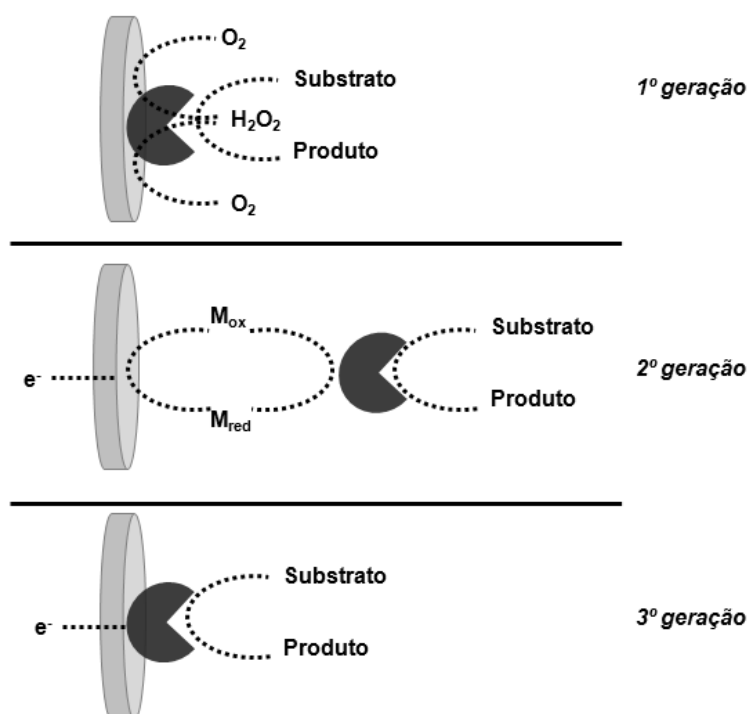


Figura 2.5 - Tipos de biossensores enzimáticos

Nos biossensores de segunda geração, conforme Figura 2.5, a eletroatividade é medida pelo auxílio de mediadores livres em solução ou imobilizado juntamente com a enzima (GORTON *et al.*, 1999). O mediador atua como um composto intermediário que transpõe os equivalentes redox entre o elemento de reconhecimento e transdutor (CASTILLO *et al.*, 2006). Ele minimiza o caminho para detecção, pois em alguns casos, o centro redox de enzimas está localizado no interior da enzima, tornando a relação direta de troca de elétrons com o eletrodo inviável (GIANNOUDI *et al.*, 2006).

Sendo assim, o mediador diminui o potencial de detecção, de modo a reduzir a interferência causada por outros compostos que possam se oxidar diretamente sobre o eletrodo (GALLI *et al.*, 2011).

Os mediadores mais comumente utilizados em biossensores são inorgânicos ou derivados organometálicos de ferro (II) (ferrocenos), complexos de ósmio (II), rutênio (II), azul de metileno, benzoquinona, e N-metil fenazina. Ferrocenos foram os primeiros metais de transição contendo mediador já relatado (CHAUBEY e MALHOTRA, 2001).

É necessário que o mediador seja regenerado para que a enzima desempenhe o papel de um biocatalisador. Uma vez que os mediadores devem ser móveis, eles geralmente são solúveis em meio eletrolítico, e, portanto podem ser perdidos durante as medições repetidas. Isto, em combinação com a inativação da enzima, devido à sua desnaturação leva à perda de sensibilidade do biossensor com o tempo. Desta forma, o mediador deve ser estável nas condições de trabalho, tanto na sua forma oxidada como na sua forma reduzida, e não deve participar de reações secundárias durante a transferência de elétrons. O mediador deve ser escolhido de tal forma que ele tenha um menor potencial redox do que outro interferente eletroquimicamente ativo na amostra (GIANNOUDI *et al.*, 2003).

Nos biossensores de terceira geração, conforme Figura 2.5, a transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo (transdutor) e o centro ativo da enzima é realizado de forma direta, evitando etapas intermediárias. Para que a transferência direta seja possível, a distância entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo deve ser a menor possível, ou seja, quando há uma monocamada da enzima sobre o eletrodo, estando em íntimo contato com ele. Mas esta configuração tende a desnaturar as enzimas, diminuindo a eficiência e tempo de vida do biossensor. Uma das alternativas para evitar este problema é a modificação da superfície em que a enzima será adsorvida, em ambientes biocompatíveis, imobilizando preferencialmente com o centro ativo da enzima orientado para a solução (GALLI, 2011), acessível ao substrato, conforme será detalhado na seção 2.4. A escolha adequada do método de imobilização do elemento biológico deve levar em conta essa característica, garantindo a funcionalidade do biossensor.

2.3 Imobilização do elemento biológico

Na tecnologia de biossensores, a imobilização do elemento biológico aparece como um dos fatores chave para o desenvolvimento de dispositivos eficientes com desempenho apropriado, estabilidade em estocagem, alta sensibilidade, alta seletividade, tempo de resposta curto e alta reprodutibilidade (SASSOLAS *et al.*, 2011; SOTOMAYOR e KUBOTA, 2001).

A imobilização de biomoléculas, principalmente enzimas, em materiais é de interesse não somente na confecção de biossensores, mas também em áreas da indústria de alimentos, farmacêutica, células artificiais e em reações em células livres (TALBERT e GODDARD, 2012).

A principal característica do método de imobilização é que o mesmo deve garantir que a biomolécula continue ativa e disponível para o analito (SASSOLAS *et al.*, 2011). Desta forma, a eficiência do biossensor será garantida se a biomolécula for imobilizada por um mecanismo que garanta a orientação da biomolécula, não interferindo em sua estrutura e conformação (ANSARI, 2012; KIM *et al.*, 2006). No caso de enzimas, o sítio ativo deve estar disponível, devendo ser observada a sua orientação e acessibilidade e que assegure a manutenção de sua atividade biológica (NORDE *et al.*, 2008).

A imobilização não só permite a proximidade necessária entre o biomaterial e o transdutor, mas também ajuda a estabilizar o conjunto para reutilização. Alguns suportes são utilizados como matriz de imobilização, como polímeros condutores, nano-materiais, sol-gel e hidro-gel, membranas, fibras, vidro e grafite (ARYA *et al.*, 2008).

O método de imobilização afeta a atividade e estabilidade dos biossensores enzimáticos (SASSOLAS *et al.*, 2011). Desta forma, tem surgido grande interesse no entendimento dos fatores que afetam a atividade, assim como estratégias de imobilização de biomoléculas (TALBERT e GODDARD, 2012). Dentre elas, as biomoléculas têm sido imobilizadas principalmente pelas técnicas de adsorção não covalente ou não específica, adsorção covalente e oclusão (SASSOLAS *et al.*, 2011).

2.3.1 Adsorção não específica

Esta técnica envolve a adsorção do elemento biológico em suportes insolúveis, através de fenômenos de adsorção baseados em ligações mais fracas, tais como as forças de Van der Waals, forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. Para atingir a imobilização, a biomolécula em solução é posta em contato com o suporte sólido por determinado tempo (SASSOLAS *et al.*, 2011; CLAEISSON *et al.*, 1995; OSTUNI *et al.*, 2009).

O processo de adsorção de proteínas tem sido investigado na literatura (NORDE, 2008; SANDWICK e SCHRAY, 1987; NORDE, 1986). A adsorção de enzimas é afetada pelas propriedades da superfície sólida e propriedades da biomolécula como superfície química heterogênea, mudança da flexibilidade e conformação (RISIO e YAN, 2009). Especialmente para enzimas, grandes interações entre o suporte e a biomolécula podem resultar em inativação (GREEN *et al.*, 1999; SANDWICK e SCHRAY, 1987). A adsorção não específica de biomoléculas é o método mais simples de preparação de biossensores, embora a união seja muito fraca, resultando na perda de material e tempo de vida muito curto, pois as biomoléculas podem ser facilmente dessorvidas para a solução por fatores como variação de pH do meio, variação de força iônica, solvente e temperatura. Outra desvantagem é a adsorção não específica de outras proteínas ou substâncias (SASSOLAS *et al.*, 2011).

Recentemente a literatura tem reportado estudos sobre a interação da enzima peroxidase (HRP) com superfícies sólidas, pois é de interesse na área de biossensores amperométricos que estas interações sejam estáveis. RISIO e YAN (2009) imobilizaram HRP em superfície de fibras de celulose por adsorção não específica. Eles concluíram que o suporte com um grau mais elevado de cristalinidade tende a adsorver mais. Em outro estudo com adsorção de HRP em diferentes substratos, RISIO e YAN (2010), verificaram que a adsorção de HRP aumenta quanto mais hidrofóbico for o material, mas este excesso de hidrofobicidade produz inativação da enzima. Também puderam avaliar que as interações eletrostáticas afetam em menor grau a adsorção da HRP. SILVA *et al.* (2007) estudaram o comportamento da adsorção da HRP sobre partículas híbridas de poli(metilmatacrilato) (PMMA) e carboximetilcelulose (CMC). Os autores observaram que as moléculas de HRP adsorveram reversivelmente nas partículas de PMMA/CMC. As partículas

apresentaram uma camada altamente hidratada, que favoreceu a estabilidade da HRP adsorvida, mas reduziu sua atividade em cerca de 20% em relação ao observado para a HRP livre em solução.

2.3.2 Adsorção por ligação covalente

A imobilização de biomoléculas por ligação covalente consiste em ligações de grupos não ativos das biomoléculas, ou seja, não essenciais para sua atividade catalítica (no caso de enzimas), e grupos reativos (grupos funcionais ou espaçadores), como hidroxila, carboxila, amino, tiol, glutaraldeído, carbodiimina, ligados na superfície sólida do suporte insolúvel (THEVENOT *et al.*, 2001). Os suportes podem ser materiais inorgânicos, naturais ou polímeros sintéticos (SASSOLAS *et al.*, 2011).

A Figura 2.6 apresenta os principais grupamentos funcionais presentes em enzimas e que podem ser utilizados para ligar covalentemente a grupos reativos

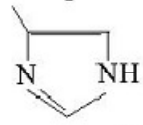
$-\text{NH}_2$	T-amino de L-lisina e grupamento amino N-terminal
$-\text{SH}$	Tiol de L-cisteína
$-\text{COOH}$	Carboxila de L-asparato e L-glutamato e grupamento carboxílico C-terminal
$-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$	Grupamento fenólico de L-tirosina
$-\text{S}-\text{S}-$	Pontes dissulfídicas de L-cisteína
$\text{CH}_3-\text{S}-$	Tioeter de L-metionina
$-\text{CH}_2\text{OH}$	Hidroxila de L-serina e L-treonina
	Imidazol de L-histidina
$-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$	Guanidino de L-arginina

Figura 2.6 - Grupamentos funcionais presentes em enzimas (adaptado de MELO, 2008).

Este tipo de ligação é geralmente atingido pela ativação inicial da superfície usando reagentes multifuncionais, como por exemplo, glutaraldeído ou carbodiiminas, como pode ser observado na Figura 2.7. Em seguida é realizado o acoplamento da enzima ao suporte ativado e remoção do excesso e biomoléculas não ligadas (SASSOLAS *et al.*, 2011).

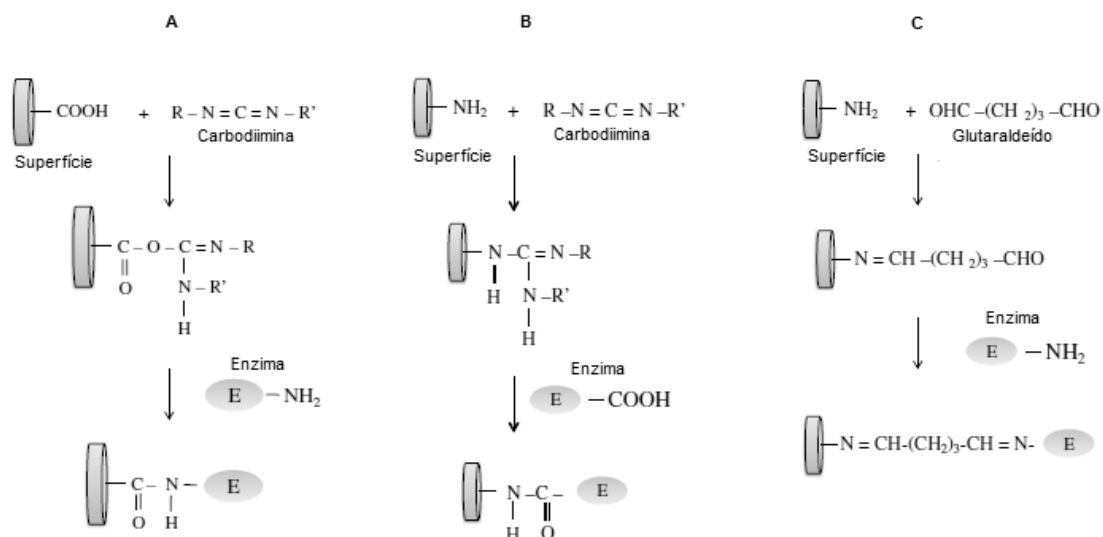


Figura 2.7 - Imobilização de enzimas em: (A) superfície com grupos carboxil utilizando o reagente de acoplamento carbodiimina; (B) em superfície com grupos amino utilizando o reagente de acoplamento carbodiimina; (C) superfície com grupos amino utilizando o reagente de acoplamento glutaraldeído (adaptado de SASSOLAS *et al.*, 2011).

Com este tipo de ligação, tem-se biossensores com elevado tempo de vida, pois há um aumento da estabilidade da enzima e não se produz perda da biomolécula durante a sua utilização (GALLI, 2011).

2.3.3 Oclusão

Esta técnica consiste em imobilizar as biomoléculas em matrizes tridimensionais como uma matriz polimérica ou membranas semipermeáveis. As matrizes mais comumente utilizadas são as gelatinas, poliacrilamina, colágeno, triacetato e celulose, alginato, poliuretano, agar, poliacrilamina, álcool polivinílico, dentre outros. Desta forma, uma ampla variedade de matérias pode ser avaliada e consegue-se com este processo a imobilização de altas concentrações de biomoléculas (GALLI, 2011). Usualmente, o elemento biológico não sofre grandes alterações, de modo que a atividade biológica é preservada durante o processo. No entanto, existem problemas quanto a limitações difusionais causadas por impedimentos à interação do substrato com a biomolécula, como tamanho de poro reduzido ou grupos volumosos (GALLI, 2011; SASSOLAS *et al.*, 2011).

2.4 Peroxidase

A peroxidase (HRP – horseradish peroxidase) é uma glicoproteína que contém Fe(III) protoporfirina IX (heme) como grupo prostético localizado em sua cadeia polipeptídica (SILVA *et al.*,2007), conforme Figura 2.8. Ela é obtida a partir da raiz forte que contém vários tipos de isoenzimas, sendo a isoenzima C a mais abundante delas. Essas enzimas apresentam massa molecular entre 40 kDa e 45 kDa, com cadeia polipeptídica que corresponde a 33890 g/mol e a porção de carboidratos constituindo de 18 a 22% do total (VEITCH, 2004).



Figura 2.8 - Representação tridimensional da estrutura da HRP C. Grupo heme localizado pela esfera azul (VEITCH, 2004).

Sua estrutura é composta de dois domínios similares, consistindo num ambiente hidrofóbico onde o grupo heme se localiza. Cada domínio contém um íon de cálcio. Este íon garante a estabilidade da HRP, além de controlar também a atividade enzimática. Em um dos domínios, um resíduo histidina (His170) ocupa a 5ª posição de coordenação do átomo de ferro, enquanto que o outro domínio, denominado domínio distal, contém uma histidina não coordenada (His42) (VEITCH, 2004).

As peroxidases pertencem ao grupo de oxireductases que catalisam a redução de peróxidos, como o peróxido de hidrogênio e oxidam uma variedade de componentes orgânicos e inorgânicos (MOHAMED *et al.*, 2011). Estudos na literatura reportam a caracterização das peroxidases nas suas múltiplas formas (isoenzimas) (CHIBBAR e

HUYSTEE, 1984). A HRP possui ponto isoelétrico (PI) de 7,2 (XIALING e LIN, 2009) e pH ótimo entre 5,0 e 6,5 (CHATTOPADHYAY e MAZUMDAR, 2000; MOHAMED *et al.*, 2011). Temperaturas acima de 50°C afetam sua estabilidade com perdas significativas de sua atividade enzimática (MOHAMED *et al.*, 2011). Além disso, este grupo de peroxidases exibe absorção em 402 nm, referente ao grupo heme presente no seu sítio ativo, conhecida como banda de Soret (TRIPLETT e MELLON, 1992).

Peroxidases encontram emprego na síntese de químicos aromáticos, remoção de peróxido de alimentos e água industrial (HAMID e REHMAN, 2009), tratamento de água contendo componentes fenólicos (LINDGREN *et al.*, 1997), oxidação de corantes sintéticos (KIM *et al.*, 2005). Além disso, as peroxidases são amplamente utilizadas na fabricação de biossensores enzimáticos. As hemo-proteínas, que incluem, além da HRP catalase, citocromo c, hemoglobina, microperoxidase e mioglobina tem grande potencial de aplicação bioeletroquímica, principalmente no desenvolvimento de biossensores, devido à sua capacidade redox (WANG, 2005).

Biossensores baseados em peroxidase têm sido amplamente empregados na determinação do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos (JIA *et al.*, 2002). A HRP também pode ser co-imobilizada com a glicose oxidase para determinação de drogas oxidáveis (ERDEM *et al.*, 2000) e glicose (LIU *et al.*, 1997). Além disso, encontram-se estudos de sua co-imobilização com uricase para determinação de ácido úrico (WANG e HASEBE, 2012) e co-imobilização com outras enzimas que produzem peróxido de hidrogênio para determinação de alcoóis e glutamato (RUZGAS, *et al.*, 1996).

Diversos estudos propõem o mecanismo de catálise da HRP (ADEDIRAN e LAMBEIR, 1989; CARVALHO *et al.*, 2006; COTTON e DUNFORD; 1972, MALARCZYK, 2008; NICELL e WRIGHT, 1997). Este modelo pode ser representado pelo mecanismo de Change-George (DEYHIMI e NAMI, 2012), conforme Figura 2.9, que envolve a oxidação do grupo prostético hemo da peroxidase pelo peróxido de hidrogênio, e este é reduzido pela enzima. Nesta etapa, um oxigênio do H₂O₂ deixa a molécula em forma de água, enquanto que o outro fica retido no grupo heme da enzima. Este grupo contém Fe³⁺ que é oxidado formando o composto I, um composto intermediário. Numa segunda etapa, o composto I sofre uma redução pela transferência de um elétron do doador AH, formando o composto intermediário, composto II, cujo estado de oxidação é Fe⁴⁺. Finalmente, um elétron adicional proveniente de uma segunda molécula AH, pode ser transferido e a enzima retorna ao

seu estado fundamental. Na ausência de doadores fortes de elétrons, os compostos intermediários (composto I e composto II) podem receber um elétron de moléculas do substrato (RUZGAS *et al.*, 1996).

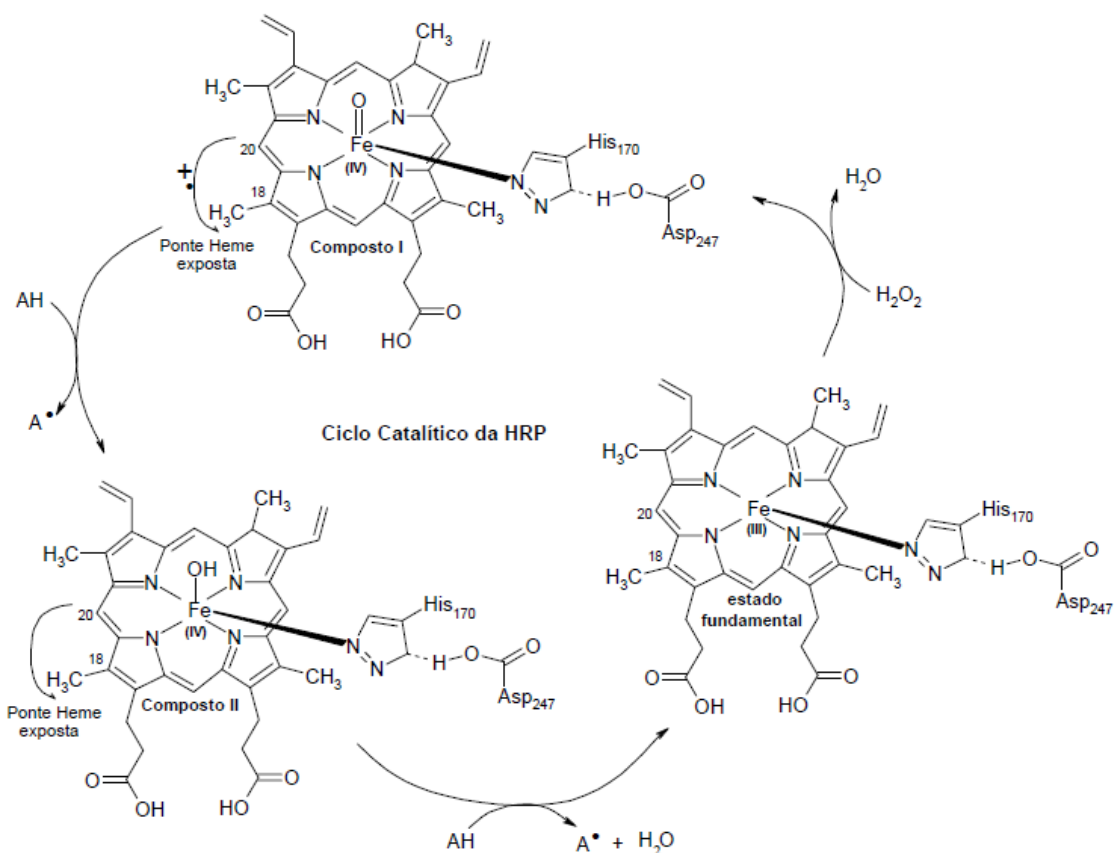


Figura 2.9 - Mecanismo geral do ciclo catalítico da HRP na presença do peróxido de hidrogênio (adaptado de NAVES, 2008).

A redução do composto II geralmente é a etapa determinante da velocidade da reação. O excesso de H₂O₂ pode inibir o ciclo catalítico, fazendo com que o composto II passe para a forma de composto III, que por perda de oxigênio pode chegar à forma de composto IV, e reagindo com H₂O₂ retorna à forma de composto II. Esta seqüência pode levar a uma forma inativa irreversível da enzima, ocasionando perda total da atividade (VEITCH, 2004).

Quando a enzima peroxidase está imobilizada na superfície de um eletrodo, no caso de biossensores, os intermediários oxidados da enzima, composto I e composto II, podem ser reduzidos de volta ao seu estado fundamental por duas formas: uma transferência eletrônica direta ou mediada (ULIANA *et al.*, 2008a), conforme Figura 2.10. Na transferência de elétrons direta, as formas oxidadas da enzima são reduzidas

por elétrons doados do próprio eletrodo, enquanto que na transferência mediada, a enzima recebe elétrons de substâncias doadoras.

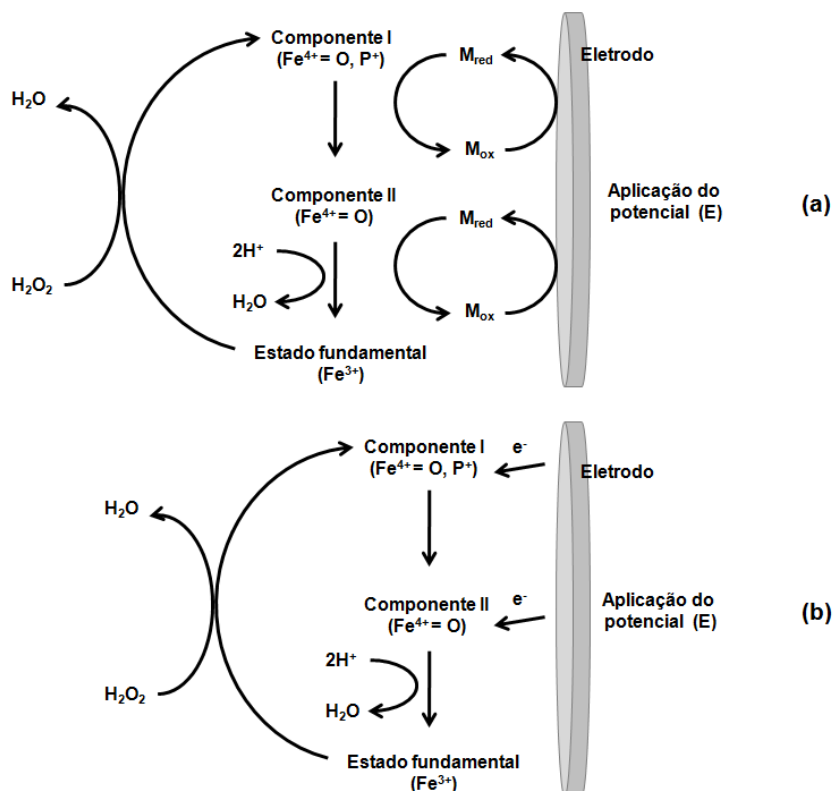


Figura 2.10 - Mecanismo de bioeletroredução do peróxido de hidrogênio na forma: (a) mediada e (b) direta.

Vários tipos de eletrodos tem sido utilizados para demonstrar a transferência eletrônica direta entre a HRP adsorvida em eletrodos, entre eles, pasta de carbono (RUZGAS *et al.*, 1995), íon seletivo (DEYHIMI e NAMI, 2011), grafite (FERRI *et al.*, 1998) e carbono vítreo (CHATTOPADHYAY e MAZUMDAR, 2000). No entanto, em geral, esse processo é lento (ULIANA *et al.*, 2008a). Desta forma surgiram estudos demonstrando a utilização de eletrodos modificados, entre eles, ouro modificado (RAN *et al.*, 2011; YI *et al.*, 2000), carbono vítreo modificado com grafeno (LI *et al.*, 2011) e carbono vítreo modificado com carbono ativado (SUN *et al.*, 2004).

A transferência eletrônica direta da HRP para redução do H_2O_2 foi demonstrada em eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de índio (ITO). A eletroatividade foi avaliada e os resultados indicaram uma transferência de elétrons lenta entre a HRP e o eletrodo. Os resultados sugerem que o potencial de redução da HRP e velocidade de transferência de elétrons parecem depender da natureza do eletrodo, além do método de imobilização da enzima (CHATTOPADHYAY e MAZUMDAR, 2000b). Com

eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno, a transferência direta de elétrons foi mais rápida, mostrando que a modificação de eletrodos pode ser uma ótima alternativa melhorar a atividade bioeletrocatalítica em eletrodos modificados com HRP (LI *et al.*, 2011).

2.5 Uso de nanoestruturas em biossensores

Durantes anos os biossensores amperométricos baseados em enzimas tem passado por muitas transformações a procura de uma maior seletividade e eficiência na transferência de elétrons. Assim, muitas as pesquisas têm como foco a velocidade de transferência de elétrons do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo. Os biossensores de primeira geração apresentavam problemas de interferentes devidos à necessidade de potenciais muito altos. Com o intuito de diminuir estes potenciais, surgiram os biossensores de segunda geração, como visto na Seção 2.2.3.1, empregando mediadores. No entanto, esta configuração, muitas vezes, apresenta problemas de interferentes, podendo facilitar a transferência de elétrons proveniente de reações redox paralelas à reação entre a enzima e o substrato (SOTOMAYOR E KUBOTA, 2002). Para superar estes problemas, estudos apontam um desafio importante no desenvolvimento de biossensores amperométricos enzimáticos, que é estabelecer uma comunicação elétrica direta entre o centro redox da enzima e o eletrodo, sendo esta caracterizada como a terceira geração de biossensores (WANG, 2005). Desta forma, foi proposta uma nova configuração de biossensores amperométricos nanoestruturados, em que a enzima é imobilizada em materiais nanoestruturados. Menores limites de detecção podem ser conseguidos por melhorar a estabilidade da enzima, além de operar em um potencial mais próximo do potencial redox da enzima, dando assim, uma menor exposição a reações com interferentes (LAURENT *et al.*, 2008; WANG, 2005).

Materiais nanomateriais, como nanopartículas (CAO *et al.*, 2008), nanofibras e nanotubos (XIAO *et al.*, 2011) podem servir com um excelente material suporte para imobilização de enzimas, pois oferecem características ideais para manter a estabilidade da enzima, mantendo-a ativa, além de aumentar o desempenho dos dispositivos de detecção. Dentre estas características, citam-se a alta área específica, baixa resistência à transferência de massa, biocompatibilidade, propriedades elétricas, mecânicas e térmicas (SASSOLAS *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2006).

As nanoestruturas elevam a reatividade eletroquímica das biomoléculas e promovem aumento na transferência direta de elétrons entre o centro redox de proteínas e a superfície do eletrodo (WANG, 2005). Ressalta-se, também, que as nanoestruturas são fundamentais para a função e integração de alta densidade em dispositivos nanoescala. Conseqüentemente, eles são o foco de intensas pesquisas em sensoriamento, optoeletrônica e outras aplicações devidas às suas propriedades únicas. Por causa de sua alta relação superfície-volume e facilidade no transporte de elétrons, suas propriedades elétricas são fortemente influenciadas por perturbações mínimas no sistema. Esta propriedade fornece aos biossensores rapidez na detecção eletrônica direta, além de sensibilidade na detecção (WANEKAYA *et al.*, 2007; WANG, 2005).

Desta forma, com as vantagens atraentes, nanomateriais tem sido integrados com hemo proteínas para construir biossensores de peróxido de hidrogênio baseados na transferência direta de elétrons. A Tabela 2.4 mostra parte deste biossensores e suas características.

MAO *et al.* (2012) desenvolveram um biossensor baseado na HRP imobilizada em nanocompósitos de prata e carbono e partículas de ouro, para detecção do H₂O₂. O filme de Ag/C/Au foi formado no eletrodo de carbono vítreo e a HRP foi imobilizada covalentemente. O biossensor apresentou alta sensibilidade, apresentando potencial de redução para o H₂O₂ em -0,4 V vs. Ag/AgCl. Apresentou um range linear de detecção de $6,7 \times 10^{-9}$ a $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e baixo limite de detecção de $2,2 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. O biossensor foi estocado a 4°C em tampão PBS (pH 7,0), retendo 92% do valor inicial da corrente de redução após um mês.

MATHEW e SANDHYARANI (2011) conseguiram um biossensor com excelente sensibilidade ao peróxido de hidrogênio. O biossensor é baseado em cistina ligada a polimetileno (CBU) formando um compósito com nanopartículas de Au (NpAu). Monocamadas de ácido mercaptopropiônico (MPA) foram formadas sobre o eletrodo de ouro e ligadas aos compósitos CBU-Au. Finalmente, a HRP foi ligada covalentemente, formando assim, o eletrodo de trabalho. O biossensor apresentou excelente atividade eletrocatalítica em potencial de -0,3 V vs. Ag/AgCl, range linear de 400 a 900 mmol L⁻¹ e limite de detecção de 4,5 μmol L⁻¹. A HRP ligada manteve-se estável pelo período de um mês estocada a 4°C em tampão fosfato, retendo 80% da atividade inicial. Outras substâncias (Glicose, BSA e ácido ascórbico) não mostraram interferência no sinal.

Tabela 2.4 - Biossensores amperométricos para detecção do peróxido de hidrogênio baseados em heme proteínas e nanomateriais.

Hemo proteína	Nanomateriais	Imobilização	Potencial (V vs. Ag/AgCl)	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Estabilidade	Referência
HRP	NTC	Covalente	-0,35	-	10000	-	LEE <i>et al.</i> , 2006
	NTC	Covalente	-0,394	1 a 10	$2,1 \times 10^{-7}$	-	WANG <i>et al.</i> , 2012a
	NpAu	Adsorção não específica	-0,444	0 a 300	0,21	40 dias (90% da resposta)	LIU e JU, 2002
	NpAu e NTT	Adsorção não específica	-0,4	5 a 1000	2,1	15 dias (95%)	LIU <i>et al.</i> , 2012
	NpAu	Oclusão em matriz de quitosana	-0,4	10 a 11300	0,65	30 dias (95%)	TANGKUARAM <i>et al.</i> , 2007
	NpAu e Nanofibras de polianilina	Adsorção não específica	-0,194	10 a 2000	1,6	15 dias (95%)	CHEN <i>et al.</i> , 2011b
Hb	NpAu	Adsorção não específica	-0,26	1 a 4700	0,5	21 dias (84%)	LIU e HU, 2008
	NpPt	Adsorção não específica	-0,564	5 a 1000	0,6	50 dias (98%)	WEI <i>et al.</i> , 2011
Cat	NTC	-	-0,25	1000 a 10000	1	-	SALIMI <i>et al.</i> , 2005
	NpAu	Covalente	0,256	3000 a 60000	0,05	15 dias (95%)	HUANG <i>et al.</i> , 2011

Hb – Hemoglobina; Cat – Catalase; NTC – Nanotubos de carbono; NpAu – Nanopartículas de ouro; NpPt – Nanopartículas de prata.

LEI *et al.* (2003) desenvolveram um biossensor amperométrico em que imobilizaram a HRP em nanopartículas de Au (NpAu), posteriormente inseridas em eletrodo de pasta de carbono (EPC) modificado com quitosana. A alta afinidade da quitosana com o EPC associado às NpAu favoreceu à retenção da atividade da HRP. O biossensor apresentou um range linear para detecção do H₂O₂ de $1,22 \times 10^{-5}$ a $2,43 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e limite de detecção de 6,3 µmol L⁻¹. O tempo de vida e reprodutibilidade da resposta foram considerados satisfatórios pelos autores.

Dentre as nanoestruturas, os nanotubos são adequados para a modificação de vários eletrodos devidos à sua alta condutividade eletrônica em reações de transferência de elétrons em soluções aquosas e não-aquosas (LIU *et al.*, 2011).

CAO *et al.* (2008) desenvolveram um biossensor para detecção de H₂O₂ através da imobilização da HRP em nanotubos de carbono. A HRP foi imobilizada covalentemente utilizando o glutaraldeído como reagente de acoplamento. Como resultado do desempenho eletroquímico, os biossensores apresentaram um range linear de 0,005 a 1,05 mmol L⁻¹ e limite de detecção de 0,5 µmol L⁻¹ para detecção amperométrica para o H₂O₂. O biossensor foi armazenado em tampão PBS (pH 7,0) e apresentou retenção de 95% de sua resposta inicial após 15 dias.

2.5.1 Nanotubos de titanato

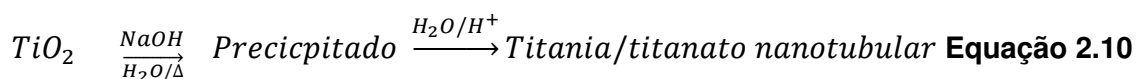
A titânia (TiO₂) é um dos compostos mais comuns do titânio e com significativa atenção dada suas características ópticas, elétricas, eletroquímicas e de catalíticas. Alto índice de refração torna seu emprego possível como pigmento branco na fabricação de tintas, polímeros e cosméticos, dentre outros. É um semicondutor com energia de *bandgap* em torno de 3,2 eV, e elevada fotosensibilidade na região do ultravioleta, o que torna seu emprego adequado em processos de fotocatalise. Também pode ser empregada em eletrodos em células solares, material anti-corrosivo, biomaterial, sensores, dentre outras aplicações (ALVES, 2009). O TiO₂ possui três fases mais comuns: anatásio (tetragonal), rutilo (tetragonal) e bruquita (ortorrômbica). As estruturas diferem entre si pelos padrões de construções das unidades octaédricas, onde a conexão de maneiras variadas dão origem a diferentes polimorfos de TiO₂ e distintas formas de titanatos lamelares (MORGADO, 2007). Esta estrutura lamelar facilita a troca iônica nos titanatos, podendo-se reduzir as distâncias interlamelares e formar estruturas para diferentes finalidades (ALVES, 2009).

Os nanotubos de titanato (NTT) possuem a estrutura do cristal com diferentes estequiometrias, mas a maioria dos autores concorda que os NTT, na forma protonada, tem uma estrutura monocíclica de trititanato de hidrogênio e podem ser identificados pela fórmula geral $H_xTi_yO_{(2y+1)}$. A Tabela 2.5 apresenta as principais estruturas de titânias e titanatos.

Tabela 2.5 – Propriedades cristalográficas de titânias e titanatos lamelares. Adaptado de MORGADO *et al.* (2007).

Fase	Simetria
Rutilo	Tetragonal
Anatásio	Tetragonal
Bruquita	Ortorrômbica
TiO ₂ (B)	Monocíclica
H ₂ Ti ₃ O ₇	Monocíclica
H ₂ Ti ₄ O ₈ .H ₂ O	Monocíclica
H ₂ Ti ₆ O ₁₁ .3H ₂ O	Monocíclica

Nanoestruturas de TiO₂ e de titanatos podem ser sintetizadas por vários métodos, tais como o método sol-gel, deposição eletroquímica, deposição química de vapor, deposição física de vapor, síntese por combustão, anodização e tratamento alcalino hidrotérmico (BAVYKIN *et al.*, 2006). Em todos os tipos de síntese, as condições experimentais são importantes na definição do produto final (ALVES, 2009). Uma alternativa bastante atrativa surgiu com a primeira síntese direta de nanotubos de titânia sem o uso de moldes ou *templates*. Esta síntese foi proposta em 1998 por KASUGA *et al.* (1999), que consiste no tratamento do TiO₂ amorfo com uma solução concentrada de NaOH, seguido de lavagem com água e ácido diluído (Equação 2.10):



Desde então, tem sido demonstrado que todos os polimorfos TiO₂ (anatásio, rutilo e bruquita) podem ser transformados em nanotubos ou nanofibras de TiO₂ ou titanato sob condições hidrotérmicas alcalinas (CESAR *et al.*, 2011, BAVYKIN *et al.*, 2006). O mecanismo de formação dos NTT ainda não foi totalmente elucidado. Acredita-se que a combinação de alta pressão e temperatura potencializam o caráter

corrosivo dos íons OH^- em solução, dissolvendo o TiO_2 que posteriormente é convertido em nanoestruturas, por formação de pequenas camadas em forma de folhas que se desprendem dos grãos de TiO_2 e depois se enrolam formando tubos, ou, formação dos tubos diretamente a partir de íons de TiO_3^+ em solução (ALVES, 2009). O esquema é apresentado na Figura 2.11.

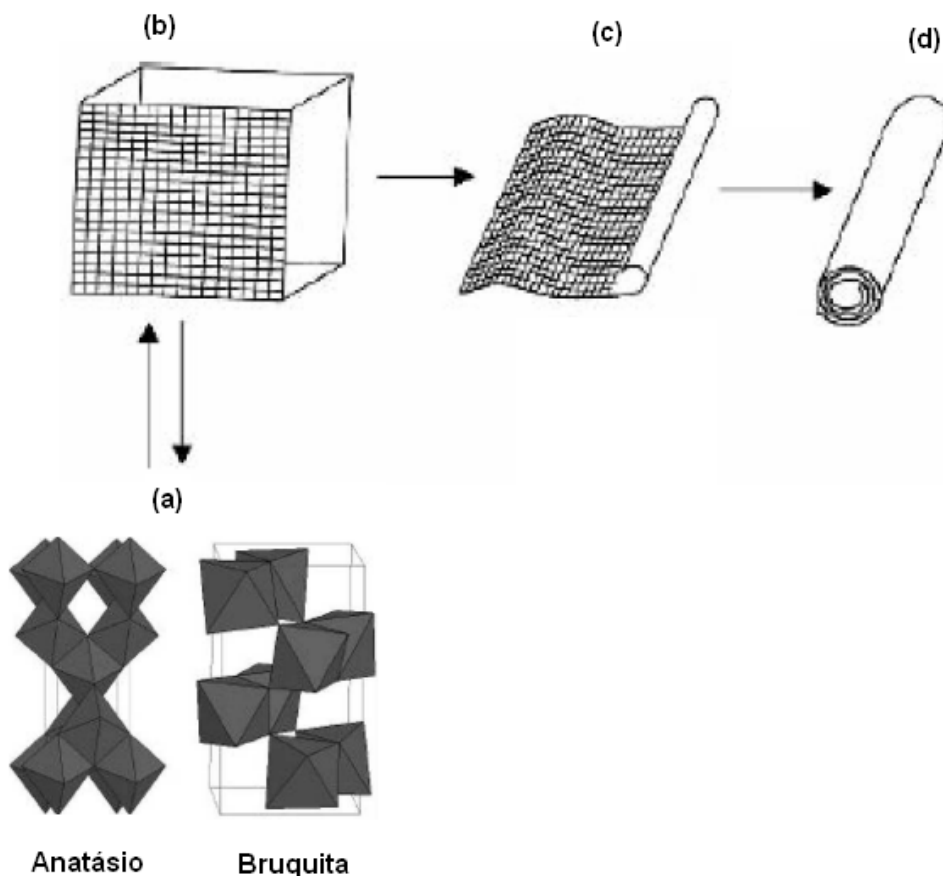


Figura 2.11 – Mecanismo que ilustra o processo de formação dos NTT, onde (a) é o material de partida (fase anatásio e/ou bruquita), (b) cristal, (c) nanofolha intermediária e (d) nanotubo (adaptado de WANG *et al.*, 2004).

Quanto à morfologia, os nanotubos de titanato são abertos em ambas as extremidades, com um diâmetro externo de 5 a 15 nm e comprimento de até centenas de nanômetros. Também é observado um diâmetro interno de 2 a 7 nm. Quanto à sua área específica, vários autores reportam que há um aumento considerável da área específica, com incrementos de até 500% em relação à área da titânia de partida (MORGADO *et al.*, 2007). MORGADO *et al.* (2007) relatam que as variáveis da reação

tem grande importância sobre estas propriedades, como por exemplo, a temperatura de tratamento hidrotérmico.

Quanto às suas propriedades ópticas, estudos em soluções aquosas coloidais de NTT, à temperatura ambiente, revelam uma energia de *bandgap* estimada em 3,87 eV. Este valor é próximo aos apresentados por folhas de titanato e superior ao da titânia. Isto mostra sua potencialidade em aplicações em fotocatalise. A existência de prótons instáveis nos NTT sugerem que este material deva ter a condutividade bem próxima a destes prótons. Estudos em espectroscopia de impedância demonstraram que a condutividade dos NTT depende da temperatura, representando um valor mais alto que de nanopartículas de anatásio e rutilo (BAVYKIN *et al.*, 2006). Dadas estas propriedades, ao longo dos anos, as nanoestruturas de titânia e titanato foram extensivamente estudadas devidas as suas potenciais aplicações em células solares (OHSAKI *et al.*, 2005), fotocatalise (HODOS *et al.*, 2004), sensores de hidrogênio (HAN *et al.*, 2007) e baterias de lítio (KAVAN *et al.*, 2004).

Os nanotubos de titanato têm despertado também especial interesse devido as suas características, como alta área específica e alto volume de poros, estabilidade térmica e química, biocompatibilidade e facilidade de fabricação, o que os tornam superiores aos nanotubos de carbono (KAFI *et al.*, 2008; XIAO *et al.*, 2007). A literatura também reporta o emprego dos nanotubos de titanato como adsorventes para remoção Pb(II) e Cd(II) (XIONG *et al.*, 2011), Pb (II) (CHEN *et al.*, 2010), corantes ácidos e básicos (LEE *et al.*, 2007), Cu (II) (LIU *et al.*, 2009), arsênico (NIU *et al.*, 2009) de soluções aquosas através do mecanismo de permutação de íons.

Em função de propriedades como moderada condutividade elétrica, a alta área específica e capacidade de permutação de íons, os nanotubos de titanato têm sido estudados em aplicações eletroquímicas (BAVYKIN *et al.*, 2006). Em suspensão aquosa, ocorre dissociação dos grupos superficiais dos nanotubos de titanato, resultando em um potencial zeta negativo, em torno de -43 mV em pH 8,0 (TOKUDOME e MIYAUCHI, 2005). Desta forma, a modificação do potencial zeta das nanoestruturas em solução aquosa permite a fabricação de eletrodos por deposição de camadas. Estudos têm demonstrado que a modificação de eletrodos com nanoestruturas de titanato pode aumentar o transporte direto de elétrons em reações de superfície no eletrodo (TOKUDOME e MIYAUCHI, 2005; LIU *et al.*, 2007), podendo ser empregado na confecção de biossensores, melhorando o seu desempenho. Nestes casos, os NTT desempenham um papel de condutor e suporte inerte. Logo,

para o sucesso da aplicação destas nanoestruturas em eletroquímica, o estudo da interação de biomoléculas com os nanotubos de titanato é necessário. A utilização de NTT demonstrou algumas vantagens na imobilização da enzima mioglobina (Mb) e melhoria da taxa de transferência de elétrons (LIU *et al.*, 2005). LIU *et al.* (2005) verificaram que grupos hidroxil presentes na superfície dos NTT, a carga da superfície e a morfologia tubular dos NTT desempenham papel importante para a ligação da proteína.

Desta forma, metodologias como essa permitem a aplicação dos nanotubos de titanato a biossensores, devido à melhora na transferência eletrônica direta para as proteínas imobilizadas (LIU *et al.*, 2005). A Tabela 2.6 apresenta o desempenho de biossensores baseados em NTT e nanotubos de titânio empregando a enzima HRP (NTTiO₂).

Tabela 2.6 - Comparação de desempenho de biossensores amperométricos de peróxido de hidrogênio baseados em HRP e NTT.

Biossensor	E (V) vs. Ag/AgCl	Faixa linear (μmol L ⁻¹)	LD (μmol L ⁻¹)	Estabilidade	Referência
NpAu/NTT	-0,4	5 a 1000	2,1	15 dias (95%)	LIU <i>et al.</i> , 2012
Ti/NTTiO ₂)	-0,6	5 a 400	2	21 dias (95%)	KAFI <i>et al.</i> , 2008
NTTiO ₂	-0,122	0,5 a 1000	0,1	45 dias (90%)	WU <i>et al.</i> , 2008

Recentemente a literatura tem proposto a confecção de biossensores para detecção do peróxido de hidrogênio baseados nanotubos de titanato. LIU *et al.* (2012), propuseram um biossensor baseado na troca de elétrons direta da HRP imobilizada em NTT recobertos com NpAu, envoltos por um líquido iônico. Observaram uma excelente sensibilidade do biossensor em presença do H₂O₂, com aplicação de um potencial de redução de -0,4 V vs. Ag/AgCl, além de baixo limite de detecção, 2,1 μmol L⁻¹. Esse biossensor mostrou-se estável e reprodutível, com grande faixa linear de detecção, permitindo inferir que os nanotubos de titanato representam uma excelente alternativa como suporte para a imobilização da HRP e na fabricação de biossensores.

2.6 Peróxido de hidrogênio

A capacidade de detectar substâncias de maneira específica e com elevada sensibilidade em concentrações cada vez menores, representa um grande avanço nas áreas médica, ambiental, dentre outras. Existe uma grande necessidade no desenvolvimento de métodos cada vez mais eficientes, confiáveis e baratos para detecção de grande variedade de compostos. Dentre estas substâncias, e de interesse em diversas áreas, destaca-se o peróxido de hidrogênio.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um líquido transparente com odor característico, não inflamável e miscível com água em todas as proporções. Destaca-se pela utilização em larga escala industrial como agente oxidante, pois está entre os oxidantes mais poderosos, conforme Tabela 2.7 (MATTOS *et al.*, 2003).

Tabela 2.7 – Agentes oxidantes (Adaptado de MATTOS *et al.*, 2003)

Agente oxidante	Potencial padrão (V vs. Ag/AgCl)
Flúor	3,0
Radical hidroxila	2,8
Ozônio	2,1
Peróxido de hidrogênio	1,77
Permanganato de potássio	1,7
Dióxido de cloro	1,5
Cloro	1,4

O peróxido de hidrogênio pode ser convertido em radical hidroxila ($OH\cdot$), com reatividade inferior apenas para o flúor, conforme apresentado na Tabela 2.7. Estas características possibilitam o emprego do peróxido de hidrogênio em diversos processos industriais (LI *et al.*, 2007).

Em aplicações ambientais, tem sido utilizado no tratamento de águas, esgotos e efluentes industriais (FREIRE *et al.*, 2000). Também é aplicado no tratamento de solos, na oxidação química de contaminantes (MATTOS *et al.*, 2002), e na redução da demanda química e bioquímica de oxigênio (LARISCH e DUFF, 1997). O peróxido de hidrogênio tem sido empregado também na oxidação de sulfetos e, conseqüente,

controles de odores (GUWY *et al.*, 2000), e na oxidação de componentes inorgânicos como cianetos, NO_x/SO_x, nitritos, hidrazinas, dentre outros (MATTOS *et al.*, 2003).

Dentre as aplicações do peróxido de hidrogênio mais comuns na área industrial estão os processos de branqueamento na indústria de papel e celulose (RABELO *et al.*, 2009), o de descoloração na indústria têxtil (GUWY *et al.*, 2000), a oxidação de componentes orgânicos (LIN e GUROL, 1996); e a oxidação de pesticidas (BADELLINO *et al.*, 2006). Além disso, pode ser empregado no controle de corrosão (GUWY *et al.*, 2000) e em bioprocessos, como na desinfecção e na inibição no crescimento de bactérias (MATTOS *et al.*, 2003).

O peróxido de hidrogênio está presente em inúmeras reações biológicas, sendo um dos mais importantes produtos ou substratos de reações de oxidação catalisadas por enzimas. Na classe de enzimas oxidases, é produto de suas reações catalíticas, conforme Equação 2.11 (FORZANI *et al.*, 1995.).



Existe uma variedade de reações enzimáticas que tem o H₂O₂ como produto, conforme Tabela 2.8.

Tabela 2.8 - Relação de reações enzimáticas que produzem ou consomem peróxido de hidrogênio (Adaptado de GIANNOULD *et al.*, 2006).

Enzima	Produção/Consumo de H ₂ O ₂
Glicose oxidase	Produção
Uricase	
Tirosinato	
Glicolato oxidase	
Ácido L-amino oxidase	
Hemoglobina	
Albumina do soro bovino	Consumo
Peroxidase de nabo	
Catalase	
NADPH oxidase	

Mesmo em concentrações micromolares, o peróxido de hidrogênio pode danificar o DNA, RNA, as proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial, podendo levar ao estresse oxidativo (HUA *et al.*, 2011, BARREIROS *et al.*, 2006). Estudos apontam sua relação como causa ou fator de agravamento de várias patologias, tais como choque hemorrágico, artrite, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS (BARREIROS *et al.*, 2006). Adicionalmente, sua presença pode causar disfunções no sistema imunológico.

Desta forma, a relação entre concentração de peróxido de hidrogênio e fisiologia humana tem atraído intensos estudos e a determinação precisa e sensível do H₂O₂ vem se tornando uma prática importante nos campos clínicos, ambiental e industrial (HUA *et al.*, 2011).

2.6.1 Métodos para determinação do peróxido de hidrogênio

O aumento da necessidade pela detecção do peróxido de hidrogênio começou a ser observado somente a partir da década de 90, quando a consciência em relação aos riscos ao meio ambiente se tornou mais evidente, assim como a necessidade de procedimentos mais confiáveis de detecção aliada às novas aplicações do H₂O₂ (ELZANOWSKA *et al.*, 2004). Desta forma, várias técnicas têm sido propostas para detecção do peróxido de hidrogênio, como quimiluminescência, fluorimetria, espectrofotometria, titrimetria, emissão acústica, cromatografia e métodos eletroquímicos (LI *et al.*, 2007, KAFI *et al.*, 2008, MATTOS *et al.*, 2003).

A detecção do peróxido de hidrogênio por quimiluminescência começou a ser desenvolvida em meados dos anos 80, e consistia na imobilização da catalase em fibra ótica, requerendo como meio para a amostra excesso de luminol. Quando mergulhado em solução de peróxido de hidrogênio, a luz produzida atravessava a fibra ótica para um tubo fotomultiplicador (FREEMAN e SELTZ, 1978). Outros sistemas de detecção do H₂O₂ baseados na quimiluminescência são encontrados na literatura, como o estudado por QIN *et al.* (1998), em que o peróxido de hidrogênio é detectado pela reação de quimiluminescência com o luminol e cobalto (II) numa coluna de troca iônica. Conseguiu-se um limite de detecção (LD) de $1,2 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, porém a presença de diferentes espécies causou interferência no sistema.

A espectrofotometria também pode ser utilizada para determinar o peróxido de hidrogênio. A reação do peróxido de hidrogênio com titânio (IV) em soluções ácidas fornece um método para determinação espectrofotométrica em soluções aquosas. A medida é possível pela formação do complexo amarelo peroxititânico que absorve em 407 nm. Mas o método é sujeito a um grande número de interferentes, como espécies de fosfatos, que reagem com o titânio (IV) ou absorvem no mesmo comprimento de onda (CLAPP *et al.*, 1989).

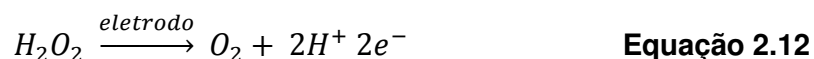
Métodos titrimétricos são baseados na oxidação do peróxido de hidrogênio com permanganato ou cério (IV), e depois redução com iodeto de potássio (GUWY *et al.*, 2000). Limites de detecção de $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram relatados (KLASSEN *et al.*, 1994). Além disso, a análise tem de ser feita imediatamente após a coleta da amostra, para evitar a decomposição durante estocagem ou transporte. Métodos baseados em emissão acústica também têm sido empregados e se baseiam em monitorar a reação da catalase com peróxido de hidrogênio empregando um transdutor piezo-elétrico, conseguindo-se limites de detecção da ordem de 1 a 125 mmol L^{-1} (WADE *et al.*, 1991). Estudos com fluorimetria (HOLM *et al.*, 1987), métodos cromatográficos e iodometria também são citados pela literatura para determinação do H_2O_2 (KAFI *et al.*, 2011).

Vale ressaltar, porém, que a grande maioria dos métodos analíticos apresentados possuem limitações em relação ao pH e a condutividade do meio (ELZANOWSKA *et al.*, 2003; MATTOS *et al.*, 2002; CHOI e YIU, 2004; GIANNOUDI *et al.*, 2006). A presença de espécies interferentes e a variabilidade da concentração afetam a confiabilidade da medida, requerendo purificação prévia da amostra, o que aumenta ainda mais o tempo de processamento e o custo da análise (CORCUERA e CAVALIERI, 2003). Como alternativa, as técnicas eletroquímicas oferecem simplicidade, rapidez, seletividade, e grande sensibilidade, sem interferências da coloração das amostras (MATTOS *et al.*, 2002, WANG, 2006).

2.6.2 Detecção eletroquímica do peróxido de hidrogênio

Na detecção eletroquímica, o peróxido de hidrogênio pode ser oxidado ou reduzido diretamente em eletrodos sólidos (CHEN *et al.*, 2012). Os eletrodos mais utilizados para detecção do H_2O_2 são o de platina (Pt) e de carbono (C) (ELZANOWSKA *et al.*, 2003; PURGANOVA e KARYAKIN, 2005).

ZHANG e WILSON (1993) estudaram a oxidação eletroquímica do H_2O_2 em eletrodo de fio de platina confirmando o alto potencial necessário (0,65 V vs. Ag/AgCl), sendo fortemente influenciada pelas condições de pH e temperatura. Verificaram que a reação no eletrodo é um processo irreversível com a transferência de dois elétrons, conforme reação apresentada pela Equação 2.12.



WANG *et al.* (1992) modificaram o sistema de detecção através da utilização de platina, paládio-carbono e rutênio em eletrodos de pasta de carbono (CPE), permitindo a detecção amperométrica do H_2O_2 em um potencial constante de 0,8 V vs. Ag/AgCl e limite de detecção de $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Mas este processo possui algumas limitações, como a velocidade da reação no eletrodo, que muitas vezes é lenta, e o alto potencial aplicado, que favorece a perda da sensibilidade e ocasiona interferência pela presença de espécies eletroativas comuns em amostras reais como o ascorbato, urato, bilirubina, paracetamol, dentre outras. Desta forma, os estudos sobre a detecção do H_2O_2 têm sido direcionados principalmente nas modificações químicas e eletroquímicas nas superfícies dos eletrodos com a finalidade de diminuir o sobrepotencial de oxidação do H_2O_2 (CHEN *et al.*, 2012).

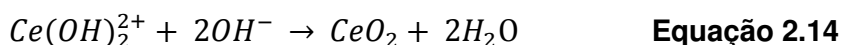
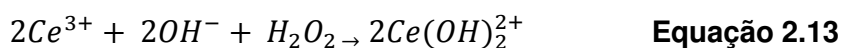
Neste contexto, tem-se realizadas modificações nas superfícies dos eletrodos com filmes de materiais inorgânicos e orgânicos, como os óxidos metálicos Cu_2O (ZHANG *et al.*, 2009) e CuO (SONG *et al.*, 2010). Metais de transição como no azul de Prússia ($Fe_4[Fe(CN)_6]_3 \cdot nH_2O$) tem sido largamente explorado pois a reação ocorre em baixo potencial, sendo possível minimizar as espécies interferentes presentes em solução e obter sensores amperométricos seletivos a H_2O_2 (HUA *et al.*, 2011, KARYAKIN *et al.*, 1998). Além disso, também existem estudos que empregam metaloporfirinas (HAMER *et al.*, 2009), polímeros redox (KUMAR e CHEN, 2007) e ligas, tais como Pt/Ir (ZHANG e WILSON, 1993), Pd (COX *et al.*, 1988), Pd/Au (GORTON, 1985) e Pd/Ir (JAWORSKI *et al.*, 1992), fornecendo estabilidade e facilidade na transferência de elétrons.

KARYAKIN e KARYAKINA (1999) depositaram AP sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo e verificaram a redução do H_2O_2 em potencial de -0,5 V vs.

Ag/AgCl em presença de O₂. Com esta configuração, conseguiram um limite de detecção de 0,1 μmol L⁻¹ de H₂O₂. Mas, apresentam desvantagens em aplicações de detecção, pois são instáveis em soluções neutras e alcalinas, onde forma reduzida pode ser dissolvida por íons hidróxido (CHEN *et al.*, 2012).

Na última década, os nanomateriais tem atraído enorme interesse pelas suas características químicas, físicas e eletrônicas aumentado o desempenho analítico (WANG, 2005; CHEN *et al.*, 2012). A modificação de um material de base com nanomateriais pode levar a uma superfície com maior razão área por volume, transporte eficiente de elétrons e excitação óptica, fazendo com que suas propriedades elétricas sejam fortemente influenciadas por mínimas perturbações, o que pode resultar em grande aumento da sensibilidade (WELCH e COMPTON, 2006; YOGESWARAN e CHEN, 2008). Estudos apontam que a modificação de eletrodos com nanotubos, nanopartículas, nanofios, dentre outros, conduzem a menores limites de detecção de H₂O₂ (KARYAKIN, 2008), com provável aplicação nos campos de diagnósticos clínicos e controle ambiental.

MEHTA *et al.* (2007) sintetizaram nanoaglomerados de partículas de óxido de cério de 3 a 5 nm, e as empregaram em conjunto com um microsensor. A eletrocatalise do H₂O₂ pelas nanopartículas de óxido de cério é dada pelas reações apresentadas nas Equações 2.13 e 2.14.



A caracterização do sensor amperométrico mostrou que o potencial de redução do H₂O₂ é 0,2 V vs. Ag/AgCl, e apresentou linearidade na faixa de 1 a 30 μmol L⁻¹ e tempo de resposta de 40 s.

LI *et al.* (2007) modificaram a superfície de um eletrodo de carbono vítreo com nanofibras de carbono, de cerca de 25 nm de diâmetro. O sensor foi utilizado para detecção amperométrica do peróxido de hidrogênio em solução pela aplicação de um potencial de 0,65 V vs Ag/AgCl no eletrodo de trabalho. Obteve-se uma faixa linear de

$1,80 \times 10^{-4}$ a $2,62 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e limite de detecção de $4 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$, apresentando estabilidade por 21 dias.

CHEN *et al.* (2011a) desenvolveram uma nova estratégia para fabricação de um sensor para detecção do peróxido de hidrogênio, eletrodepositando nanopartículas de prata (Ag) na superfície de eletrodo de carbono vítreo. Os experimentos eletroquímicos mostraram que o sensor construído favorece a redução do peróxido de hidrogênio em solução com a aplicação de um potencial de $-0,3 \text{ V vs. eletrodo de calomelano saturado (SCE)}$ nas condições ideais de pH 7,0. O sensor apresentou um limite de detecção de $2,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o H_2O_2 e faixa linear de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $21,53 \text{ mmol L}^{-1}$. Em uma avaliação sobre a influência de substâncias interferentes, o ácido ascórbico não teve influência na detecção do peróxido de hidrogênio.

Ainda nesta linha de pesquisa, existem trabalhos que combinam a função catalítica dos nanomateriais com a atividade para redução do peróxido de hidrogênio de metais de transição. LIN *et al.* (2010) sintetizaram nanocompósitos, que consistem em nanotubos de titanato comum filme de Azul de Prússia. O sensor amperométrico foi preparado com a modificação do eletrodo de carbono vítreo com estes nanocompósitos. O eletrodo modificado exibiu atividade eletrocatalítica para a redução do peróxido de hidrogênio em um potencial de $0,13 \text{ V vs. SCE}$ aplicado no eletrodo, e um limite de detecção de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A Tabela 2.9 mostra uma comparação do potencial aplicado (E), faixa linear e limite de detecção (LD) dos sensores amperométricos nanoestruturados para detecção do H_2O_2 reportados na literatura.

Tabela 2.9 - Comparação de desempenho de vários sensores nanoestruturados para detecção do H_2O_2 .

Sensor	E (V vs. Ag/AgCl)	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
GCE/MnO ₂	1,24	2,45 a 42,85	2,45	WANG <i>et al.</i> , 2011
Cu ₂ S/CMO/Nafion/GCE	-0,1	1 a 3030	0,2	BO <i>et al.</i> , 2010
GCE/MnO ₂ /Grafeno	-0,344	50 a 600	0,8	LI <i>et al.</i> , 2010
GCE/CNT	-0,344	1 a 220	0,15	WU <i>et al.</i> , 2007
Ni/NFSi	0,2	0 a 5500	3,2	YAN <i>et al.</i> , 2012
GCE/Grafeno/NpAg	0	2-710	0,5	XU <i>et al.</i> , 2011

ECV = Eletrodo de carbono vítreo; CMO = Carbono mesoporoso ordenado; NFSi = Nanofios de silício; NpPt = Nanopartículas de prata.

As performances analíticas para os sensores amperométricos apresentados são comparáveis, conseguindo-se baixos limites de detecção. No entanto, em alguns trabalhos, espécies interferentes afetam a determinação do H_2O_2 , seja pelo potencial aplicado ou provavelmente, pela catalítica de alguns nanomateriais em reagir com as substâncias interferentes (LI *et al.*,2010). A redução do potencial redox, seletividade para o H_2O_2 e valorização do sinal do sensor podem ser atingidos com a modificação dos eletrodos por elementos biológicos, como por exemplo, enzimas, o que indica o grande interesse pelo estudo e aplicação dos biossensores (GIANNOUDI *et al.*,2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os reagentes utilizados nos experimentos são de grau analítico (PA) e estão detalhados na Tabela 3.1. As soluções foram preparadas em água ultrapura, originadas de uma unidade de purificação Milli-Q (Millipore Corporation).

Tabela 3.1 - Relação dos materiais utilizados.

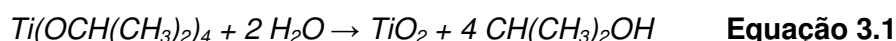
Reagentes	Formula química	Procedência	Pureza (%)
Peroxidase de <i>Amoracia rusticana</i> (horseradish peroxidase HRP) tipo IV	-	Sigma–Aldrich	-
Albumina de soro bovina (BSA)	-	Sigma–Aldrich	-
(3-aminopropil)trimetoxsilano (ATPMS)	C ₆ H ₁₇ SiNO ₃	Sigma–Aldrich	97
3-mercaptopropiônico (MPA)	C ₃ H ₆ SO ₂	Sigma–Aldrich	99
1-etil-3(3-dimetilamino propil)carbodiimina (EDC)	C ₈ H ₁₇ N ₃	Sigma–Aldrich	-
N-hidroxisuccinimida (NHS)	C ₄ H ₅ NO ₃	Sigma–Aldrich	98
Peróxido de hidrogênio	H ₂ O ₂	Sigma–Aldrich	30
4-aminoantipirina	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O	Sigma–Aldrich	98
Fenol	C ₆ H ₆ O	Sigma–Aldrich	99
Grafite (< 20µm)	-	Sigma–Aldrich	-
Óleo mineral	-	Sigma–Aldrich	-
Isopropóxido de titânio	Ti(OCH(CH ₃) ₂) ₄	Sigma–Aldrich	-
Glutaraldeído	C ₅ H ₈ O ₂	VETEC	25
Hidróxido de sódio	NaOH	VETEC	99
Ácido nítrico	HNO ₃	VETEC	65
Ácido clorídrico	HCl	VETEC	-
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	VETEC	99,5
Fosfato de potássio monobásico	K ₂ HPO ₄	VETEC	99,5
Fosfato de potássio dibásico	KH ₂ PO ₄	VETEC	98
Azul brilhante de Coomassie	C ₄₇ H ₄₈ N ₃ O ₇ Na	VETEC	-
Etanol	C ₂ H ₆ O	VETEC	95
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	VETEC	85

3.2 Síntese dos Nanotubos de Titanato (NTT)

Os nanotubos de titanato (NTT) foram preparados via síntese hidrotérmica alcalina através do método proposto por KASUGA *et al.* (1999). A uniformidade das nanoestruturas formadas depende tanto dos parâmetros de síntese como do precursor utilizado, neste caso a titânia (TiO₂).

3.2.1 Síntese da titânia precursora

A titânia (TiO₂), precursor dos NTT, foi preparada através da hidrólise lenta de isopropóxido de titânio, como detalhado por PAULINO (2011). A reação foi realizada a temperatura ambiente e em atmosfera inerte, empregando uma câmara plástica preenchida previamente com N₂. A reação ocorre conforme a estequiometria apresentada na Equação 3.1.



O precipitado obtido foi filtrado e lavado com água destilada, seco em estufa a 120 °C por 24 h e calcinado a 550 °C durante 6 h com fluxo de ar (30 mL min⁻¹).

3.2.2 Síntese dos NTT

De acordo com o método hidrotérmico, os NTT foram preparados usando o seguinte procedimento:

- ✓ 4 g de TiO₂ calcinado são solubilizadas em 200 mL de uma solução 10 mol L⁻¹ de NaOH e mantidas sob agitação durante 6 h para homogeneização;
- ✓ Em quatro reatores de teflon e aço inox, ilustrados na Figura 3.1a, esta solução é igualmente distribuída e aquecida em forno tipo mufla a 130 °C com agitação em rotor a 56 rpm durante 24 h. A taxa de aquecimento foi de 10 °C min⁻¹;

- ✓ Após este período, ainda sob agitação, o produto foi resfriado durante 12 h. Os reatores são abertos e a suspensão resultante filtrada. Os NTT constituem o sólido branco resultante.

Com o objetivo de eliminar os íons sódio (Na^+) da estrutura formada, o composto obtido foi misturado a uma solução de HNO_3 1 mol L^{-1} , sob agitação magnética, formando uma suspensão que foi em seguida filtrada sob vácuo. Procederam-se sucessivas lavagens (pelo menos seis vezes) com esta solução ácida e, em seguida, lavou-se com água destilada, até a obtenção de um filtrado com $\text{pH} = 7.0$. O sólido obtido foi secado em estufa a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 h. A amostra foi armazenada para futura caracterização. A Figura 3.1b mostra os NTT sintetizados.

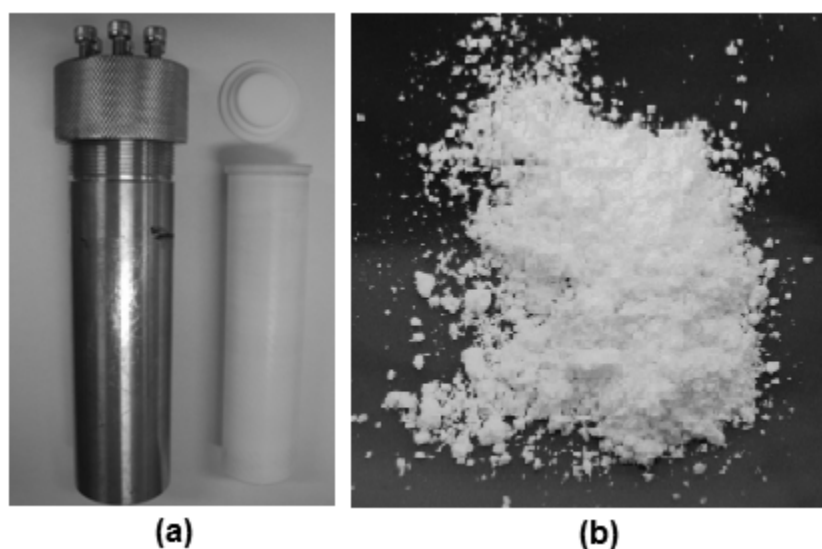


Figura 3.1 – (a) Reator utilizado na síntese dos NTT e (b) NTT utilizados nos experimentos.

3.3 Caracterização Físico-química dos NTT

A seguir, são apresentadas as técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho. No Anexo A encontram-se as descrições detalhadas de cada técnica.

3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) com detectores de energia dispersiva de raios X (MEV-EDS).

A técnica de MEV foi realizada no microscópio FEI Company, modelo Quanta 200, com a finalidade de avaliar a morfologia externa dos NTT. Já as análises em MEV-EDS, foram realizadas em equipamento Oxford Instruments, modelo INCA PENTA FET X3 acoplado ao microscópio. Esta técnica foi empregada para avaliar qualitativamente os elementos presentes nos NTT e as possíveis modificações na superfície após imobilização da HRP.

3.3.2 Fisissorção de N₂

Os valores de área específica dos NTT foram determinados pelo método BET, utilizando-se a técnica de fisissorção de nitrogênio a -196 °C, em equipamento ASAP (Accelerated Surface Area and Porosity) modelo 2020 da Micromeritics. Inicialmente o material foi tratado sob vácuo a 300 °C durante 12 h, principalmente para permitir a dessorção de água adsorvida.

3.3.3 Difração de raios X (DRX)

As análises em DRX foram realizadas em um difratômetro de raios X Rigaku modelo Miniflex com radiação de cobre ($\text{CuK}\alpha = 1,54178 \text{ \AA}$). Os valores de 2θ variaram de 0° a 90°, com passo de 0,05° e tempo de contagem de 1 segundo. Através dos difratogramas foi possível avaliar a formação de fases cristalinas do NTT.

3.3.4 Fluorescência de raios X (FRX)

A análise de FRX foi realizada em um equipamento Rigaku, modelo RIX 3100 com tubo de ródio e operado a uma voltagem de 4 kW. Esta análise tem por objetivo determinar a composição química do NTT.

3.3.5 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman foi empregada para obtenção de informações quanto aos grupamentos químicos presentes nos NTT. Para obtenção dos espectros, utilizou-se o espectrômetro LabRam Horiba HR-UV 800 com resolução $1 \mu\text{m}^3$, com laser He-Ne (Comprimento de onda 632 nm e potência 10,3 mW) e detector CCD (Charge coupled device). Para as análises, foi utilizada uma lente objetiva de 100x, sendo realizada em três regiões distintas da amostra de NTT.

3.3.6 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise FTIR, permitiu avaliar a inserção dos grupos funcionais nos NTT em virtude das funcionalizações realizadas. Os espectros foram obtidos no equipamento espectrofotômetro Perkin Elmer, Spectrum 100, com detector DTGS (Sulfato de triglicina). As análises foram realizadas em pastilhas de KBr, com concentração de amostra de 1% m/m, na região de 4000 a 800 cm^{-1} , 32 varreduras e resolução 4 cm^{-1} .

3.3.7 Espectrofotometria na região ultravioleta e visível (UV-vis)

A espectrofotometria UV-vis foi realizada no equipamento espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV mini 1240, para varredura dos espectros de absorção da HRP na região UV-vis utilizando cubetas de quartzo de 1,5 mL. Além disso, a técnica foi empregada na determinação das concentrações de proteínas pelo método de Bradford ($\lambda = 595 \text{ nm}$), e determinação da atividade enzimática da HRP ($\lambda = 510 \text{ nm}$) em cubeta de vidro de 3,0 mL.

3.3.8 Potencial Zeta

As medidas do potencial zeta foram realizadas em equipamento Zeta Plus Analyser Brookhaven Instruments Corporation. O potencial zeta foi determinado pela média de 5 ciclos por ensaio em cubetas de plástico (10 mm de percurso) com as amostras numa concentração de 0,01% m/m em água Milli-Q. Os experimentos foram

conduzidos a temperatura ambiente com os valores de pH ajustados com soluções de HCl e NaOH. Medidas do potencial zeta tiveram o objetivo de caracterizar o tipo de carga superficial e calcular seu ponto isoelétrico. Além disso, foram realizadas medidas das cargas superficiais dos NTT funcionalizados e com HRP imobilizada.

3.4 Caracterização da enzima HRP

3.4.1 Dosagem de proteínas

O método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976) é uma técnica para determinação de proteínas totais que se baseia na interação entre o corante azul brilhante de Coomassie e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Esta interação provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve em 595 nm (ZAIA *et al.*, 1998). O procedimento detalhado de Bradford encontra-se descrito no Anexo B.

3.4.2 Determinação da atividade específica da HRP

A unidade de atividade enzimática (U) é definida como o número de $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumido em 1 minuto em pH 7,0 e 25 °C (NICELL e WRIGHT, 1997). Para isso foi utilizado um ensaio proposto por Trinder em 1966, que utiliza a 4-aminoantipirina como doador de hidrogênio para a reação. Na reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase, o peróxido de hidrogênio reage com a 4-aminoantipirina e fenol formando um complexo de cor vermelha, a quinoneimina, conforme Figura 3.2 (VOJINOVIC *et al.*, 2004). A taxa de geração de cor a 510 nm é proporcional à taxa de H_2O_2 consumido, que é proporcional à concentração de enzima ativa no ensaio. O procedimento encontra-se descrito no Anexo C.

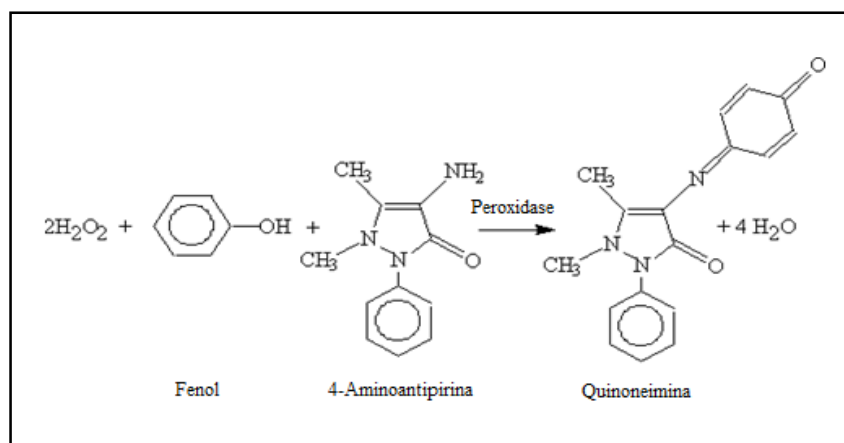


Figura 3.2 - Esquema da reação para determinação da atividade específica da HRP.

Para avaliar o efeito do pH na atividade específica da HRP livre, foram preparadas diferentes soluções tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de fosfato de potássio (PBS), com valores de pH variando de 2,0; 4,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0 e 12,0, utilizadas no ensaio de atividade enzimática descrito no item 3.4.2.

A estabilidade da enzima livre foi avaliada monitorando-se a atividade específica da HRP ao longo de tempo, em solução $0,1 \text{ M}$ PBS, pH 7,0, nas temperaturas de $8 \text{ }^\circ\text{C}$ e $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Tem-se por objetivo avaliar o comportamento da HRP durante o período de trabalho.

3.4.3 Avaliação dos parâmetros cinéticos da HRP

Determinação da taxa de reação (V_0). A taxa de reação foi determinada mantendo-se fixa a concentração da HRP e variando a concentração do peróxido de hidrogênio, em $0,1 \text{ M}$ PBS (pH 7,0), a temperatura ambiente. A atividade da HRP foi monitorada nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 e 1 mM de peróxido de hidrogênio. Os dados obtidos da leitura da absorbância em 510 nm , para cada concentração, no tempo de 5 minutos, foram representados graficamente e calculada a velocidade inicial de reação (V_0) dada pela taxa de consumo do H_2O_2 (TORRES, 2004). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Determinação de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m . A cinética da reação obedece à equação de Michaelis-Menten. A partir dos valores de velocidade inicial da reação (V_0) e da concentração do H_2O_2 , os coeficientes cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$ e K_m) foram calculados utilizando a estimação não-linear com o auxílio do software Statística[®].

3.5 Imobilização da HRP nos NTT

3.5.1 Por adsorção não específica

Uma solução de HRP na concentração de 1 mg mL^{-1} foi preparada em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH 7,0). Desta solução, 1 mL foi adicionado a uma suspensão de 5 mg de NTT – anteriormente agitada no ultrassom por 5 segundos (sonicador Fisher Scientific Modelo D100) – e a mistura foi mantida sob agitação a 20 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente. Logo após, a HRP imobilizada foi armazenada em solução $0,1 \text{ M}$ PBS (pH 7,0) a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.2 Por adsorção química

3.5.2.1 Ativação dos grupos carboxílicos (COOH)

A imobilização da HRP nos NTT funcionalizados com grupos carboxílicos (COOH) foi realizada de acordo com o procedimento que consiste em 3 etapas, ilustradas na Figura 3.3.

Etapa 1: Inicialmente 25 mg de NTT foram colocados em contato com 2,5 mL de solução 10 mmol L^{-1} MPA em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH 7,0), dispersos por sonicação durante 5 s. A mistura foi mantida sob agitação a 20 rpm por 3 horas à temperatura ambiente. Após este período, a mistura foi filtrada sob vácuo em membrana porosa com filtro $8 \mu\text{m}$ (Quanty), e os nanotubos modificados (NTT/MPA) foram lavados com solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH 7,0).

Etapa 2: Nesta etapa, 10 mg de NTT/MPA foram colocados em contato com 2 mL de uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de EDC. Paralelamente, 10 mg de NTT/MPA foram colocados em contato com 2 mL de uma solução $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ de EDC mais $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de NHS. Para ambos os procedimentos, a mistura permaneceu em agitação a 20 rpm por 1 hora à temperatura ambiente e em seguida os NTT foram filtrados e lavados da mesma forma que na etapa 1.

Etapa 3: Finalmente, 5 mg dos nanotubos modificados (NTT/MPA/EDC e NTT/MPA/EDC/NHS) foram colocados em contato com 1 mL de solução HRP 1 mg mL⁻¹ por 2 h e mantidos em agitação a 20 rpm e à temperatura ambiente.

Concluídas as etapas de imobilização, os NTT com HRP (NTT/MPA/EDC/HRP e NTT/MPA/EDC/NHS/HRP) foram armazenados em solução 0,1 mol L⁻¹ PBS (pH 7,0) a 4 °C.

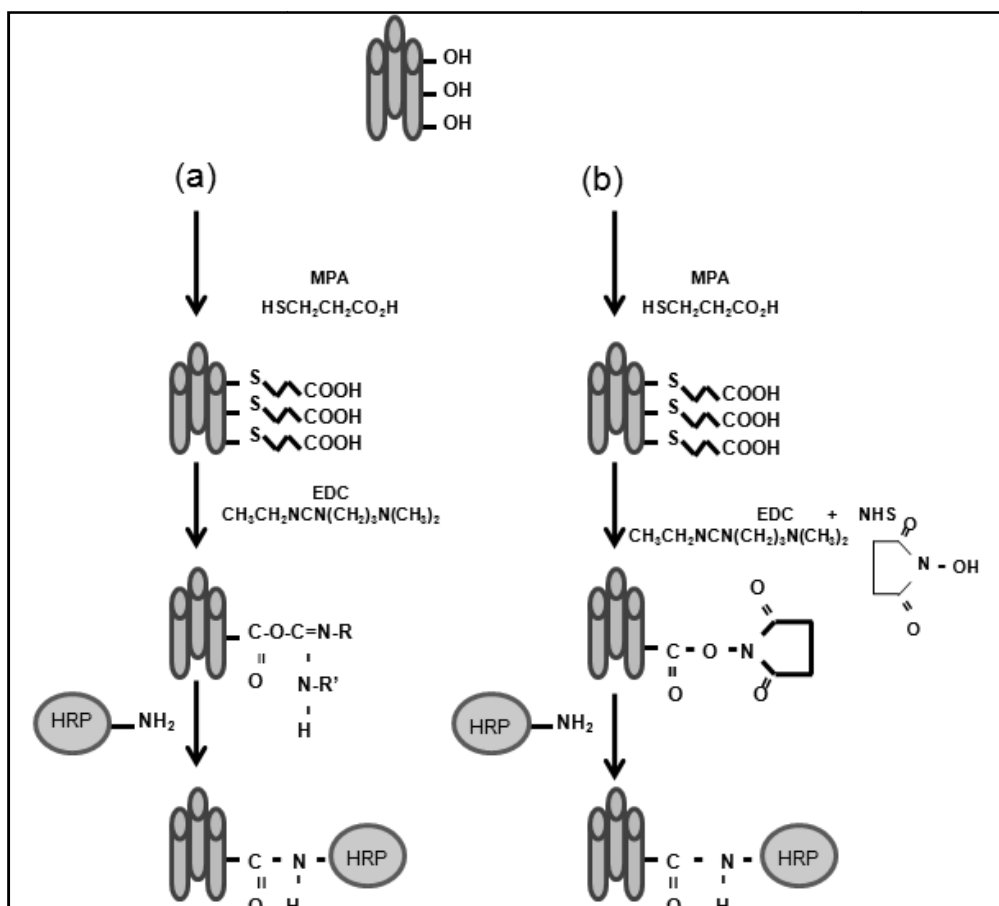


Figura 3.3 – Processo de imobilização covalente por ativação dos grupos carboxílicos, em que é usado (a) EDC e (b) EDC + NHS como agente de acoplamento.

3.5.2.2 Ativação dos grupos amino (NH₂)

A imobilização da HRP nos NTT funcionalizados com grupos amino (NH₂) foi realizada de acordo com o procedimento que consiste em 3 etapas, apresentado na Figura 3.4.

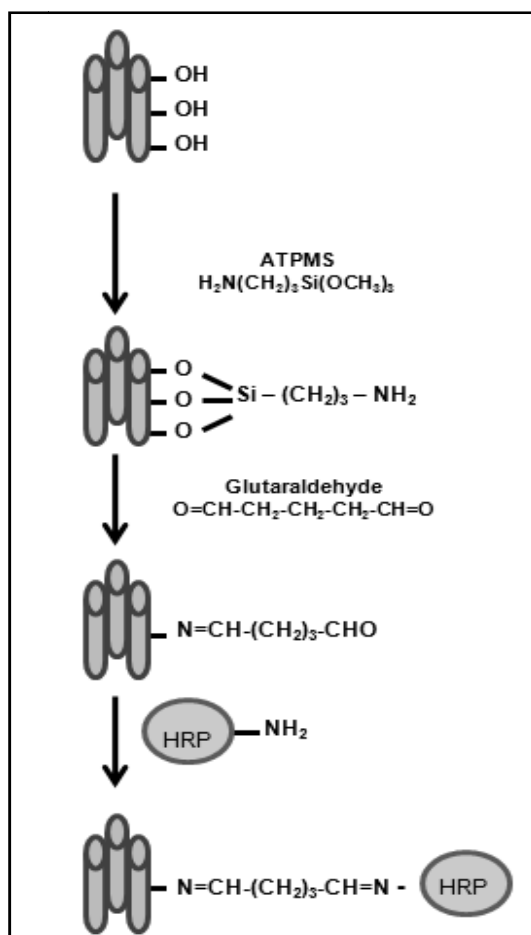


Figura 3.4 - Processo de imobilização covalente por ativação dos grupos amino.

Etapa 1: Baseado no procedimento de SOVIC *et al.* (2011), 50 mg de NTT são dispersos em 5 mL de diclorometano por meio de sonicação durante 5 segundos. Foi adicionado a esta suspensão, 0,1 mL de ATPMS. Em temperatura ambiente, a mistura foi mantida sob agitação a 20 rpm por 3 horas. Após este período, a mistura foi filtrada sob vácuo em membrana porosa com filtro 8 (Quanty)- Os NTT modificados (NTT/ATPMS) foram lavados com diclorometano, e secados a 60 °C em estufa, por cerca de 10 minutos.

Etapa 2: Nesta etapa, foi preparada uma solução 2,5% (m/m) de glutaraldeído (GLU) em 0,1 mol L⁻¹ PBS (pH 7,0). 10 mg de NTT/ATPMS foram dispersos em 500 µL desta solução e mantidos sob agitação 20 rpm por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida foram filtrados da mesma forma que na etapa 1, porém lavados com 0,1 mol L⁻¹ PBS (pH 7,0).

Etapa 3: Na última etapa, 5 mg de NTT modificados com glutaraldeído (NTT/ATPMS/GLU), foram colocados em contato com 1 mL de solução HRP 1mg mL⁻¹ por 2 h em agitação a 20 rpm e à temperatura ambiente.

Concluídas as etapas de imobilização, os NTT com HRP (NTT/ATPMS/GLUT/HRP) foram armazenados em 0,1 mol L⁻¹ PBS (pH 7,0) a 4 °C.

3.5.2.3 Avaliação da imobilização por Planejamento Experimental

A fim de avaliar o efeito das condições reacionais sobre a eficiência de imobilização, utilizou-se a ferramenta de planejamento de experimentos. Para tanto foi realizado um plano fatorial dos experimentos apresentado na Tabela 3.2, realizando uma triplicata apenas no ponto central.

Foi analisada a influência do volume de ATMS, volume de GLU e o tempo de contato dos NTT modificados (NTT/ATPMS/GLU) com a solução de HRP. Os experimentos foram realizados conforme procedimento descrito no item 3.5.2.2. Como modelo, utilizou-se a imobilização covalente por ativação dos grupos amino.

As variáveis-resposta utilizadas para verificar esta influência foram a quantidade de HRP imobilizada (%) e a atividade residual (%). A atividade residual foi determinada como descrito no item 3.5.3.1.

Tabela 3.2 - Plano fatorial experimental.

Variáveis	-1	0	1
Volume de ATPMS (mL)	0,01	0,105	0,2
Volume de Glutaraldeído (mL)	0,05	0,525	1
Tempo de contato (min)	10	65	120

O plano fatorial acima é chamado plano fatorial completo com dois níveis e tréplicas no ponto central. Dois níveis pois o objetivo é verificar se as variáveis de entrada influenciam diretamente nas variáveis de saída pelos chamados efeitos principais. A dois níveis, o número de experimentos definido pelo plano experimental é: $NE = NL^{NV} + NR$, onde NL é o número de níveis, NV o número de variáveis de

entrada e NR é o número de réplicas no ponto central e, portanto, $NE = 2^3 + 3 = 11$, conforme apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Plano fatorial normalizado.

Experimento	Volume de ATPMS	Volume de Glutaraldeído	Tempo de contato
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

3.5.3 Caracterização da interação da HRP com os NTT.

Além da atividade residual da enzima imobilizada nos NTT, a interação da HRP com os NTT também foi avaliada por meio de testes de estabilidade em relação ao tempo de armazenamento, testes de dessorção, além da determinação da cinética e isoterma de adsorção.

3.5.3.1 Determinação do teor e atividade da HRP imobilizada

Inicialmente, determinou-se a atividade específica da HRP livre, como comparação. Para determinação da atividade da enzima imobilizada, utilizou-se a seguinte metodologia:

- ✓ Após o procedimento de imobilização, a suspensão resultante foi inserida em filtros de centrifugação Amicon® (MILLIPORE) 100 kDa;

- ✓ Em seguida foram centrifugados a 4000 rpm por 4 minutos. Desta forma, a HRP que não foi imobilizada no NTT passa pela membrana de diálise de 100 KDa, já que a massa molar da peroxidase é de 60 KDa;
- ✓ Por fim, os NTT com a HRP imobilizada são inseridos em solução 0,1 M PBS (pH 7,0) e retiradas alíquotas para determinar o teor de HRP imobilizada e a atividade residual.

3.5.3.2 Estabilidade da HRP imobilizada

A HRP imobilizada nos NTT foi armazenada em solução 0,1 mol L⁻¹ PBS (pH 7,0) à temperatura de 4 °C. A atividade residual foi avaliada em função do tempo de armazenamento.

Para a HRP imobilizada nos NTT pela técnica de imobilização covalente por ativação dos grupos amino, também foram realizados testes de dessorção. A amostra foi inserida e mantida sob agitação por 5 horas nos seguintes meios:

- ✓ 0,1 M PBS (pH 7,0) à temperatura ambiente;
- ✓ 0,1 M PBS (pH 7,0) à temperatura de 35°C;
- ✓ Água destilada à temperatura ambiente;
- ✓ NaCl (2 g L⁻¹) à temperatura ambiente.

Para detectar a HRP dessorvida, foi realizado o procedimento da seção 3.5.3.1, além do emprego da obtenção do espectro de absorção na região ultravioleta e visível, visando encontrar os picos relativos à presença de proteína.

3.5.3.3 Cinética de adsorção

O estudo da cinética de adsorção da HRP nos NTT foi realizado para a adsorção não específica da HRP e adsorção química da HRP por ativação dos grupos amino. Os experimentos foram conduzidos em condições de temperatura ambiente. Para isso, as massas de 0,5, 1, 2 e 4 mg de nanotubos foram colocadas em contato com 1 mL de solução 0,5 mg mL⁻¹ de HRP (pH 7,0) e mantidas sob agitação a 20 rpm. Para a cinética da adsorção não específica, as amostras foram coletadas após 1, 3, 5, 8, 20 e 24 horas de contato, sob agitação, e para a cinética da adsorção química, as amostras

foram coletadas após 0,5; 1; 2; 4; 8 e 10 horas de contato. A quantidade de HRP adsorvida no equilíbrio foi calculada pela Equação 3.2 (XIONG *et al.*, 2011):

$$Q_e = \frac{(C_i - C_e)V}{m} \quad \text{Equação 3.2}$$

onde Q_e é a massa de HRP adsorvida ($\text{mg}_{\text{HRP}}/\text{g}_{\text{NTT}}$), C_i and C_e (mg L^{-1}) são a concentração inicial de HRP e concentração de equilíbrio de HRP, V (mL) é o volume da solução e m (g) é a massa de NTT ou NTT/ATPMS/GLU. Além disso, para o estudo cinético da adsorção química, também foi avaliada a atividade específica residual.

3.5.3.4 Isoterma de adsorção

A isoterma de adsorção foi obtida para a adsorção não específica da HRP e adsorção química da HRP por ativação dos grupos amino. Os experimentos foram conduzidos em condições ambiente. Os NTT e NTT/ATPMS/GLU foram colocados em contato com a HRP em diferentes razões massa/massa: 1:5; 1:2,5; 1:1; 1:0,25; 1:0,07 e 1:0,03 em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH 7,0), em condições de temperatura ambiente. O tempo de contato, sob agitação, foi estipulado a partir do ensaio da cinética, sendo o tempo necessário para atingir o equilíbrio de adsorção. A quantidade de HRP adsorvida no equilíbrio foi calculada pela equação 3.2.

3.6 Preparo do biossensor amperométrico

Para o preparo do biossensor, foram selecionados os NTT com HRP imobilizada pela técnica de adsorção química por ativação dos grupos amino (NTT/ATPMS/GLU/HRP). Sendo assim, o eletrodo de pasta de carbono (EPC) foi modificado com NTT/ATPMS/GLU/HRP. A pasta de carbono foi preparada na proporção de 75% em massa de pó de grafite com óleo mineral. A mistura foi homogeneizada por cerca de 15 min com gral e pistilo. Finalmente, a esta pasta foi inserido 20% (m/m) de NTT/ATPMS/GLU/HRP em relação à mistura. Novamente, a mistura foi homogeneizada por cerca de 15 min, e inserida na cavidade de 3mm de diâmetro do eletrodo de trabalho, como ilustrado na Figura 3.5.



Figura 3.5 – Eletrodo de trabalho.

3.7 Caracterização eletroquímica

Para a realização dos experimentos eletroquímicos utilizou-se uma célula de vidro, esquema mostrado na Figura 3.6, com capacidade de 50 mL, possuindo uma tampa contendo orifícios para o posicionamento dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar.

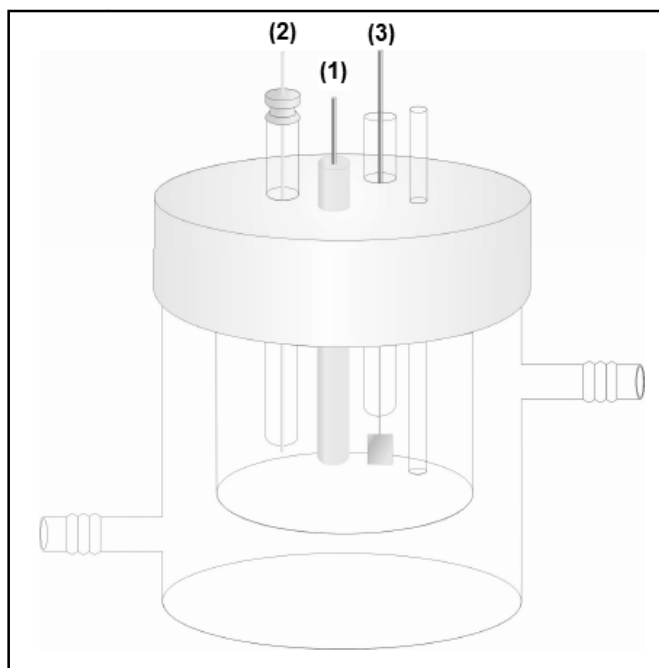


Figura 3.6 - Esquema da célula eletroquímica utilizada nos experimentos. (1) Eletrodo de trabalho; (2) Eletrodo de referência; (3) Eletrodo auxiliar (Adaptado de GALLI, 2011).

Os eletrodos de trabalho utilizados para as avaliações eletroquímicas foram EPC (75%), EPC (75%) modificados com NTT na proporção de 20% e EPC modificados com NTT/ATPMS/GLU/HRP também na proporção de 20%. O eletrodo de referência empregado foi o Ag/AgCl, que constitui em uma capa de teflon com fio de Ag revestido com AgCl, num tubo de vidro, em solução KCl 1 mol L⁻¹. O valor do seu potencial é de aproximadamente 0,222 V em relação ao eletrodo de hidrogênio (SHE – Standard Hydrogen Electrode). E o eletrodo auxiliar ou contra eletrodo utilizado foi o eletrodo de fio de platina de 10 mm de diâmetro. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente.

Foram empregadas as técnicas de Voltametria Cíclica, Voltametria Linear e Cronoamperometria para o estudo eletroquímico, sendo realizados no potenciostato Palm Sens que é constituído do software PSTrace. No Anexo D encontram-se descritas estas técnicas.

3.7.1 Nanotubos de Titanato

O caráter condutor dos NTT foi avaliado em solução 5 mM de ferrocianeto de potássio K₃[Fe(CN)₆] em 0,1 mol L⁻¹ de nitrato de potássio (KNO₃) utilizando a técnica eletroquímica de voltametria cíclica. Para isto, foi utilizado o EPC modificado com 20% de NTT e as medidas realizadas no intervalo de potencial de 0 a 0,9 V vs. Ag/AgCl com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹.

3.7.2 Biossensor

Com o propósito de estudar a transferência eletrônica direta da HRP imobilizada, a caracterização eletroquímica do biossensor foi realizada em solução 0,1 mol L⁻¹ PBS (pH 7,0) utilizando a técnica de voltametria cíclica no intervalo de potencial de 0 a -0,8 V vs. Ag/AgCl com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹. Para avaliar a reversibilidade do sistema, foram aplicados diferentes velocidades de varredura, no intervalo de 0,05 a 0,4 V s⁻¹.

3.8 Avaliação do biossensor na detecção de H₂O₂

3.8.1 Estudo da influência do pH do meio

Para avaliar o efeito do pH do meio reacional na resposta do biossensor proposto, foram realizados experimentos utilizando a técnica eletroquímica de voltametria cíclica em solução 0,1 mol L⁻¹ PBS nos pHs 6,0, 7,0 e 8,0 em presença de 3 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ H₂O₂, no intervalo de potencial de 0 a -0,8 V vs. Ag/AgCl com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹.

3.8.2 Estudo da reprodutibilidade de preparação do biossensor

A reprodutibilidade de preparação do biossensor foi avaliada por meio da resposta amperométrica destes dispositivos em solução 0,1 mol L⁻¹ PBS (pH 7,0) na presença de 3 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ H₂O₂, realizadas em dias diferentes. O intervalo de potencial utilizado foi de 0 a -0,8 V vs. Ag/AgCl com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹ através da técnica eletroquímica de voltametria cíclica. Foram preparados três biossensores diferentes e realizadas as medidas.

3.8.3 Estudo da repetibilidade da medida do biossensor

As análises de repetibilidade de detecção do H₂O₂ pelo biossensor foram realizadas em uma série de 10 medidas consecutivas (n=10) numa mesma solução 0,1 mol L⁻¹ PBS (pH 7,0) contendo 3 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ H₂O₂. Para tal, foi empregue a técnica eletroquímica de voltametria cíclica no intervalo de potencial de 0 a -0,8 V vs. Ag/AgCl com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹.

3.8.4 Estudo da estabilidade

Os testes de estabilidade têm por objetivo avaliar o tempo de vida útil do biossensor. Desta forma, foi realizado o monitoramento da resposta do biossensor por voltametria cíclica numa solução 0,1 mol L⁻¹ PBS (pH 7,0) contendo 3 x 10⁻⁵ mol L⁻¹

H₂O₂, no intervalo de potencial de 0 a -0,8 V vs. Ag/AgCl com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹. As medidas foram realizadas 30 dias utilizando o mesmo biossensor. Quando não está em uso, o biossensor fica armazenado a 4 °C em solução 0,1 mol L⁻¹ PBS (pH 7,0).

3.8.5 Curva de calibração

Estabelecidas as melhores condições para o desenvolvimento dos biossensores à base de NTT e HRP, construiu-se a curva analítica utilizando a técnica de cronoamperometria no potencial de trabalho de -0,38 V vs. Ag/AgCl, em solução 0,1 mol L⁻¹ PBS (pH 7,0) com adições sucessivas de H₂O₂. A curva analítica foi construída por meio da média das correntes de redução de cada adição vs. a concentração de H₂O₂.

Outros parâmetros importantes para avaliar o biossensor são o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ). O LD é a menor concentração de um analito detectado, mas não quantificado e o LQ é a menor concentração de um analito detectado corretamente. Eles foram avaliados seguindo o procedimento estatístico descrito por MILLER e MILLER (1993). A partir dos dados experimentais da curva de calibração, o declive (*b*) e a intercepção (*a*) podem ser calculados conforme Equações 3.3 e 3.4, respectivamente:

$$b = \frac{\sum_i \{ (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Equação 3.3}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{Equação 3.4}$$

Onde \bar{x} e \bar{y} são os dados experimentais centrais (média dos valores de todos os dados x_i e y_i)

Em seguida, foi avaliado o erro na determinação da inclinação e intercepção. Para isso, o desvio padrão ($s_{y/x}$) foi calculado utilizando a Equação 3.5:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - a)^2}{n-2}}$$

Equação 3.5

Em que n é o número de pontos experimentais. O parâmetro $s_{y/x}$ é usado para calcular o desvio padrão para a inclinação (Equação 3.6):

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Equação 3.6

Com este desvio padrão, os limites de confiança podem ser obtidos para $b \pm t_{(n-2)}s_b$, em que t é o parâmetro de Student. Desta forma, com estes parâmetros, é possível definir o limite de detecção (LD) e limite de quantificação, conforme Equações 3.7 e 3.8:

$$LD = a + 3s_b$$

Equação 3.7

$$LQ = a + 10s_b$$

Equação 3.8

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização dos NTT

4.1.1 Caracterização físico - química

A morfologia dos NTT foi analisada por microscopia eletrônica de varredura, mostrando-se na Figura 4.1 uma micrografia representativa das amostras preparadas. As amostras consistem de nanoestruturas tubulares com diâmetros de aproximadamente 50 nm. O espectro por EDS nesta região, mostrado na Figura 4.2, apresenta apenas picos referentes aos elementos Ti e O, confirmando a pureza dos NTT sintetizados. Os picos de Au aparecem devidos à metalização prévia das amostras para análise no MEV.

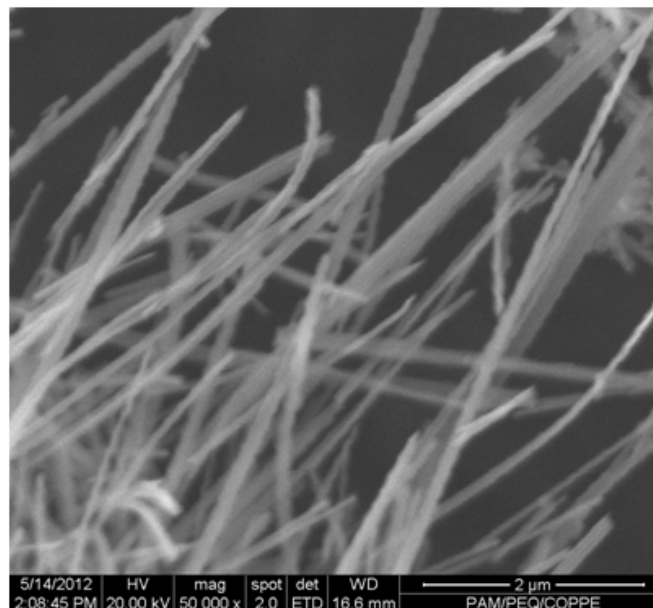


Figura 4.1 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV/FEG) dos NTT sintetizados.

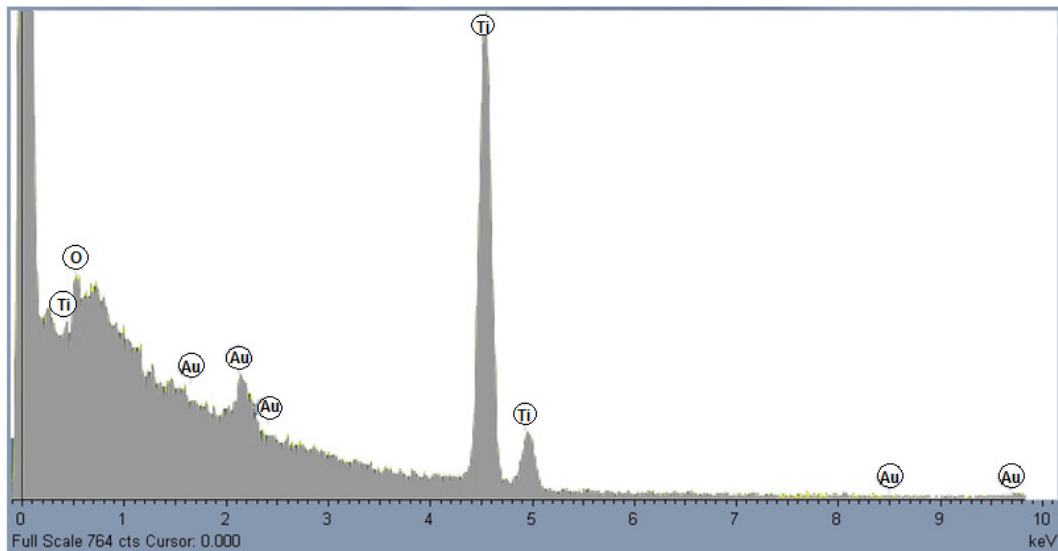


Figura 4.2 – Espectro de energia dispersiva (MEV/EDS) dos NTT sintetizados.

A caracterização estrutural dos NTT foi efetuada por difração de raios X, encontrando-se na Figura 4.3 um difratograma típico das amostras de NTT preparadas. O difratograma de raios X é idêntico ao reportado GAO *et al.* (2008) para NTT preparado também pelo método hidrotérmico.

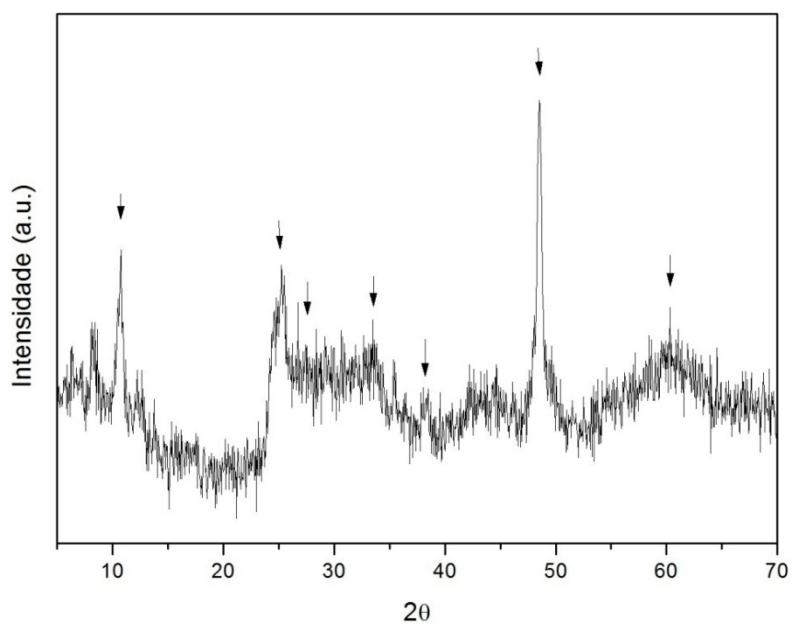


Figura 4.3 – Difratograma típico dos NTT sintetizados. As setas indicam as possíveis reflexões observadas.

O pico de difração em torno de 10° está relacionado com a distância interlamelar dos NTT, de cerca de 0,86 nm, enquanto que os picos em $25,3^\circ$, $28,5^\circ$ e $48,5^\circ$ são

característicos dos trititanatos ($\text{Na}_x\text{H}_{(2-x)}\text{Ti}_3\text{O}_7$) unidimensionais (MORGADO *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2008).

A área superficial dos NTT sintetizados foi de $118 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, determinada por adsorção de nitrogênio a 77 K, de acordo com a equação BET. Os nanotubos também foram caracterizados, quanto às suas propriedades estruturais, por espectroscopia no infravermelho (FTIR) e espectroscopia Raman, cujos espectros são apresentados nas Figuras 4.4 e 4.5, respectivamente.

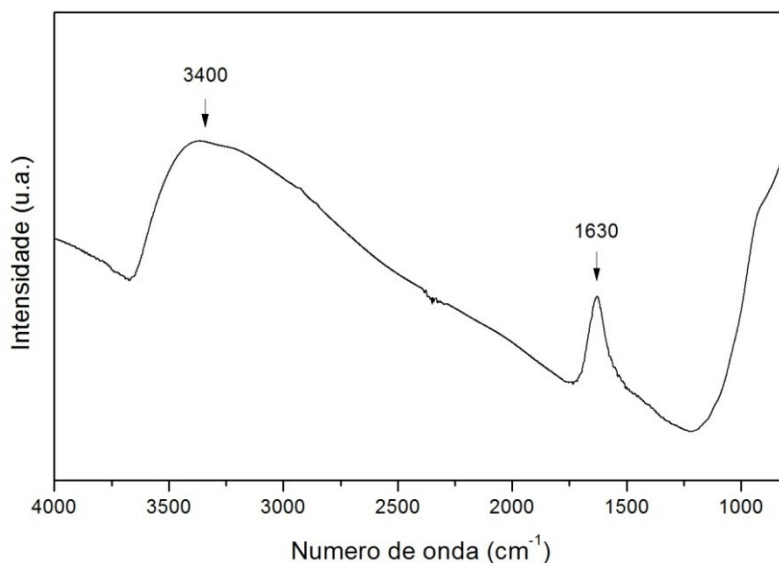


Figura 4.4 - Espectro de absorção por infravermelho dos NTT sintetizados.

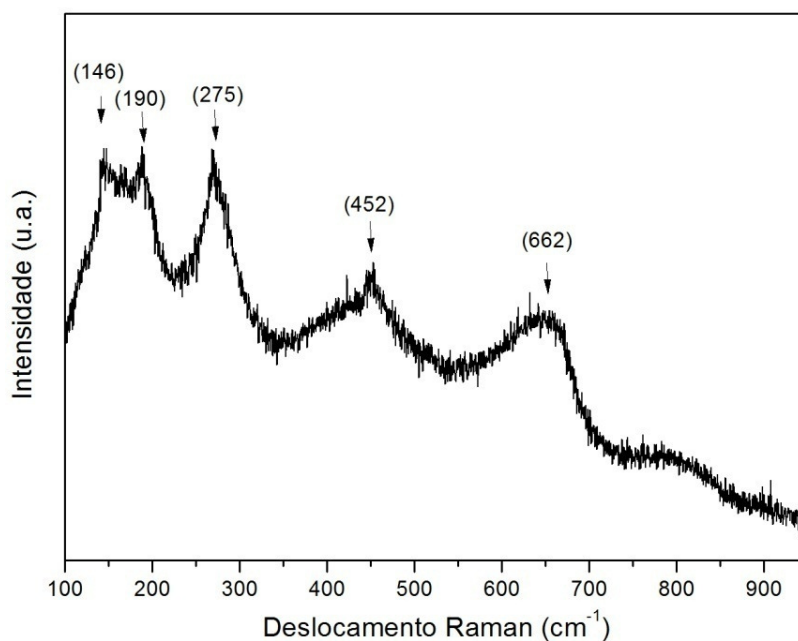


Figura 4.5 – Espectros Raman dos NTT preparados.

O espectro de FTIR mostra principalmente as bandas de absorção relativas às moléculas de água. A banda larga no intervalo de 3500-3000 cm^{-1} é devida à presença de grupos superficiais OH (SILVERSTEIN *et al.*, 2006), e em 1630 cm^{-1} deve-se à deformação angular dos grupos OH da água (LEE *et al.*, 2007).

O espectro Raman mostra bandas bem definidas em 146, 190, 275, 452 e 662 cm^{-1} . As duas primeiras, em 146 e 190 cm^{-1} , são atribuídas à fase anatásio (RIBBENS *et al.* 2008), enquanto que as bandas em 275, 452 e 662 cm^{-1} são atribuídas às vibrações das ligações Ti-O-Ti (QIAN *et al.*, 2005; KASUGA *et al.*, 1999). Bandas referentes a ligações com Na, características da presença de titanato de sódio, comuns na síntese pelo método alcalino hidrotérmico, não foram observadas. Salienta-se, desta forma, a eficiência da etapa de lavagem na troca iônica dos íons sódio por íons H^+ . Os planos observados estão de acordo com NTT protônicos sem presença de sódio, representados pela fórmula $\text{H}_2\text{Ti}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (GAO *et al.*, 2008). A análise por FRX, apresentada na Tabela 4.1, também confirma a formação de titanatos protônicos com pureza superior a 99%, sem presença de sódio.

Tabela 4.1 - Resultados da análise em FRX do NTT preparados.

Componentes	Massa (%)
TiO_2	99,24
P_2O_5	0,49
CaO	0,13
Na_2O	0,05
Al_2O_3	0,05
SO_3	0,03

4.1.2 Caracterização eletrocinética

Considerando a influência da carga superficial nos processos de adsorção, avaliou-se o potencial eletrocinético (potencial zeta) dos NTT e sua variação em função do pH, permitindo determinar o ponto isoelétrico do material. O ponto isoelétrico para os NTT sintetizados, conforme mostrado na Figura 4.6, foi atingido em pH igual a 3,2.

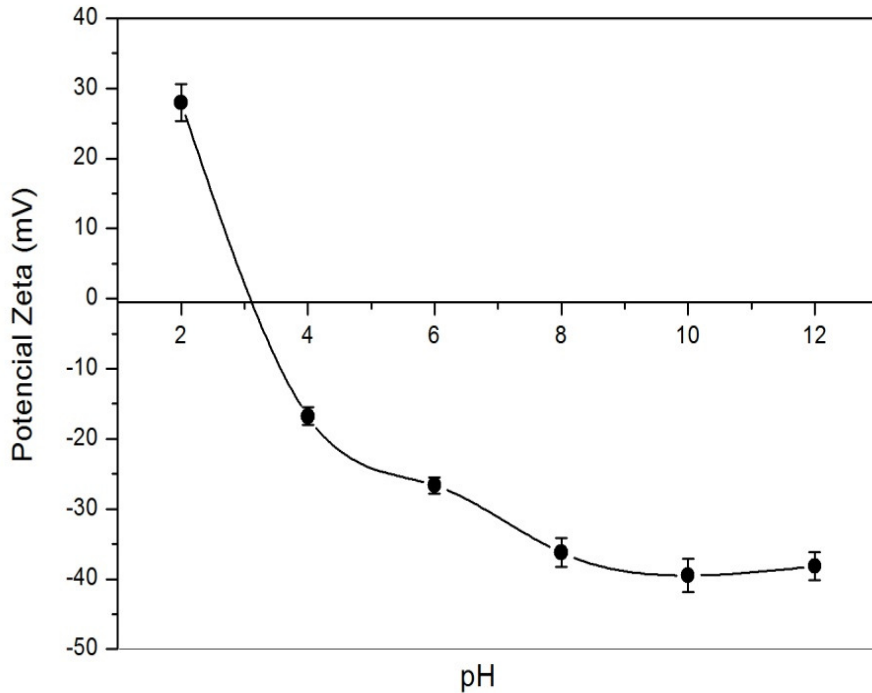
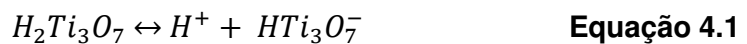


Figura 4.6 – Curva de titulação dos NTT para obtenção do potencial zeta.

É esperado que os NTT preparados pelo método hidrotérmico alcalino estejam carregados negativamente e interajam com espécies catiônicas (BAVYKIN *et al.*, 2006). Em solução aquosa, os NTT tendem a desenvolver um potencial zeta negativo devido à dissociação do ácido titânico de acordo com a reação apresentada na Equação 4.1. Este fenômeno pode auxiliar na capacidade de adsorção de certas espécies carregadas sobre a superfície do NTT.



O ponto isoelétrico para os NTT também foi investigado por BAVYKIN *et al.* (2006), que encontraram carga nula em pH 3,0 bem próximo ao valor encontrado neste trabalho.

4.2 Caracterização da enzima HRP

4.2.1 Absorção UV-vis

O espectro de absorção na região UV-vis da enzima HRP é apresentado na Figura 4.7.

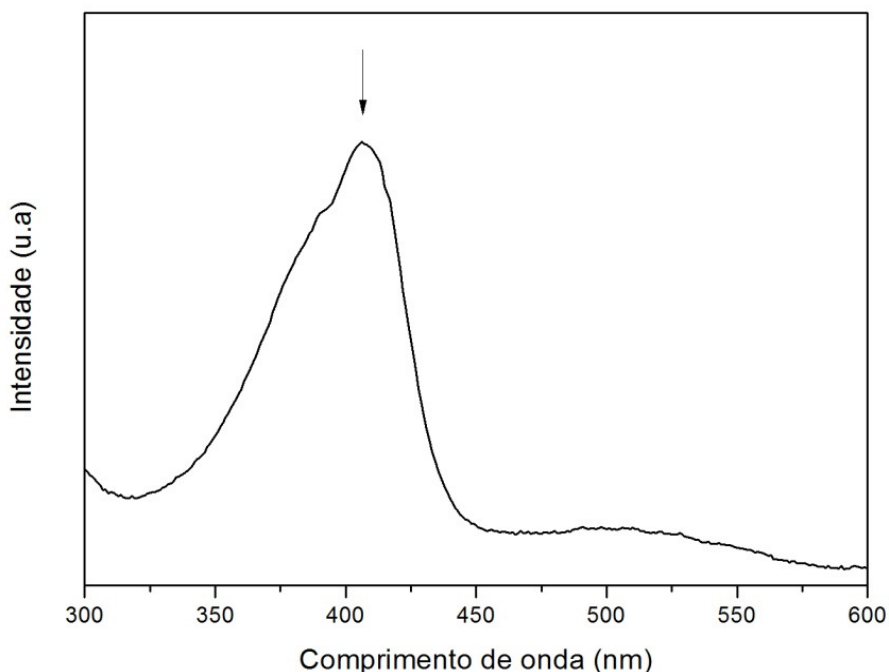


Figura 4.7 - Espectro de absorção na região UV-vis da HRP.

Pode-se observar uma elevada banda de absorção entre 400 e 405 nm, conhecida como banda de Soret. A absorção máxima nesta região é característica de hemo-proteínas em sua forma nativa nas quais o grupo prostético hemo está presente, como ocorre com a HRP (CHATTOPADHYAY e MAZUMDAR, 2000).

4.2.2 Atividade enzimática

Os resíduos de aminoácidos do sítio ativo de enzimas adquirem um estado de oxidação, que depende do pH, devido à presença de cadeias laterais desses aminoácidos atuando como ácidos ou bases fracas (LEHNINGER, 2006). Desta forma, o pH em que a enzima apresenta maior atividade também foi avaliado. Os valores da

atividade específica (U/mg) vs. pH em uma solução 0,1 mol L⁻¹ PBS são apresentados na Figura 4.8.

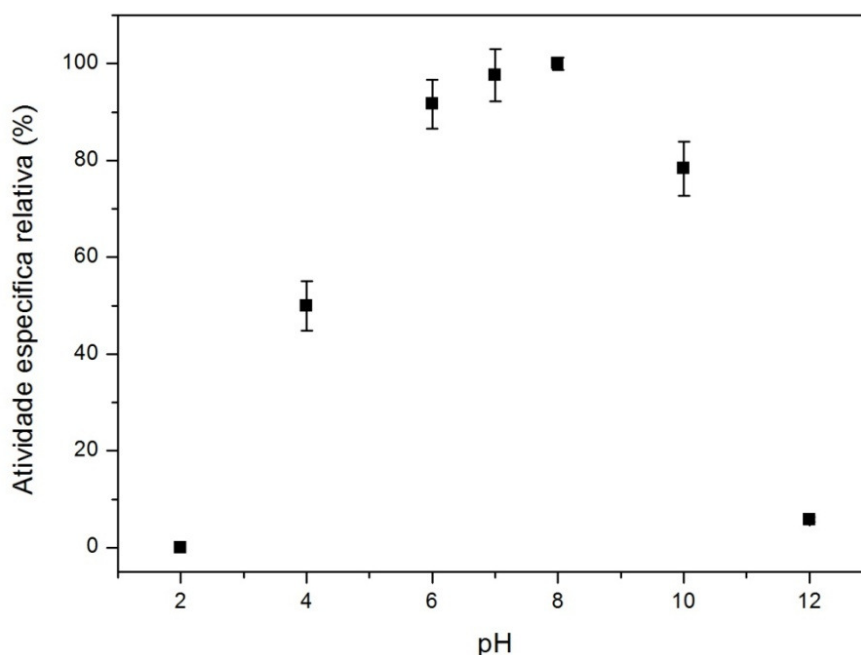


Figura 4.8 - Avaliação do pH de maior atividade da HRP.

Os resultados mostram que a HRP exibiu maiores valores de atividade na faixa de pH entre 6 e 8. Este intervalo também foi observado por outros estudos na literatura, sendo um dos fatores que tornam a HRP potencial para aplicações industriais (MOHAMED *et al.*, 2011; CHATTOPADHYAY e MAZUMDAR, 2000). A redução da atividade em pH inferior a 5 e superior a 10 está ligada a mudanças conformacionais afetando a estrutura terciária em torno do centro hemo da HRP (CHATTOPADHYAY e MAZUMDAR, 2000). Com base no resultado obtido definiu-se o pH 7,0, para dar prosseguimento ao trabalho.

4.2.3 Velocidade de reação

A velocidade de uma reação catalisada por uma enzima é expressa pela variação da concentração do substrato em função do tempo. O gráfico da Figura 4.9 apresenta o aumento na absorbância por minuto em função da concentração de peróxido de hidrogênio. Foi ajustado o modelo de Michaelis – Menten, com coeficiente de regressão (r^2) de 0,997 pelo Software Statistica®. A velocidade aumenta quase que linearmente até a concentração de 0,5 mol L⁻¹, acima da qual a taxa de reação tende a

se estabilizar. Os dados brutos obtidos neste experimento estão disponíveis no Anexo F.

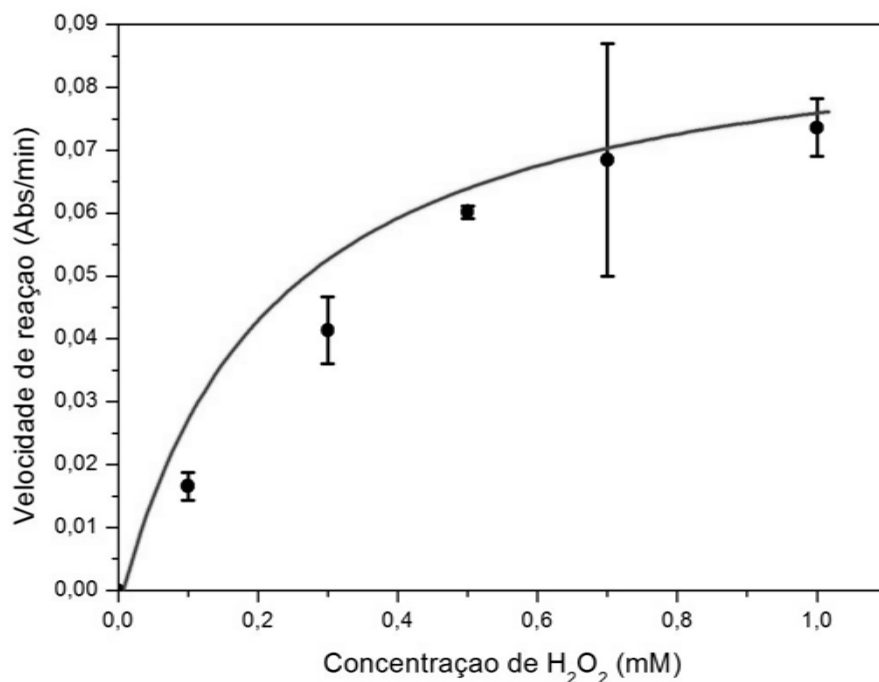


Figura 4.9 - Velocidade de reação para as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Os pontos são referentes aos dados experimentais obtidos, enquanto que a linha sólida é o ajuste do modelo de Michaelis – Menten.

O coeficiente cinético (K_m) de Michaelis-Mentes indica a afinidade da enzima pelo substrato, e quanto menor este valor, maior a afinidade. Um elevado valor $V_{máx}$ indica que todo o substrato está sendo utilizado pela enzima (TORRES *et al.*, 2004). A partir dos valores de velocidade da reação e da concentração do H₂O₂, os coeficientes cinéticos foram estimados não-linearmente, e estão apresentados Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Parâmetros cinéticos estimados pelo modelo de Michaelis - Menten

	Parâmetros	Valores
$V_{máx}$	mM.Min ⁻¹ /100 µL solução	0,114 ±0,025
K_m	mmol L ⁻¹	0,769 ±0,247

TRIPLETT e MELLON (1992) estimaram esta constante em 0,350 mmol L⁻¹, considerando o H₂O₂ um excelente substrato para a HRP. Comparado a este estudo e considerando o erro experimental, o valor encontrado é muito próximo.

4.2.4 Estabilidade da HRP

A estabilidade da HRP em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH 7,0), tanto na temperatura ambiente quanto a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, foi avaliada por meio da determinação da atividade específica (U mg^{-1}) ao longo do tempo. Os resultados mostram que, a enzima permanece estável por períodos superiores a 6 h, como mostra a Figura 4.10, suficientes para permitir o preparo dos biossensores sem comprometer a atividade catalítica.

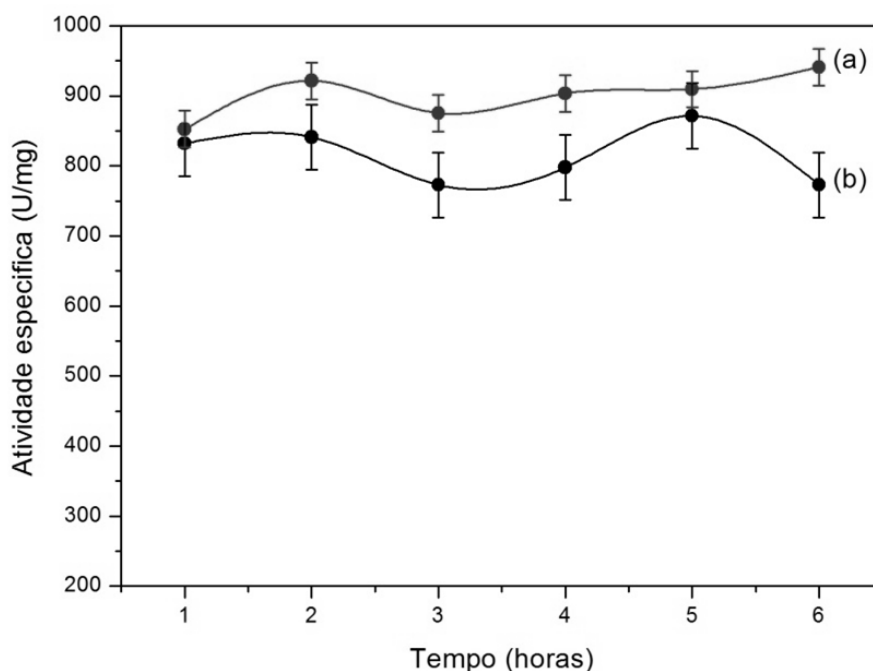


Figura 4.10 – Atividade específica da HRP em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH 7,0) armazenada em temperatura ambiente (a) e a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (b).

4.3 Imobilização da HRP nos NTT por adsorção não-específica

4.3.1 Isoterma de adsorção da enzima HRP nos NTT

A fim de obter as isotermas de adsorção da HRP, inicialmente determinou-se o tempo necessário para atingir o equilíbrio da reação, como mostrado na Figura 4.11.

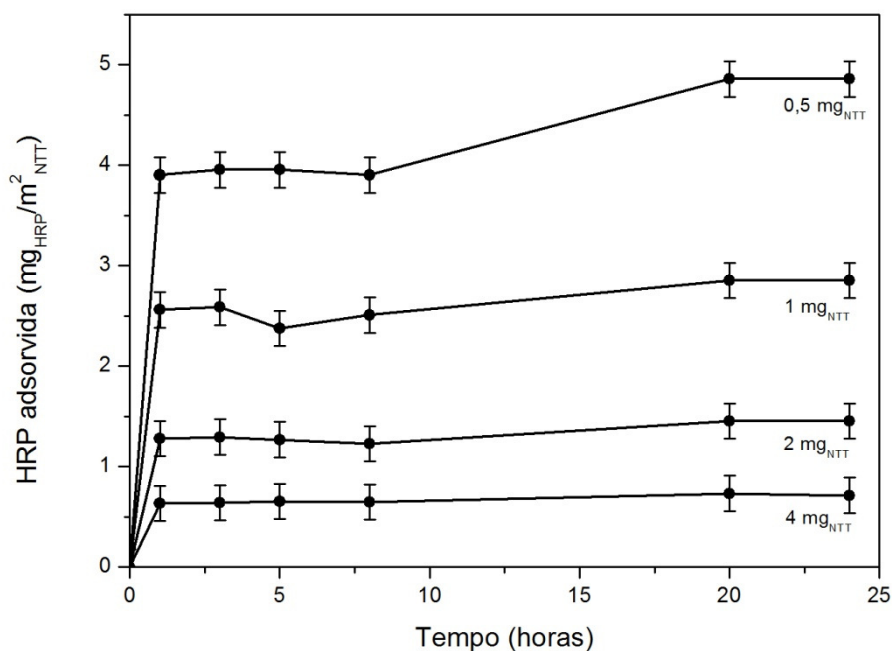


Figura 4.11 - Cinética de adsorção para a imobilização por adsorção não específica.

A partir de 20 h, em todas as proporções enzima/NTT, foi possível atingir o equilíbrio da adsorção. Assim, optou-se por fixar o tempo de contato em 24 horas em todos os experimentos posteriores para a imobilização por adsorção não específica. Os dados experimentais podem ser visualizados no Anexo G.

RISIO e YAN (2009), considerando que a concentração de equilíbrio foi atingida em 24 horas de contato, observaram comportamento similar na adsorção da HRP na superfície de fibras de celulose e sobre carbonato de cálcio, látex, fios de rayon e grânulos de estireno. Consideração similar foi realizada por SILVA *et al.*, (2007) na adsorção não específica de HRP em partículas de poli(metilmacrilato) (PMMA) e carboximetilcelulose (CMC). Outros trabalhos também reportam tempos de contato de 18 h (SU *et al.*, 2007; SANDWICK e SCHRAY, 1987) e 16 h (WAN *et al.*, 2012) para atingir a concentração de equilíbrio.

Os mecanismos de adsorção da HRP, sua afinidade pelos NTT e o grau de cobertura destes podem ser avaliados através da isoterma de adsorção. A Figura 4.12 mostra os dados experimentais da isoterma e a curva de ajuste do modelo da isoterma Langmuir-Freundlich (LF). Os dados de equilíbrio obtidos (Anexo G) foram analisados utilizando o modelo de LF, capaz de ajustar dados de adsorção em superfícies homogêneas e heterogêneas (UMPLEBY *et al.*, 2001; JEPPU e CLEMENT, 2012), conforme Equação 4.2.

$$Q_e = \frac{Q_m(KC_e)^{1/n}}{1+(KC_e)^{1/n}}$$

Equação 4.2

onde Q_m ($\text{mg}_{\text{HRP}}/\text{g}_{\text{NTT}}$) representa a quantidade de proteína adsorvida se cada sítio de adsorção disponível é ocupado por uma molécula de proteína; K ($\text{L}/\text{mg}_{\text{HRP}}$) é constante de afinidade; e n é a constante de Freundlich, que representa a cooperatividade presente na interação de ligação (PRAUS e TURICOVÁ, 2007).

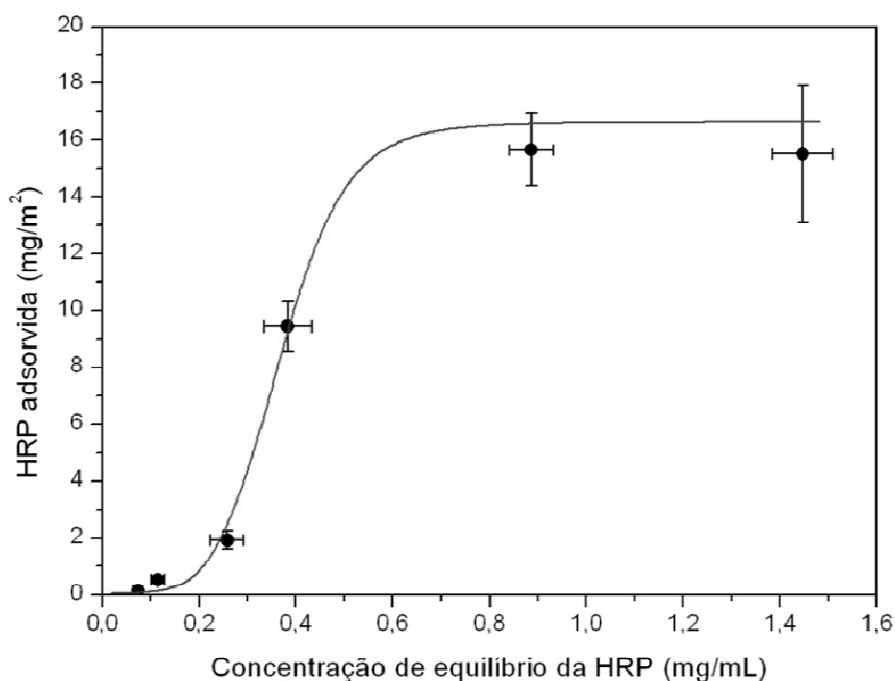


Figura 4.12 - Isoterma de adsorção para HRP imobilizada nos NTT por adsorção não específica. Os pontos são referentes aos dados experimentais obtidos, enquanto que a linha sólida é o ajuste do modelo LF.

A Tabela 4.3 apresenta os valores das constantes do modelo LF. O coeficiente de regressão obtido foi alto ($r^2 = 0,99946$), indicando a aplicabilidade da isoterma LF. O ajuste da forma não-linear deste modelo foi realizada utilizando o software Statística[®].

Tabela 4.3 - Parâmetros do modelo LF para a isoterma de adsorção.

	Q_m ($\text{mg}_{\text{HRP}}/\text{m}^2_{\text{NTT}}$)	K ($\text{L}/\text{mg}_{\text{HRP}}$)	$1/n$
Valor estimado	15,621	2,800	6,063
Desvio padrão	0,224	0,038	0,014

Os pontos iniciais da isoterma estão associados às baixas concentrações de HRP. Esta isoterma é caracterizada por ter uma região inicial de baixa afinidade, caracterizada por interações fracas entre adsorvente e o adsorbato. A constante de afinidade (K) encontrada no modelo LF confirma este fenômeno. Após esta região, existe um aumento contínuo da quantidade de massa adsorvida em função da concentração de equilíbrio da solução, até a possível saturação da superfície dos NTT (interna e externa). O patamar é atingido em $15,621 \pm 0,232 \text{ mg}_{\text{HRP}}/\text{m}^2_{\text{NTT}}$, observado para concentrações de enzima maiores que $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$. Considerando a massa molar e o diâmetro das moléculas de HRP em 44 kDa e 60 Å, respectivamente, e da constante de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$ moléculas mol^{-1}), é possível estimar a área ocupada pelas moléculas de HRP e o número de camadas adsorvidas no NTT. Partindo do princípio de que a HRP adsorveu em multicamadas, calculou-se que foram adsorvidas cerca de 13 camadas da enzima. De modo semelhante, a literatura relata a adsorção de HRP em NTT em $32,3 \text{ mg HRP}/\text{m}^2_{\text{NTT}}$, igualmente com formação de multicamadas (XIAO *et al.*, 2011).

Nos experimentos de imobilização, com a finalidade do preparo do biossensor, estimou-se a capacidade adsorptiva dos NTT em $1,70 \pm 0,07 \text{ mg}_{\text{HRP}}/\text{m}^2_{\text{NTT}}$ e o excesso superficial em $2,32 \times 10^{12}$ moléculas por cm^2 . Este resultado é da mesma ordem de grandeza de alguns trabalhos sobre adsorção não específica da HRP. NAVES (2008) imobilizou HRP sobre lâminas de Si/SiO₂ e estimou a densidade superficial das moléculas de HRP imobilizadas em $2,11 \times 10^{12}$ moléculas por cm^2 por medidas em elipsometria. WAN *et al.* (2012) estudaram a adsorção de HRP em sílica mesoporosa, obtendo de 0,03 a 0,09 $\text{mg}_{\text{HRP}}/\text{m}^2$, valor inferior ao obtido nesse trabalho.

Para o modelo LF, em formação de monocamadas, existe o critério $0 < 1/n < 1$. Diferentemente, neste trabalho, foi obtido o valor de $1/n > 1$. Nestes casos, alguns autores atribuem esse fato ao fenômeno conhecido como adsorção cooperativa, em que elevadas quantidades de proteína são adsorvidas (FAIR e JAMIESON, 1980; FOO e HAMEED, 2010), com formação de multicamadas. Isso significa que a proteína é mais susceptível a adsorver se já há proteínas pré-adsorvidas na superfície.

RABE *et al.* (2011) investigando a adsorção da BSA em hidroxiapatita, concluíram que a alta densidade de proteína determina a probabilidade para que ocorra a adsorção cooperativa e não a adsorção clássica, com monocamada, como previsto, por exemplo, pelo modelo de Langmuir. O tampão também influenciou na interação proteína-proteína, pois com a utilização do PBS (mesmas condições

utilizadas neste trabalho) houve um aumento na constante de interação cooperativa entre as moléculas de BSA ($1/n$) e uma diminuição da constante de adsorção máxima nos sítios ($Q_{máx}$), com competição entre os grupos fosfato e a BSA para os sítios de superfície da hidroxiapatita. Foi considerado também que o campo eletrostático das proteínas adsorvidas induziu a um tipo de auto-montagem eletrostática, aumentando a taxa de adsorção de proteína.

Neste trabalho, a imobilização da HRP foi realizada em pH 7,0, onde a mesma encontra-se com carga líquida próxima à neutralidade, com ponto isoelétrico em torno de 7,2 mV. Nesse pH os NTT estão carregados negativamente, fato evidenciado pelo valor obtido do potencial zeta de $-43,65 \pm 5,3$ mV. Desta forma, uma atração entre os grupos negativos dos NTT e aminoácidos positivamente carregados da HRP deve ter ocorrido, não modificando substancialmente o valor do potencial zeta final do suporte com a enzima, que foi de $-54,26 \pm 4,56$ mV.

4.3.2 Avaliação da imobilização e Atividade residual

A Figura 4.13 apresenta uma micrografia dos NTT após imobilização da HRP. Os nanotubos parecem estar mais aglomerados, quando comparados à Figura 4.1, e observa-se também o aparecimento de estruturas maiores e compactas, que podem ser atribuídas à precipitação de sais do tampão utilizado no procedimento de imobilização. Esta hipótese é comprovada pela análise por EDS nessa região, conforme Figura 4.14, mostrando picos dos elementos P e K, devidos ao tampão PBS utilizado. O aparecimento do pico referente ao elemento carbono pode ser atribuído à HRP imobilizada nos NTT.

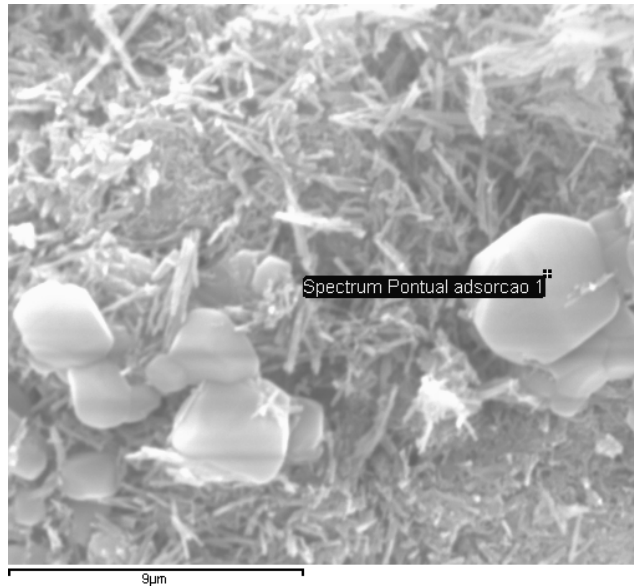


Figura 4.13 – Imagem por MEV dos NTT após imobilização da HRP por adsorção não específica.

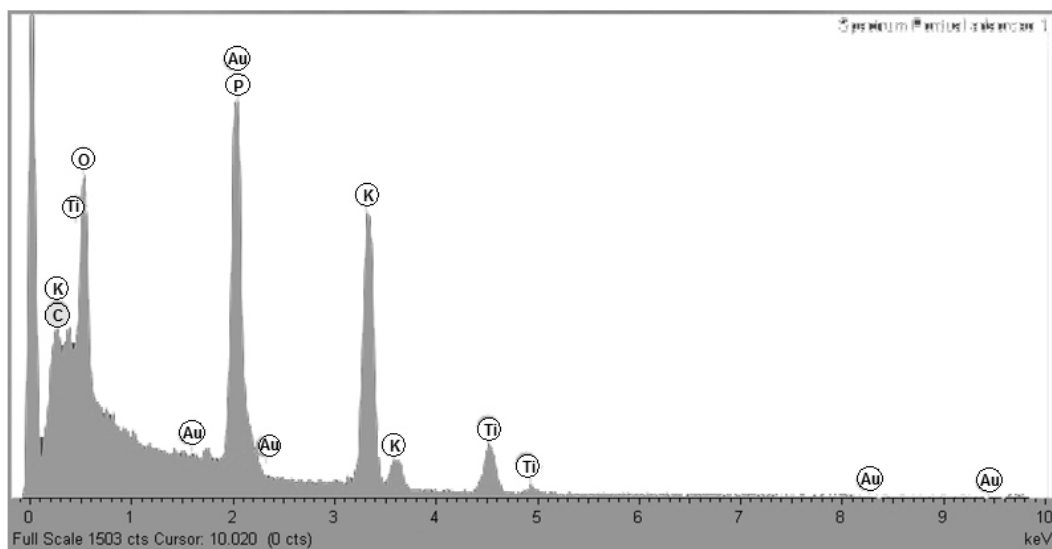


Figura 4.14 - Análise por EDS dos NTT após imobilização da HRP por adsorção não específica.

Um parâmetro importante na determinação da eficiência do biossensor é avaliar a atividade específica da HRP imobilizada. O efeito da adsorção sobre a atividade específica da HRP foi avaliado para a HRP imobilizada e comparada com a atividade específica exibida pela HRP livre.

O resultado mostrou que a HRP após imobilização manteve somente 2,94 ±0,43% de sua atividade específica, o que inviabilizaria sua aplicação em

biossensores. Numa adsorção não específica, a molécula de proteína apresenta um elevado grau de movimentos, tanto de rotação como lateral (NAKATA *et al.*, 1996).

Estes resultados estão de acordo com o mecanismo sugerido por COEN *et al.* (2001), estudaram a adsorção da proteína A em superfícies de silicone. Segundo os autores, em geral, a adsorção não específica de proteínas ocorre em duas etapas: (i) a proteína é rapidamente adsorvida e forma uma monocamada firmemente ligada e é desnaturada devida às múltiplas ligações em seu sítio ativo, tendendo a perder sua estrutura terciária e, conseqüentemente, sua atividade biológica, e (ii) inicia-se uma interação proteína-proteína, formando - se novas camadas, ocorrendo múltiplas ligações não direcionadas que também podem levar à desnaturação da proteína.

4.4 Imobilização covalente da HRP nos NTT por ativação dos grupos carboxílicos.

A imobilização covalente nos NTT funcionalizados com grupos carboxílicos foi realizada de duas formas: em uma, (i) adicionou-se apenas EDC, e na outra, (ii) EDC com NHS, como agentes de acoplamento da HRP. Nesse caso, o EDC ativa o tiol que contém o grupo terminal carboxílico, ligando-se diretamente ao grupo amina da HRP para formar a ligação amida. Quando são usados o EDC e NHS, o EDC reage da mesma forma anterior e o NHS reage formando um intermediário éster. A imobilização ocorre por deslocamento deste grupo por resíduos de lisina da HRP, formando uma ligação amida (FREY e CORN, 1996; DELVAUX *et al.*, 2003).

4.4.1 Caracterização dos NTT funcionalizados

Foram realizadas análises por FTIR e potencial zeta para avaliar a eficiência de inserção dos grupos funcionais nos nanotubos. A Figura 4.15 apresenta os espectros FTIR dos NTT funcionalizados em cada etapa da funcionalização. A primeira etapa da funcionalização consistiu em ativar os NTT com grupos carboxílicos em reação com MPA. Comparando o espectro FTIR dos NTT (Figura 4.15a) com o espectro da matriz NTT/MPA (Figura 4.15b), pode-se observar a diminuição da intensidade das bandas OH, devido à diminuição destes grupos na superfície. Observa-se o aparecimento de novas bandas, em 1430 cm^{-1} (DRAKE *et al.*, 1996), devido à deformação angular no

plano C-O-H, em 1200 cm^{-1} pela vibração do estiramento C-O e em 1000 cm^{-1} , indicando a presença de grupos carboxílicos na superfície dos NTT (KAVAN *et al.*, 2010).

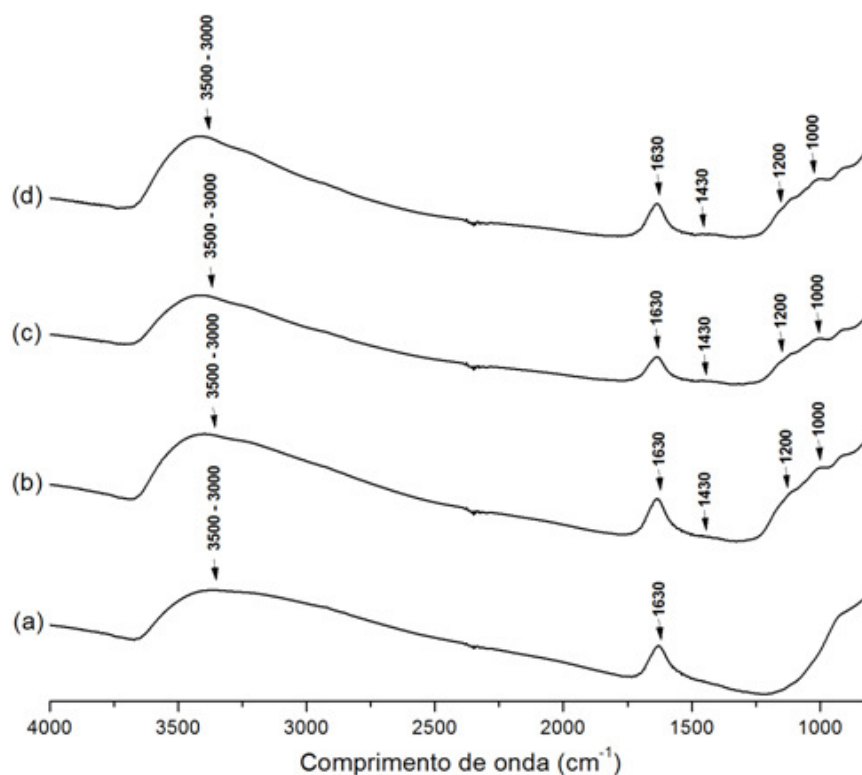


Figura 4.15 - Espectro de absorção no infravermelho dos (a) NTT, (b) NTT/MPA, (c) NTT/MPA/EDC, (d) NTT/MPA/EDC/NHS

Comparando os espectros (c) e (d) com o espectro (b) da Figura 4.15, não se observa a formação de novas bandas, indicando que esta etapa de funcionalização não foi realizada com êxito. A Tabela 4.4 apresenta um resumo das informações obtidas por FTIR.

Tabela 4.4 – Posições das bandas e atribuições dos espectros FTIR.

Número de onda (cm^{-1})	Vibração do Grupo	Referência
3500 – 3000	OH (estiramento)	SILVERSTEIN <i>et al.</i> , 2006
1630	OH (deformação angular)	LEE <i>et al.</i> , 2007
1430	C-O-H (deformação angular)	DRAKE <i>et al.</i> , 1996
1200	C-O (estiramento)	KAVAN <i>et al.</i> , 2010
1000	COOH (estiramento)	KAVAN <i>et al.</i> , 2010

Medições do potencial zeta, conforme Figura 4.16, revelam que a matriz NTT/MPA exibe um potencial zeta de $-49,36 \pm 7,2$ mV, mais negativo que para o NTT ($-43,65 \pm 5,3$ mV), indicando a inserção dos grupos carboxílicos, já confirmado pela análise de FTIR. Estes grupos tendem a ser desprotonados (COO^-), pois seu pKa (1,8 a 2,4) é muito menor do que o pH do meio (7,0) (FUJIMOTO *et al.*, 2002). As matrizes NTT/MPA/EDC e NTT/MPA/EDC/NHS exibiram um potencial zeta de $-41,36 \pm 6,25$ mV e $-41,94 \pm 6,62$ mV, respectivamente, muito próximos ao do suporte antes da reação com EDC e NHS, indicando que não se obteve sucesso na introdução de amida por esta metodologia.

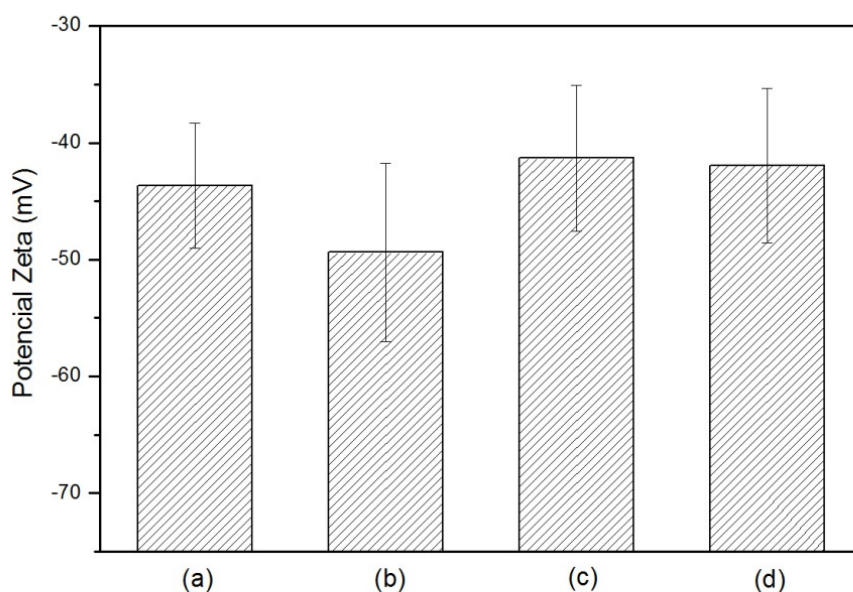


Figura 4.16 - Medidas do potencial zeta dos (a) NTT, (b) NTT/MPA, (c) NTT/MPA/EDC, (d) NTT/MPA/EDC/NHS.

Para que ocorra o acoplamento bem sucedido dos intermediários EDC e NHS, a reação é dependente da acessibilidade aos terminais carboxilato. Se estes terminais estiverem em um empacotamento estérico, altamente ordenados, estes grupos ácidos podem impedir a reação e limitar a formação dos grupos éster intermediários (FREY e CORN, 1996; PATEL *et al.*, 1998). PATEL *et al.* (1998) verificaram isso em seus estudos sobre a adsorção covalente da catalase em superfícies de ouro. Criaram terminais carboxilato nas superfícies com MPA e MUA (ácido 11-mercaptopundecanoico), mas não houve reação com EDC e NHS.

É possível que a conversão total dos grupos ácidos apenas ocorra após vários ciclos de reação repetidos. FREY e CORN (1996) necessitaram de três ciclos de reação para converter os grupos carboxílicos nos intermediários com NHS e EDC.

Neste trabalho, empregou-se apenas 1 hora em contato com estes reagentes. Outros trabalhos na literatura, com a finalidade de imobilizar covalentemente biomoléculas, empregaram tempos de contato maiores com o EDC e NHS para formação dos intermediários, como 48 horas (WANG *et al.*, 2012a) e 4 horas (YU *et al.*, 2003). Por outro lado, ASURI *et al.* (2007), utilizaram tempos de contato de 30 minutos para imobilização da HRP, com sucesso.

Outra possibilidade é que o aumento da hidrofobicidade pode promover interações hidrofóbicas entre os grupos metileno, presentes na cadeia que dá acesso ao grupo carboxílico terminal, com o EDC ou NHS, impedindo a reação de formação dos intermediários que se ligariam aos resíduos de lisina da HRP (PATEL *et al.*, 1998). Mas ainda é uma hipótese que necessita de maiores estudos.

4.4.2 Avaliação da imobilização e atividade residual

A Figura 4.17 apresenta a imagem por MEV dos NTT após imobilização covalente da HRP. Quando comparada com a Figura 4.1, os nanotubos aparecem mais aglomerados. As Figuras 4.18 e 4.19 mostram as análises em EDS realizados nas regiões da Figura 4.17. Numa análise qualitativa, é possível observar, em ambos os espectros de EDS, o aparecimento do pico referente ao elemento carbono, que se deve a HRP imobilizada nos NTT. Os picos dos elementos P e K são devidos ao tampão PBS utilizado no procedimento de imobilização.

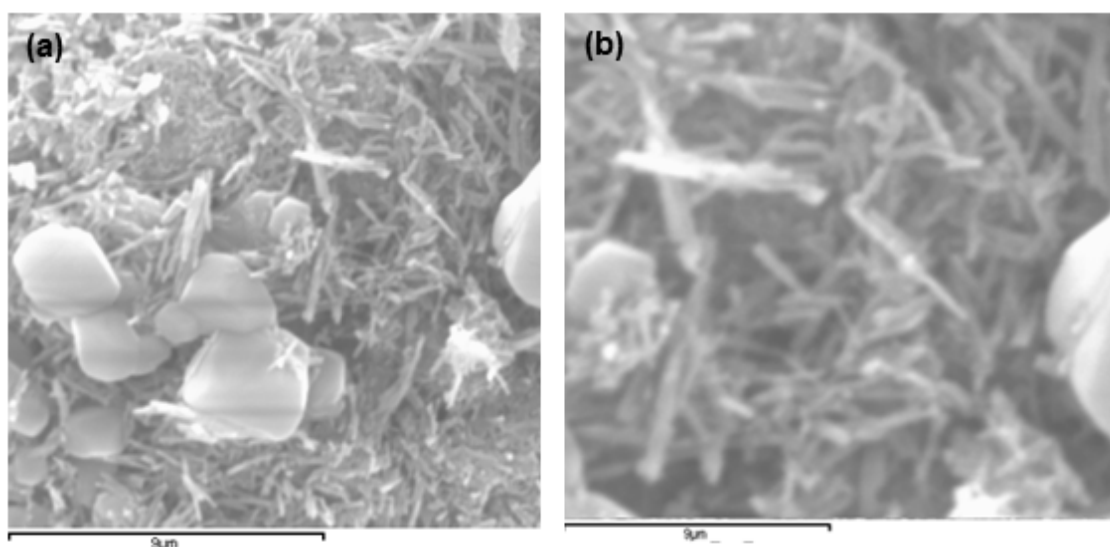


Figura 4.17 - Imagem por MEV da matriz após imobilização da HRP por ativação dos grupos carboxílicos (a) NTT/MPA/EDC e (b) NTT/MPA/EDC/NHS.

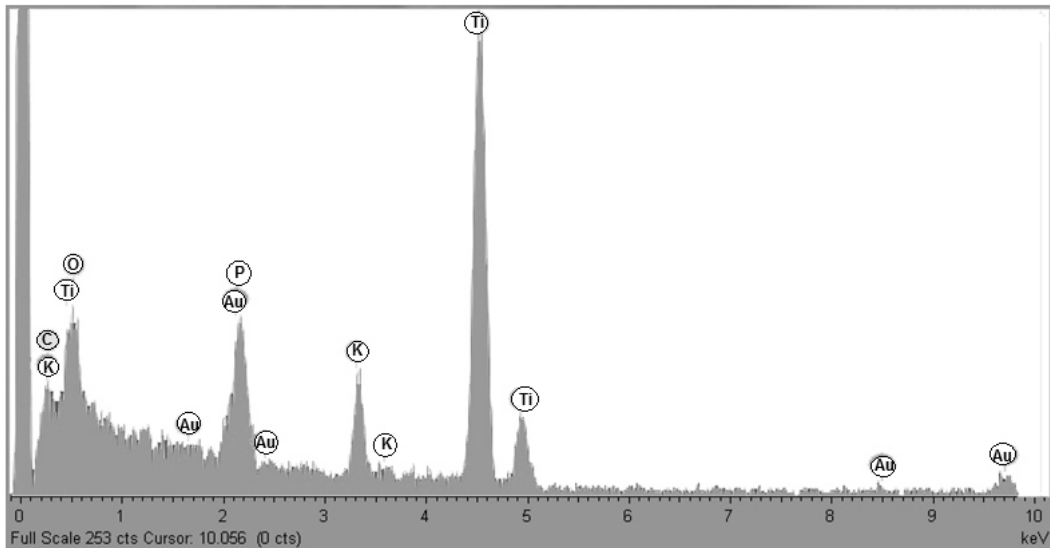


Figura 4.18 - Análise por EDS da matriz NTT/MPA/EDC após imobilização covalente da HRP por ativação dos grupos carboxílicos.

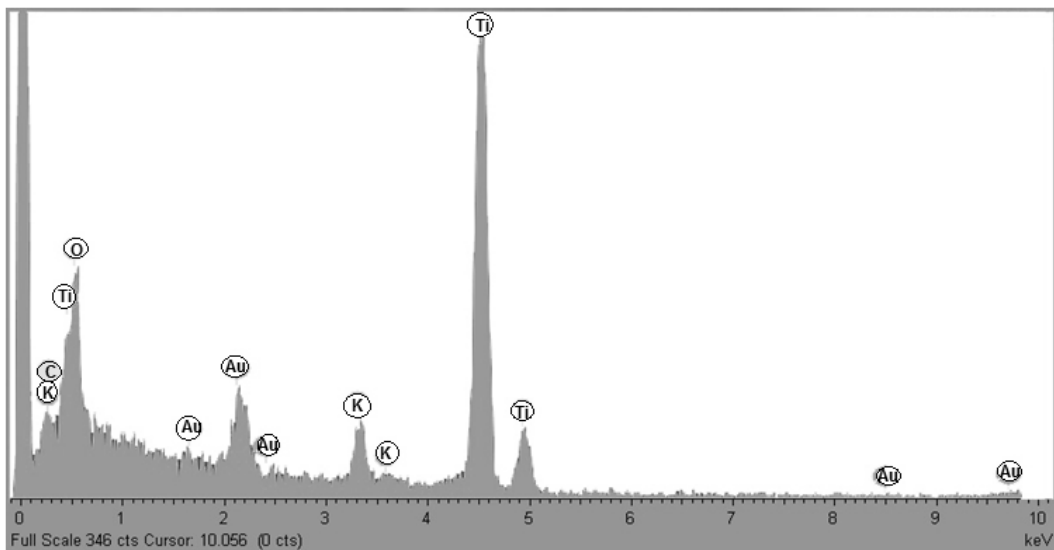


Figura 4.19 - Análise por EDS da matriz NTT/MPA/EDC/NHS após imobilização covalente da HRP por dos grupos carboxílicos.

A quantidade de HRP imobilizada covalentemente na matriz NTT/MPA/EDC foi de $1,71 \pm 0,38$ mg HRP/m² de NTT. Com adição de NHS, a matriz NTT/MPA/EDC/NHS imobilizou cerca de $0,75 \pm 0,04$ mg HRP/m² de NTT.

Para a amostra de NTT/MPA/EDC/HRP, obteve-se um potencial zeta de $-65,67 \pm 4,47$ mV, e para NTT/MPA/EDC/NHS/HRP, de $-52,41 \pm 0,37$ mV. Relativamente aos valores observados para as matrizes antes da imobilização ($-41,36 \pm 6,25$ mV e $-41,94 \pm 6,62$ mV para NTT/MPA/EDC e NTT/MPA/EDC/NHS, respectivamente), houve um

aumento na carga negativa dos materiais, semelhante ao que foi observado para uma adsorção não-específica da HRP. Estes resultados, aliados aos já apresentados para a análise de FTIR, indicam que a adsorção da HRP parece ter ocorrido por interações não-específicas, e não por ligações covalentes.

Alguns autores descrevem a ocorrência de interações específicas entre os grupos carboxílicos e grupos polares e iônicos da HRP (LEE *et al.*, 2006). Já PATEL *et al.* (1998) afirmam que a camada de grupos carboxílicos na superfície confere um ambiente hidrofóbico e carregado, possibilitando uma interação hidrofóbica ou eletrostática com proteínas. Eles estudaram a adsorção não-específica da catalase em superfícies de ouro com grupos carboxílicos terminais. A presença de grupos carboxílicos na superfície dos NTT aumenta a densidade de carga. Isto contribui favoravelmente para adsorção por afinidade da HRP. Logo, a adsorção não-específica provavelmente também resulta das interações eletrostáticas entre os grupos carboxílicos e a HRP (RISIO e YAN, 2009). A HRP apresenta ponto isoelétrico em torno de 7,2, possibilitando interações eletrostáticas atraentes e um aumento da afinidade de ligação, resultando no que foi observado neste estudo. Adicionalmente, há interações hidrofóbicas entre a enzima e os grupos metileno da cadeia que se liga ao grupo carboxílico terminal (PATEL *et al.*, 1998).

Após a imobilização, foram medidas as atividades residuais para o NTT/MPA/EDC/NHS/HRP e NTT/MPA/EDC/NHS/HRP, que resultaram em 22,49 \pm 7,4% e 5,92 \pm 3,29% respectivamente. As baixas atividades observadas, principalmente na reação com NHS, podem ser devidas ao elevado grau de movimentos que a molécula de proteína apresenta, podendo se ligar de forma não direcionada, impedindo o acesso ao seu sítio ativo (NAKATA *et al.*, 1996). Também, como já citado antes, a alta densidade de grupos carboxílicos aumenta a hidrofobicidade do material. Desta forma, os grupos carboxílicos aumentam consideravelmente a área superficial específica, induzindo a mudanças conformacionais da HRP. Estas observações estão de acordo com pesquisas reportadas na literatura, que demonstram que as interações hidrofóbicas fortes podem causar grandes mudanças conformacionais, levando à inativação e desnaturação (ZOUNGRANA *et al.*, 1997; RISIO e YAN, 2009; RISIO e YAN, 2010).

As matrizes NTT/MPA/EDC tiveram uma maior eficiência na imobilização, quando comparadas às matrizes NTT/MPA/EDC/NHS, que imobilizaram menores quantidades e resultaram em uma atividade residual bem menor. Isto sugere que as

moléculas de enzima, na presença de outras moléculas, tendem a preservar a sua estrutura nativa. Resultados similares foram obtidos por RISIO e YAN (2010) na avaliação da adsorção e inativação da HRP em poliestireno e carbonato de cálcio.

4.5 Imobilização covalente da HRP nos NTT por ativação dos grupos amino.

4.5.1 Caracterização dos NTT funcionalizados

Para a imobilização covalente da HRP na superfície dos NTT, primeiramente a superfície dos nanotubos foram funcionalizadas com grupos NH_2 através da reação com ATPMS, que é um agente de silanização com natureza bifuncional. O ATPMS reage com a superfície formando a ligação $\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$, onde a funcionalidade amino se estende a partir da superfície, fornecendo uma região de ligação com outras moléculas (WHITE e TRIPP, 2000). Como visto anteriormente, os NTT sintetizados têm alta densidade de grupos OH em sua superfície. Desta forma, o ATPMS reage com os grupos OH por dois mecanismos (SOVIC *et al.*, 2011): (i) Formação do 3-aminopropil silanol ($(\text{OH})_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$) pela hidrólise dos grupos metoxi catalisada pela $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_3\text{O}^+$; (ii) Condensação dos grupos OH do 3-aminopropil silanol com os grupos $\text{Ti} - \text{OH}$ da superfície, com conseqüente formação das ligações $\text{Ti} - \text{O} - \text{Si}$.

O espectro FTIR desta etapa é apresentado na Figura 4.20. O espectro relativo aos nanotubos iniciais (Figura 4.20a) apresenta bandas devidas à presença de grupos superficiais OH (banda larga no intervalo de $3500 - 3000 \text{ cm}^{-1}$) (SILVERSTEIN *et al.*, 2006) e à deformação angular dos grupos OH da água (1630 cm^{-1}) (LEE *et al.*, 2007).

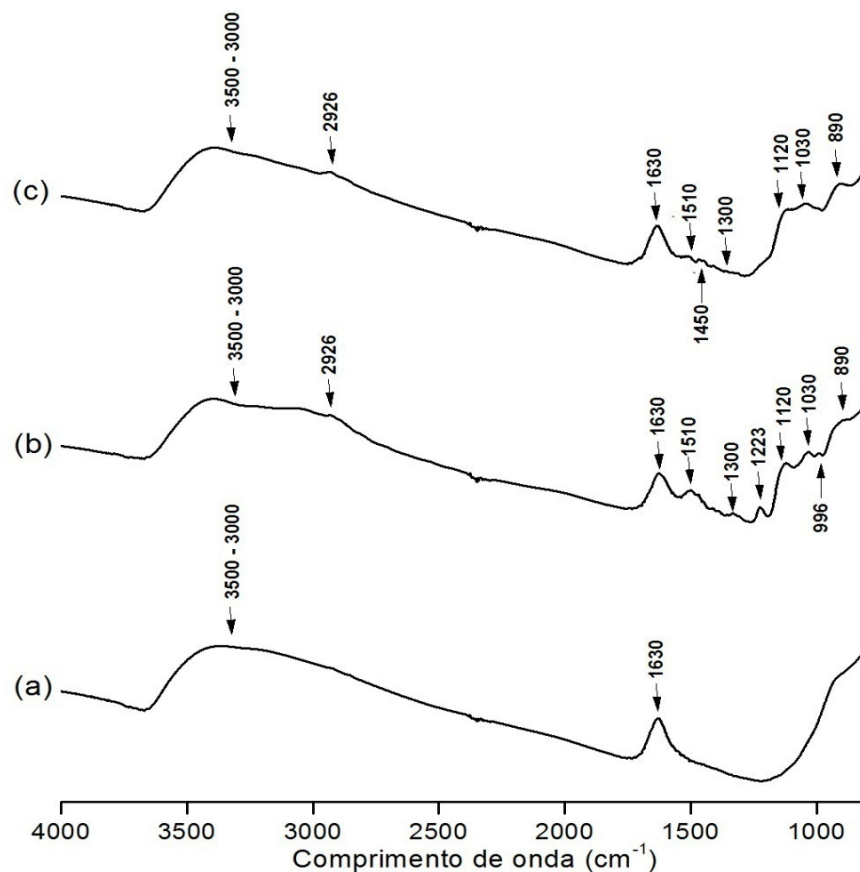


Figura 4.20 - Espectros de absorção no infravermelho dos (a) NTT; (b) NTT/ATPMS; (c) NTT/ATPMS/GLU

Após a reação com ATPMS (NTT/ATPMS), conforme Figura 4.20b, a intensidade das bandas do grupo OH diminui, sugerindo um acoplamento bem sucedido dos grupamentos do ATPMS. Outras bandas também confirmam a silanização da superfície: em 1030 cm^{-1} , devida à ligação Si-O-Ti; em 1120 cm^{-1} , à ligação Si-O-Si; em 996 cm^{-1} , ao deslocamento do H ligado ao modo SiO-H, e em 890 cm^{-1} , atribuída a vibrações Si-OH (SILVERSTEIN *et al.*, 2006; SOVIC *et al.*, 2011; WHITE e TRIPP, 2000). Ao mesmo tempo, surgem bandas fracas em 2926 cm^{-1} , devidas ao estiramento assimétrico O-CH₃ (WHITE e TRIPP, 2006), e na região entre 1400 e 1300 cm^{-1} , devidas aos modos de vibração (deformações angulares, simétrica e assimétrica) das ligações dos grupos metileno (CH₂) (SILVERSTEIN *et al.*, 2006). A presença dos grupos amino (NH₂) pode ser evidenciada pelas bandas em 1510 cm^{-1} , de deformação angular da ligação N-H, e em 1223 cm^{-1} , devida à deformação axial da ligação C-N (SILVERSTEIN *et al.*, 2006; SOVIC *et al.*, 2011).

No espectro © da Figura 4.20, após reação da matriz com glutaraldeído (NTT/ATPMS/GLU), observaram-se absorções semelhantes, mas com variações na

intensidade e aparecimento de novas bandas. O desaparecimento da banda em 1223 cm^{-1} , adiminuição de intensidade da banda em 1510 cm^{-1} , e o aparecimento de uma banda fraca em 1450 cm^{-1} refletem a perda das ligações N-H e o acoplamento da base C=N da matriz formada (SILVERTEIN *et al.*, 2006). A existência da banda em 1630 cm^{-1} , atribuída à deformação angular dos grupos OH da água (SILVERSTEIN *et al.*, 2006), dificulta a comprovação do acoplamento do glutaraldeído feita pela formação de grupamentos amida associados às bandas de estiramento da ligação C=N ($1690 - 1640\text{ cm}^{-1}$). Essas observações estão resumidas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Posições das bandas e atribuições dos espectros de absorção no infravermelho

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Referência
3500 – 3000	OH (estiramento)	SILVERSTEIN <i>et al.</i> , 2006
1630	OH (deformação angular)	LEE <i>et al.</i> , 2007
1030	Si-O-Ti (estiramento)	SOVIC <i>et al.</i> , 2011
1120	Si-O-Si (estiramento)	SOVIC <i>et al.</i> , 2011, WHITE e TRIPP, 2000
890	Si-OH (estiramento)	SOVIC <i>et al.</i> , 2011, WHITE e TRIPP, 2000
996	SiO-H (vibração do H)	WHITE e TRIPP, 2000
2926	O-CH ₃ (estiramento assimétrico)	WHITE e TRIPP, 2000
1400 - 1300	CH ₂ (modos de vibração)	SILVERSTEIN <i>et al.</i> , 2006
1510	N-H (deformação angular)	SILVERSTEIN <i>et al.</i> , 2006, SOVIC <i>et al.</i> , 2011
1223	C-N (deformação axial)	SILVERSTEIN <i>et al.</i> , 2006, SOVIC <i>et al.</i> , 2011
1450	C=N (estiramento)	SILVERSTEIN <i>et al.</i> , 2006, SOVIC <i>et al.</i> , 2011

Na Figura 4.21, são apresentadas as medidas do potencial zeta efetuadas em cada etapa do processo de funcionalização. Após a reação com ATPMS (NTT/ATPMS) é verificada uma inversão de potencial dos NTT para $24,8 \pm 5,2\text{ mV}$. Isto ocorre devido a inserção dos grupos amino, que exibem um pKa (8,8 a 10,9), maior que o pH do meio (7,0), sendo assim protonados na forma NH_3^+ (FUJIMOTO *et al.*, 2002). Após tratamento com glutaraldeído, o potencial zeta da matriz

NTT/ATPMS/GLU continua positivo em $15,55 \pm 6,31$ mV, como esperado já que o grupo aldeído introduzido não modifica substancialmente a carga do material.

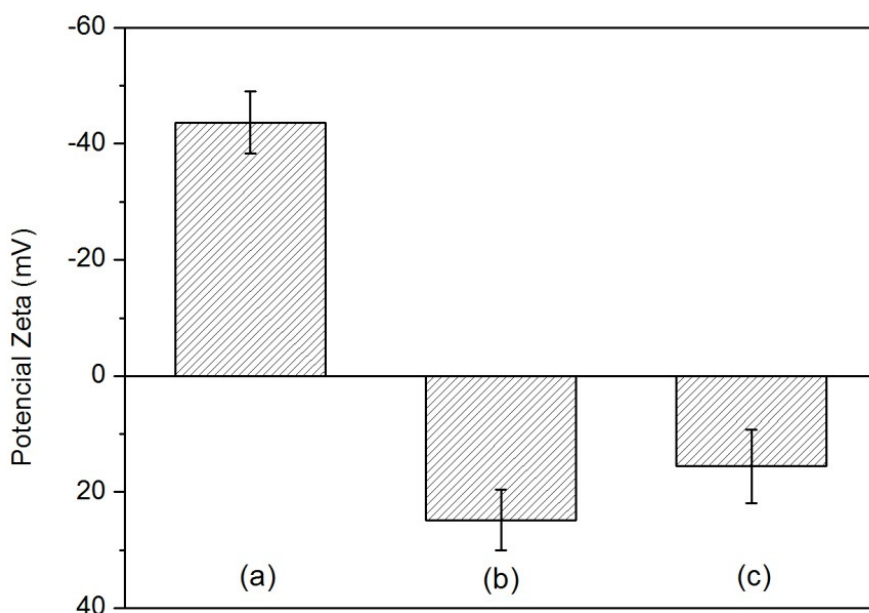


Figura 4.21 - Medidas de potencial zeta do (a) NTT, (b) NTT/ATPMS, (c) NTT/ATPMS/GLU.

Assim, neste trabalho, a metodologia adotada possibilitou um eficiente acoplamento de grupos amino na superfície do NTT em estudos reportados na literatura. LUECHINGER *et al.* (2005) estudando a funcionalização de superfícies de sílica, para aplicação em diversas áreas, observaram que o ATPMS fornece uma excelente âncora para a ativação de terminais amino, resultando numa completa funcionalização da superfície. Também SOVIC *et al.* (2011), com a finalidade de imobilizar covalentemente a HRP, obtiveram sucesso utilizando ATPMS na primeira etapa de funcionalização de NTT.

4.5.2 Isoterma de adsorção da enzima HRP em NTT/ATPMS/GLU.

A terceira etapa na imobilização covalente por ativação dos grupos amino, consiste em manter a enzima HRP em contato com NTT funcionalizados. O tempo de contato necessário entre a enzima e os nanotubos foi avaliado através da determinação da quantidade (porcentagem) de HRP imobilizada e da atividade específica residual (porcentagem), avaliada em função da atividade específica da HRP

livre. A Figura 4.22 apresenta os resultados obtidos e os dados experimentais podem ser visualizados no Anexo H.

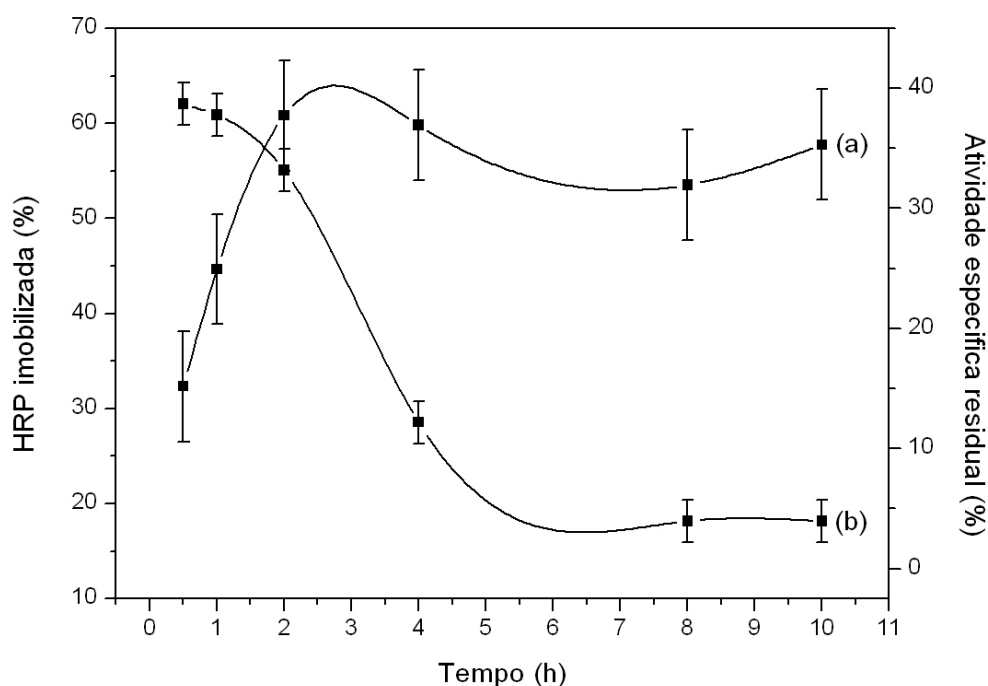


Figura 4.22 - Imobilização covalente por ativação dos grupos amino com avaliação da (a) % HRP imobilizada e (b) % atividade específica residual.

Em relação à eficiência de imobilização da HRP, pode-se observar que já em 30 minutos ocorre o acoplamento covalente da HRP, aumentado até o tempo de 2 horas, partir do qual não ocorrem mudanças significativas, atingindo possivelmente a saturação da superfície. Em relação a atividade residual, observa-se que à medida que se aumenta o tempo de contato, há perdas significativas da atividade. Desta forma, baseado nestes resultados, considerando a alta eficiência na imobilização da HRP e as menores perdas de atividade da enzima, adotou-se o tempo de 2 horas.

O grau de cobertura da HRP, além dos mecanismos de adsorção, pode ser avaliado através da isoterma de adsorção no tempo de 2 horas. Os dados de equilíbrio obtidos foram analisados utilizando o modelo de LF, conforme a Equação 4.2. A isoterma de adsorção da HRP na matriz NTT/ATPMS/GLU, assim como para a isoterma da adsorção não específica, também obedeceu ao modelo LF, conforme pode ser visto na Figura 4.23.

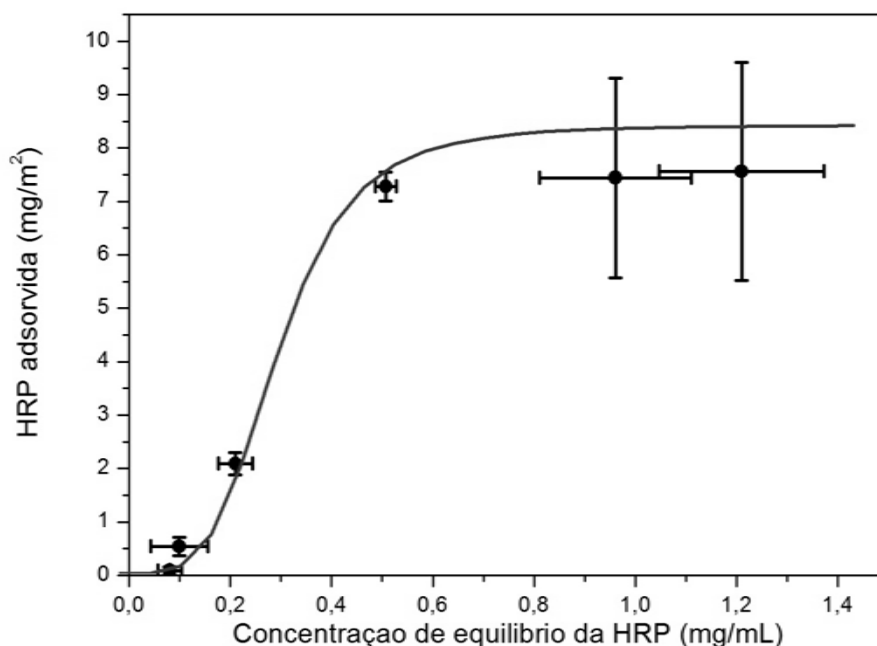


Figura 4.23 – Isoterma de adsorção para HRP immobilizada nos NTT/ATPMS/GLU. Os pontos são referentes aos dados experimentais obtidos, enquanto que a linha sólida é o ajuste do modelo LF.

O coeficiente de regressão ($r^2 = 0,99841$) obtido foi alto, indicando a aplicabilidade desta isoterma. O ajuste da forma não-linear deste modelo foi realizada utilizando o software Statistica® e os parâmetros são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Parâmetros do modelo LF para a isoterma de adsorção para HRP immobilizada nos NTT/ATPMS/GLU.

	Q_m ($\text{mg}_{\text{HRP}}/\text{m}^2_{\text{NTT}}$)	K ($\text{L}/\text{mg}_{\text{HRP}}$)	1/n
Valor estimado	7,577	3,834	4,257
Desvio padrão	0,198	0,217	0,052

O patamar é atingido em $7,564 \pm 2,037 \text{ mg}_{\text{HRP}}/\text{m}^2_{\text{NTT}}$, para concentrações de enzima maiores que $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$. Considerando a massa molar de 44kDa e o diâmetro das moléculas de HRP de 60 \AA , além da constante de Avogadro ($6,023 \times 10^{23} \text{ moléculas mol}^{-1}$), é possível estimar o número de camadas adsorvidas nos NTT/ATPMS/GLU, em cerca de 3 camadas. Ou seja, após a HRP adsorver covalentemente nos NTT funcionalizados, outras moléculas de HRP interagem com estas moléculas, adsorvendo em multicamadas. Como o valor da constante $1/n$ foi maior que 1, a formação de multicamadas é atribuída ao fenômeno de adsorção cooperativa (FAIR e JAMIESON, 1980; FOO e HAMEED, 2010).

4.5.3 Imobilização e atividade residual

A Figura 4.24 apresenta a imagem por MEV dos NTT após imobilização covalente da HRP e a Figura 4.25 mostra a análise por EDS na mesma região.

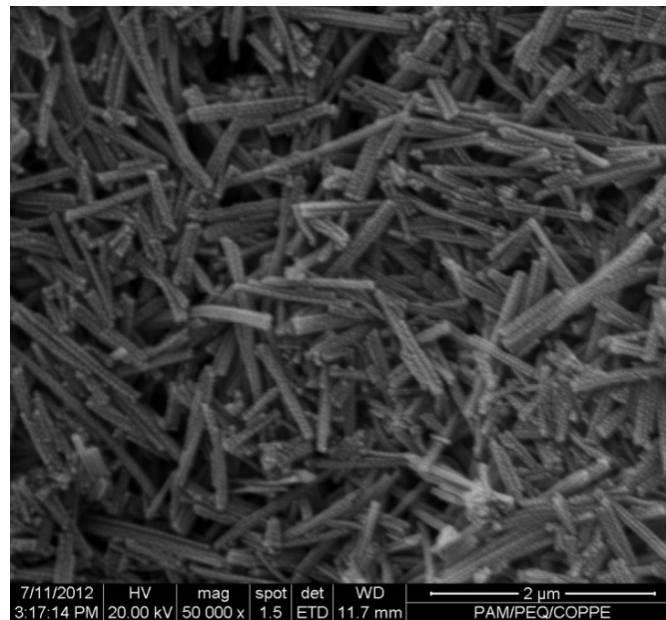


Figura 4.24 - Imagem por MEV da matriz NTT/ATPMS/GLU após imobilização da HRP por ligação covalente por ativação dos grupos amino.

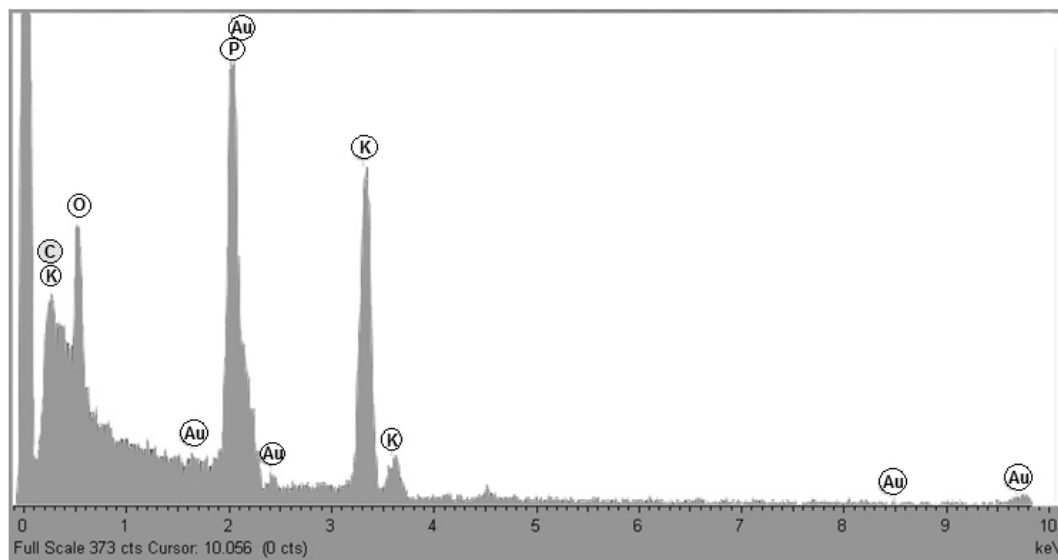


Figura 4.25 - Análise em EDS da matriz NTT/ATPMS/GLU após imobilização da HRP por ligação covalente ativação dos grupos amino.

Comparando a imagem da Figura 4.24 com a Figura 4.1, observa-se que, após a imobilização, os nanotubos apresentam-se mais aglomerados, com diâmetros, aparentemente, maiores. Qualitativamente, é possível observar o aparecimento do pico referente ao elemento carbono, que se deve a HRP imobilizada nos NTT. Os picos dos elementos P e K se devem ao tampão PBS utilizado no procedimento de imobilização.

A quantificação da HRP imobilizada na matriz NTT/ATPMS/GLU resultou em $1,56 \pm 0,18$ mg HRP/m² de matriz, correspondente a uma cobertura de superfície de $2,12 \times 10^{12}$ moléculas por cm². Este valor foi superior aos valores encontrados por SOVIC *et al.* (2011) que utilizaram metodologia similar, empregando 1,4 benzoquinona como agente de acoplamento em vez de glutaraldeído, conseguindo imobilizar 0,209 mg HRP/m² de matriz, correspondendo a $2,858 \times 10^{11}$ moléculas por cm². A cobertura da superfície encontrada é maior do que a relatada para um eletrodo de ouro funcionalizado com ativação de grupos amino em superfícies, ($1,9 \times 10^{12}$ moléculas por cm²) (RADI *et al.*, 2009), e inferior para imobilização em nanocristais de diamante ($7,3 \times 10^{13}$ moléculas por cm²) (WANG *et al.*, 2012b). Estes resultados já mostram indícios da efetividade da metodologia adotada e posterior obtenção de biossensores altamente eficazes.

As moléculas de HRP foram adsorvidas na superfície NTT/ATPMS/GLU através da adição nucleofílica dos grupos NH₂ da enzima (SOVIC *et al.*, 2011). Nas condições especificadas na Seção 4.5.2, a saturação da superfície do nanotubo com HRP ocorreu dentro de 2 horas, indicando uma reação rápida.

Medidas em potencial zeta revelam que, após a imobilização da HRP, este passou de $15,55 \pm 6,31$ mV para $6,92 \pm 3,11$ mV, próximo do potencial zeta da HRP livre ($-9,5 \pm 2,3$ mV), indicando que houve a imobilização da enzima, cobertura da matriz NTT/ATPMS/GLU e conseqüente neutralização parcial das cargas dos NTT funcionalizados.

Como resultado da imobilização covalente, as moléculas de HRP se mantiveram ativas exibindo uma atividade residual de $33,18 \pm 5,15\%$, muito superior às observadas para a imobilização não-específica, viabilizando sua utilização na fabricação dos biossensores. A adsorção covalente permite a enzima se ligar nos NTT de forma ordenada, não comprometendo sua estrutura conformacional natural. Em contraste, em uma adsorção não específica, a enzima tem um elevado grau de

movimentos, sendo observado quase que anulação da sua atividade catalítica (NAKATA *et al.*, 1996). A Tabela 4.7 resume os valores de quantidade de proteína e atividade residual após as quatro estratégias de adsorção empregados.

Tabela 4.7 – Imobilização e Atividade residual da HRP imobilizada pelas técnicas empregadas.

Método	Massa imobilizada (mg_{HRP}/m²_{NTT})	Atividade específica residual (%)
Adsorção não específica	1,70 ± 0,07	2,94 ± 0,43
Ativação dos grupos amino	1,56 ± 0,18	33,18 ± 5,15
Ativação dos grupos carboxílicos (EDC)	1,71 ± 0,38	22,49 ± 7,4
Ativação dos grupos carboxílicos (EDC+NHS)	0,75 ± 0,04	5,92 ± 3,29

4.5.4 Avaliação da imobilização por planejamento experimental

Por ter resultado em uma maior eficiência de imobilização, a ativação de grupos amino foi posteriormente explorada através da estratégia de planejamento de experimentos. A Tabela 4.8 apresenta os resultados de todas as combinações de acordo com o plano fatorial de dois níveis, com triplicata no ponto central.

Desta forma, de acordo com o planejamento experimental detalhado no capítulo 3, as variáveis selecionadas foram: volume de ATPMS, volume de glutaraldeído 2,5% e tempo de contato da HRP com os nanotubos funcionalizados. As variáveis respostas utilizadas para verificar esta influência foram a porcentagem de imobilização e redução da atividade.

Considerando um grau de confiança de 95%, com o auxílio do software Statística[®], observou-se uma alta correlação da atividade residual e a massa imobilizada com o tempo de contato entre a enzima e os nanotubos funcionalizados. Dessa forma, a atividade residual foi função apenas de uma variável de entrada, o tempo. Em relação à massa imobilizada, a variável tempo pode estar mascarando os efeitos das variáveis “volume de ATPMS” e “volume de glutaraldeído”, pois era esperado que estas influenciassem na eficiência de imobilização. Além disso, as variáveis de saída estão diretamente correlacionadas entre si. Ou seja, quanto maior a quantidade de HRP imobilizada, menor a atividade residual.

Tabela 4.8 - Resultados experimentais para o planejamento experimental realizado para a imobilização covalente da HRP na matriz NTT/ATPMS/GLU.

Experimento	Volume de ATPMS (L)	Volume de glutaraldeído (L)	Tempo de contato (min)	Imobilização mg HRP /m ² NTT	erro	Atividade residual (%)	erro
1	0,01	0,05	10	1,108	0,062	31,408	1,180
2	0,01	0,05	120	1,210	0,062	12,439	1,180
3	0,01	1	10	1,091	0,062	34,296	1,180
4	0,01	1	120	1,219	0,062	15,680	1,180
5	0,2	0,05	10	1,074	0,062	28,629	1,180
6	0,2	0,05	120	1,586	0,062	18,334	1,180
7	0,2	1	10	1,151	0,062	35,023	1,180
8	0,2	1	120	1,415	0,062	12,681	1,180
Ponto central	0,105	0,525	65	1,151	0,062	33,049	1,180

MARTINEZ (2011), estudando a influência do glutaraldeído na imobilização de biomoléculas, observou que grandes quantidades de glutaraldeído prejudicaram a atividade da biomolécula e, conseqüente, eficiência do biossensor, provavelmente pela distorção da estrutura da enzima durante a agregação. A insolubilidade e estabilidade geradas pelo reticulador na enzima imobilizada devem resultar num mínimo de distorção na estrutura conformacional, preservando sua atividade biológica.

4.6 Avaliação da estabilidade da HRP imobilizada

No desenvolvimento de um biossensor enzimático deve-se considerar características importantes como tempo de vida útil, durabilidade e estabilidade em condições de estocagem. Desta forma, a atividade específica residual foi monitorada em função do tempo de armazenamento. Os NTT contendo a HRP imobilizada pelos diferentes métodos de imobilização foram armazenados a 8 °C, imersos em solução 0,1 mol L⁻¹ PBS (pH 7,0) e avaliados por 160 dias. A Figura 4.26 mostra os resultados.

A HRP imobilizada por ativação dos grupos amino (NTT/ATPMS/GLU/HRP) mantém quase 20% da sua atividade residual inicial, mesmo após 160 dias de armazenamento quando imobilizada pela estratégia de ativação dos grupos amino. Para as outras estratégias de imobilização por ativação dos grupos carboxílicos, a atividade residual foi de 5,5 % (NTT/MPA/EDC/HRP) e 8,1%

(NTT/MPA/EDC/NHS/HRP). Alterações na estrutura secundária e terciária da enzima ao longo do tempo podem explicar a perda da atividade (SILVA *et al.*, 2007).

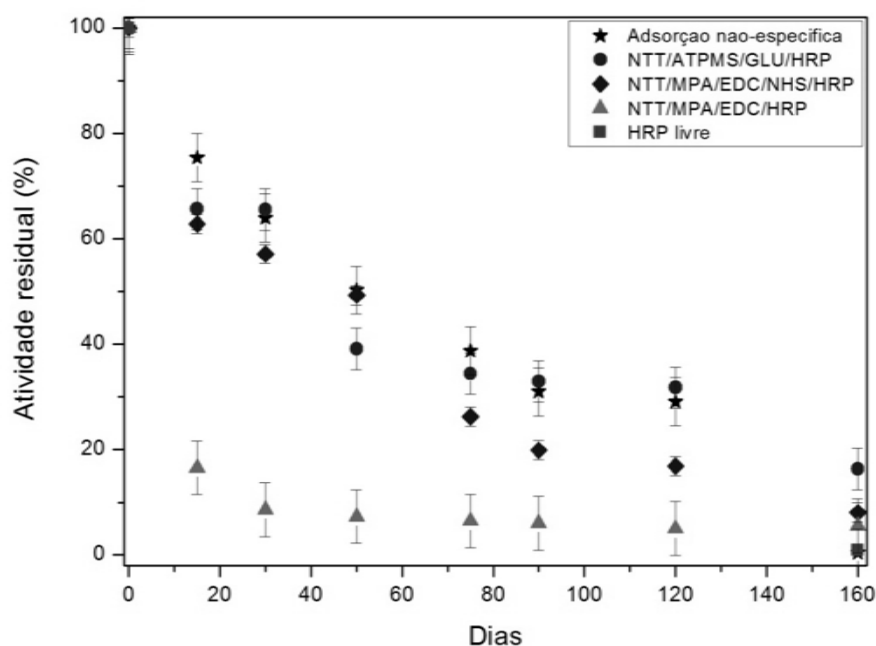


Figura 4.26 - Atividade residual (%) das moléculas de HRP livre e imobilizada pelas estratégias de imobilização não específica, covalente por ativação dos grupos amino (NTT/ATPMS/GLU/HRP) e ativação dos grupos carboxílicos (NTT/MPA/EDC/HRP e NTT/EDC/NHS/HRP) em função do tempo de armazenamento a 4°C e PBS (pH 7,0).

Como comparação, a HRP livre foi armazenada nas mesmas condições que a enzima imobilizada e após 160 dias não apresentou atividade. O mesmo resultado foi obtido para adsorção não-específica. Trabalhos encontrados na literatura apontam para a manutenção da atividade da HRP imobilizada por até 18 dias, quando imobilizada não-especificamente (SILVA *et al.*, 2007), e os resultados obtidos aqui mostram que a HRP imobilizada covalentemente possui estabilidade superior à HRP livre. Isto pode ser explicado pela excelente biocompatibilidade oferecida pelos NTT e estabilidade da ligação covalente.

Testes de dessorção, importantes na avaliação da estabilidade dos biossensores fabricados, foram realizados com a HRP imobilizada, pela técnica de ativação dos grupos amino, nos NTT. A detecção foi realizada pelo método de Bradford e por análise UV-vis na região de absorção da HRP, em 400 nm. Os resultados de dessorção, vistos na Figura 4.27, não apresentaram moléculas de HRP dessorvidas.

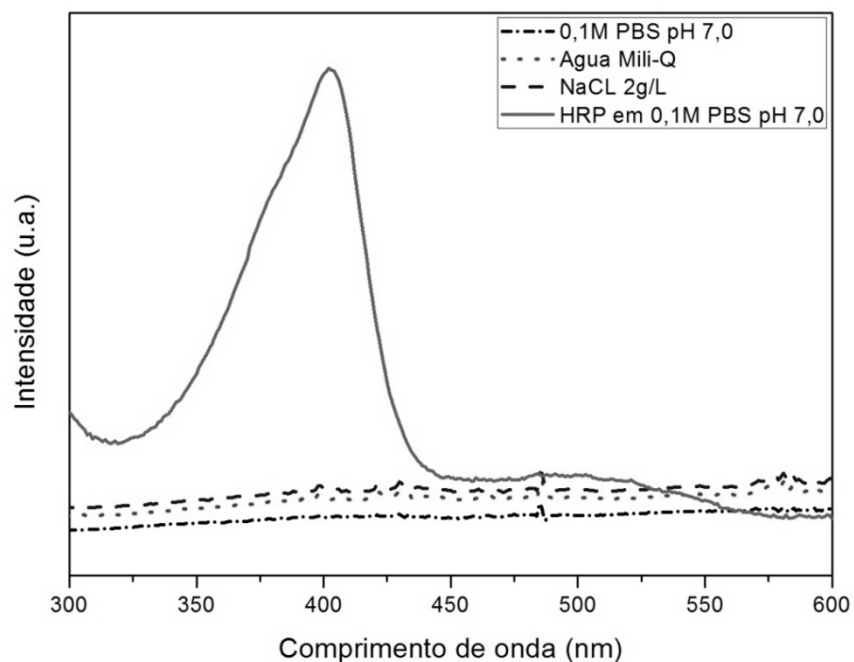


Figura 4.27 - Espectros de absorção no UV-vis do sobrenadante após 5 h de agitação a temperatura ambiente.

Mesmo após 5 horas de contato em diferentes meios, não foi detectado traço de enzima livre, mostrando que a HRP adsorve covalentemente de forma irreversível nos NTT. Isto mostra a estabilidade da ligação entre a enzima e os grupos ativos dos nanotubos de titanato. SILVA *et al.* (2004) também obtiveram resultados similares, sem traços de enzima livre, em testes de dessorção conduzidos a 24°C em solução NaCl 1 mmol L⁻¹, por 24h, para HRP adsorvida em partículas de poli(metilmetacrilato) (PMMA) e carboximetilcelulose (CMC).

Estes resultados mostram que a ligação forte realizada quimicamente por meio de grupos funcionais da enzima, que não sejam essenciais à atividade catalítica, em grupamentos ativos do suporte, evita o processo de dessorção do material biológico. A enzima também apresenta maior estabilidade ao longo do tempo, preservando sua atividade, além de estabilidade em relação aos efeitos de variação de pH, força iônica e do solvente (VELDE *et al.*, 2002). Isto mostra a aplicabilidade e superioridade da metodologia adotada neste estudo, de imobilização por ativação dos grupos amino, para diversas aplicações, dentre elas, o biossensoriamento.

4.7 Avaliação amperométrica do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP

Avaliados os métodos de imobilização da HRP nos NTT, foi possível selecionar a melhor estratégia para fabricação do biossensor. Desta forma, foi escolhido o método de imobilização covalente por ativação dos grupos amino (NTT/ATPMS/GLU/HRP), pelos melhores resultados alcançados de imobilização, estabilidade, ausência de desorção e retenção da atividade.

4.7.1 Caracterização eletroquímica dos NTT

A análise em voltametria cíclica em sistemas como $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ fornece informações importantes para testar a atividade eletroquímica do eletrodo (OJANI *et al.*, 2006). A Figura 4.28 apresenta o perfil voltamétrico do eletrodo de pasta de carbono (EPC) e eletrodo de pasta de carbono modificado com 20% de NTT (EPCNTT). Os voltamogramas cíclicos apresentados mostraram-se *quasi*- reversíveis e simétricos.

O EPCNTT apresentou uma separação de picos ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$) de 90 mV para o par redox $[Fe(CN)_6]^{3-} / [Fe(CN)_6]^{4-}$, mostrando que os NTT melhoram a reversibilidade do sistema quando comparado com EPC, que apresentou um $\Delta E_p = 150$ mV. O EPCNTT apresentou uma sensibilidade muito maior, com aumento das correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) em quase 50%.

A partir dos estudos de voltametria cíclica, utilizando um par redox com comportamento bem estabelecido, foi possível evidenciar que os NTT melhoraram o caráter eletrocatalítico e condutor do eletrodo. Resultados similares foram obtidos para os NTT em outros sistemas, evidenciando o caráter semicondutor do NTT (TOKUDOME e MIYAUCHI, 2005).

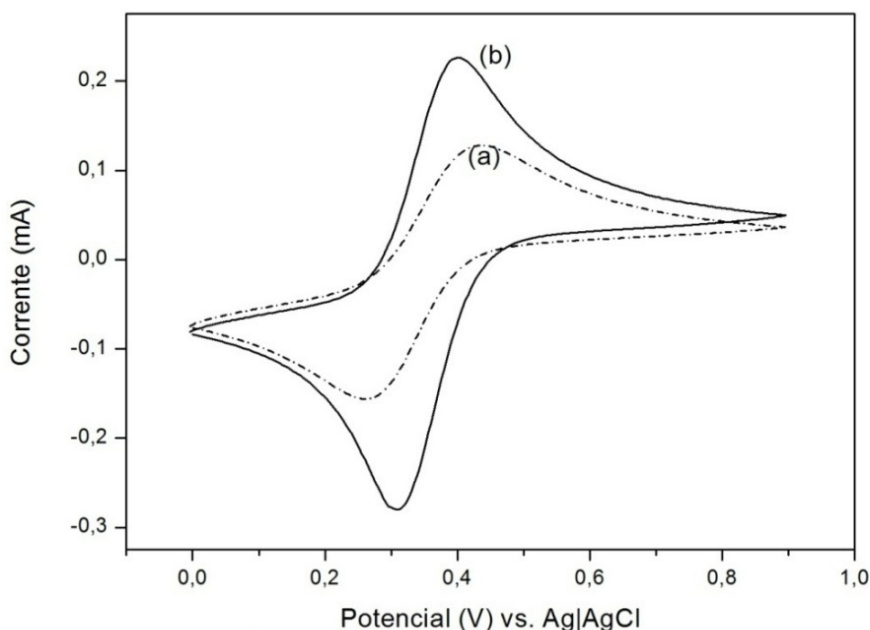


Figura 4.28 – Voltamogramas cíclicos para os eletrodos (a) de pasta de carbono (EPC) e (b) de pasta de carbono modificada com 20% de NTT (EPCNTT), em solução 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ e 0,1 mol L⁻¹ de KCl na velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

4.7.2 Avaliação amperométrica do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP

Com o propósito de estudar a transferência de elétrons da HRP no eletrodo de pasta de carbono modificado com NTT/ATPMS/GLU/HRP (biossensor), a técnica de voltametria cíclica foi empregada. As medições foram realizadas em 0,1 mol L de PBS (pH 7,0) na faixa de potencial de 0 a -0,8 V com velocidade de varredura de 0,1 V/s. Foram também obtidos os voltamogramas cíclicos, mostrados na Figura 4.29, para os eletrodos de pasta de carbono (EPC) e eletrodo de pasta de carbono modificado com 20% de NTT (EPC/NTT).

Para o biossensor, Figura 4.29c, é possível observar o aparecimento de um pico de redução em torno de -0,38 V vs. Ag/AgCl que não foi visto quando utilizados os eletrodos EPC (a) e EPC/NTT (b). Resultados similares foram reportados por ZHANG *et al.* (2007) que realizaram o estudo da transferência de elétrons direta da HRP imobilizada em camadas de nanofolhas de titanato. Seus estudos exibiram um par de picos redox quase reversível com potencial formal de -0,24 V, bem próximo ao encontrado neste trabalho. A separação de picos foi de 89 mV quando a velocidade de varredura era de 0,2 V/s. O E⁰ obtido de -0,290 V se mostrou bem próximo do E⁰

reportado para a HRP livre (HARBURY, 1957). A Tabela 4.9 apresenta valores de E^0 , reportados na literatura, para HRP immobilizada em nanomateriais.

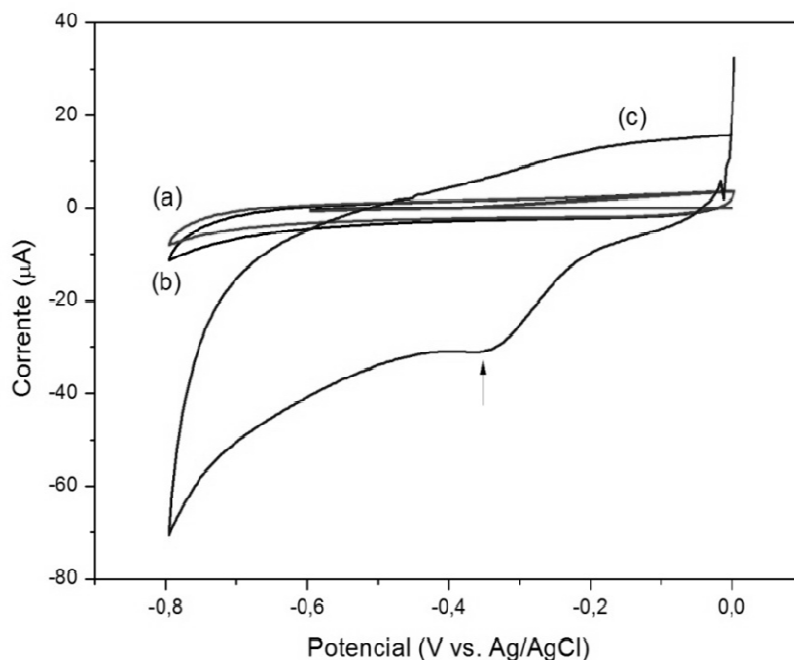


Figura 4.29 – Voltamograma cíclicos do (a) eletrodo de pasta de carbono, (b) eletrodo de pasta de carbono modificado com 20% de NTT e (c) biossensor em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH 7,0), na velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Tabela 4.9 - Valores de potencial formal para a HRP immobilizada em nanomateriais.

Nanomaterial	E^0 (V) vs. Ag/AgCl	Referência
NTT	-0,290	Este estudo
Azida/Au	-0,150	RAN <i>et al.</i> , 2011
NTTiO ₂	-0,166	WU <i>et al.</i> , 2008
NFT	-0,24	ZHANG <i>et al.</i> , 2007
NTC	-0,342	WANG <i>et al.</i> , 2012a
Au/PC	-0,390	LIU e JU, 2001
NPTiO ₂	-0,399	ZHANG <i>et al.</i> , 2004
NpAg/C/NpAu	-0,465	MAO <i>et al.</i> , 2012
NTC	-0,643	ZHAO <i>et al.</i> , 2002

NT= nanotubos; NFT = nanofios de titanato; NTC = nanotubos de carbono; PC = pasta de carbono; Np = nanopartículas.

A mudança do potencial formal sugere a influência específica dos nanomateriais sobre o potencial formal da proteína hemo, além do tipo de imobilização empregada, que afeta diretamente o sítio ativo da HRP, e conseqüentemente seu potencial redox.

Como visto na revisão, os nanomateriais podem ter diferentes interações com a proteína, proporcionando um microambiente diferente, ao qual pode influenciar no seu potencial formal. Podem também alterar a capacitância da camada elétrica dupla através das constantes dielétricas diferentes (ZHANG *et al.*, 2004).

Pela Figura 4.29 observa-se o aparecimento somente de pico de corrente catódica (I_{pc}), e não há surgimento de um pico de corrente anódica (I_{pa}) sugerindo que a HRP immobilizada nos NTT sofre uma reação eletroquímica irreversível, similar a resultados observados na literatura (WU *et al.*, 2008). Estes resultados mostram que a HRP foi bem immobilizada nos NTT e sua atividade foi conservada.

O efeito das velocidades de varredura foi investigado pela técnica de voltametria cíclica. A Figura 4.30 apresenta o voltamograma cíclico da medida realizada utilizando o biossensor em PBS (pH 7,0) variando as velocidades de varredura de 50 a 400 mV/s. A Tabela 4.10 apresenta os valores de I_{pc} e I_{pa} obtidos e a Figura 4.31 mostra a dependência linear da corrente de pico (I_p) com a velocidade de varredura, baseada na Equação de Randles-Sevcik, conforme Equação 4.4.

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad \text{Equação 4.3}$$

onde n é o número de elétrons, A é a área do eletrodo (cm^2), C é a concentração (mol/cm^3), D é o coeficiente de difusão (cm^2/s), e v é a velocidade de varredura do potencial (V/s) (WANG, 2000).

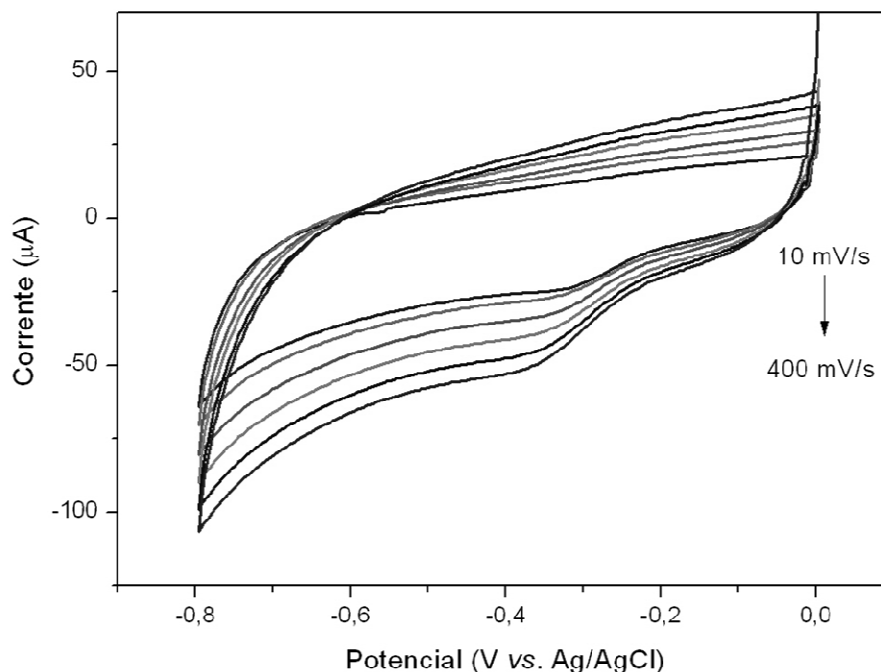


Figura 4.30 – Voltamograma cíclico da influência da velocidade de varredura utilizando o biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP em 0,1M PBS (pH 7,0).

Tabela 4.10 – Valores da corrente de pico catódico em função da velocidade de varredura.

Scan	I_{pc} (μA)
0,01	-23,591
0,05	-26,044
0,1	-32,893
0,2	-39,40
0,3	-47,046
0,4	-51,497

Como pode ser visto na Figura 4.31, em velocidades de varredura mais baixas, não existe uma relação linear entre I_{pc} e $v^{1/2}$. Mas a partir da velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , já começa a existir esta relação linear. Estes resultados sugerem que o processo é controlado pela reação na superfície do eletrodo, ou pela difusão, conforme processo irreversível, também observado em outros trabalhos na literatura para a HRP imobilizada em nanomateriais (LI *et al.*, 2011, KAFI *et al.*, 2008, RAN *et al.*, 2011), e também empregando a hemoglobina (Hb), outra hemo proteína (KAFI *et al.*, 2011).

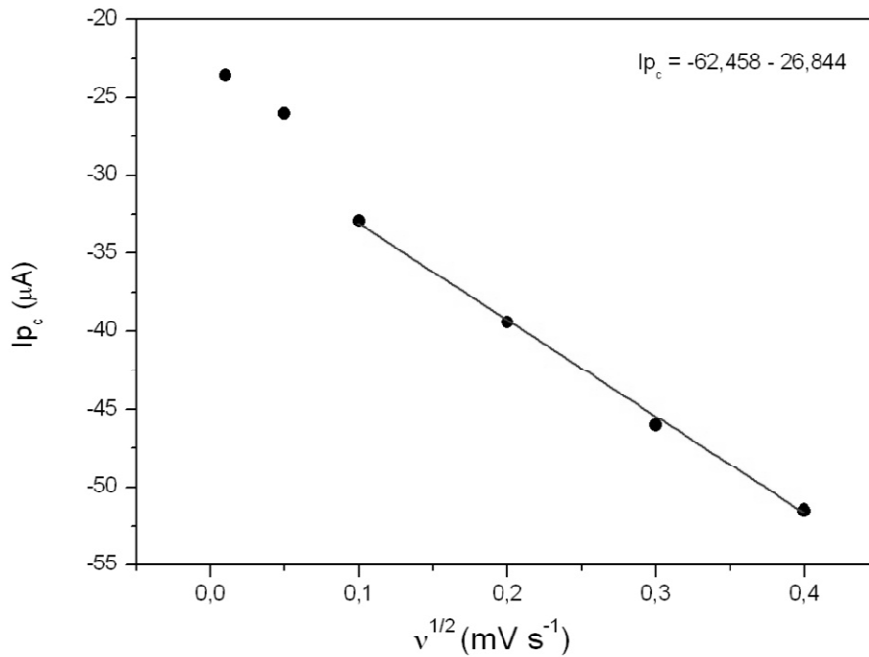


Figura 4.31 - Relação entre o pico catódico e as velocidades de varredura baseados na Equação de Randles-Sevcik.

É interessante também avaliar o número de elétrons transferidos na reação eletroquímica, de acordo com a Equação de Laviron (Equação 4.5) (LAVIRON, 1979).

$$I_p = \frac{nFQv}{4RT}$$

Equação 4.4

Na Equação 4.5, n é o número de elétrons transferidos, Q é quantidade de carga (Coulomb), F é a constante de Faraday (96500 coulomb/mol), R é a constante dos gases e T é a temperatura (K). Desta forma, n pode ser calculado pelo coeficiente angular da curva de I_p vs. velocidade de varredura ($v^{1/2}$). A integração do pico de redução da HRP dá a quantidade de carga (Q) que passou através do eletrodo, de forma muito aproximada. Assim, n foi estimado em 1 elétron. Este valor também foi encontrado para a HRP imobilizada em nanotubos de TiO_2 (WU *et al.*, 2008).

Para sistemas irreversíveis, baseado na Equação de Laviron (LAVIRON, 1979), a taxa de transferência de elétrons, k_s , pode ser estimada pela Equação 4.6.

$$\log k_s = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log \frac{RT}{nFv} - \frac{(1 - \alpha)nF\Delta E_p}{2,3RT}$$

Equação 4.5

Onde α é o coeficiente de transferência que pode ser assumido para 0,5, pois há transferência de apenas 1 elétron entre a HRP e o eletrodo (LI *et al.*, 2011). Desta forma, o k_s foi estimado em $3,5 \text{ s}^{-1}$ (25°C), que é maior que alguns resultados encontrados para transferência eletrônica direta da HRP imobilizada em nanomateriais, conforme listados na Tabela 4.11. Isto sugere que os NTT fornecem um microambiente que facilita a transferência eletrônica entre a HRP e o eletrodo, e se mostra bem superior a muitos nanomateriais propostos.

Tabela 4.11 - Valores de taxa de transferência de elétrons para a HRP imobilizada em diferentes materiais.

Material	$k_s \text{ (s}^{-1}\text{)}$	Referência
NTT	3,5	Este estudo
Grafite	0,66	RUZGAS <i>et al.</i> , 1995
NpAu	0,974	LI <i>et al.</i> , 2009
Azida/Au	1,11	RAN <i>et al.</i> , 2011
NTC	2,48	ZHAO <i>et al.</i> , 2002
NTTiO ₂	3,82	WU <i>et al.</i> , 2008
Nafion/Grafeno	4,63	LI <i>et al.</i> , 2011
Au	6,04	LIU e JU, 2001

Np = nanopartículas; NTC = nanotubos de carbono; NT = nanotubos; PC = pasta de carbono.

Segundo KAFI *et al.* (2008), estes resultados mostram que: (i) o pico redox surge a partir da reação eletroquímica da HRP imobilizada, (ii) este processo redox é quase reversível e controlado na superfície, (iii) transferência eletrônica direta ocorre entre a HRP imobilizada e o eletrodo, (iv) o nanotubo de titanato proporciona uma boa matriz para imobilização da HRP e fabricação de biossensor.

4.7.3 Propriedades eletrocatalíticas do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP para redução do H₂O₂.

As propriedades do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP para a redução do H₂O₂ foram estudadas através das técnicas de voltametria cíclica e voltametria linear. A Figura 4.32 apresenta o voltamograma cíclico para o biossensor registrado em solução 0,1 mol L⁻¹ de PBS (pH 7,0) em ausência (a) e em presença (b) de $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de H₂O₂ na velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Com H₂O₂, o pico de redução em -

0,38 V aumentou significativamente, demonstrando que a a redução catalítica do H_2O_2 tem origem na HRP imobilizada (KAFI *et al.*, 2008).

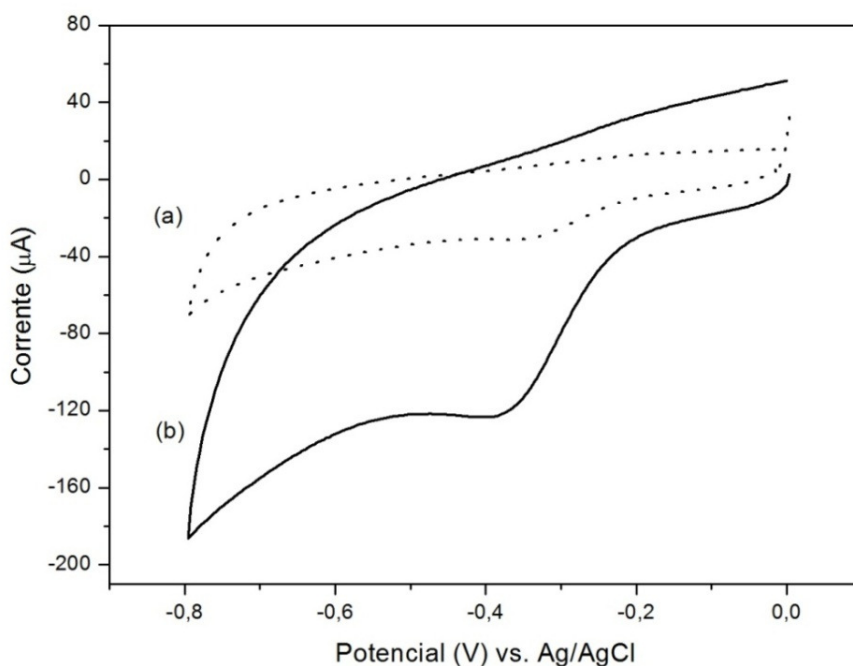


Figura 4.32 – Voltamograma cíclico para o biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP na (a) ausência e (b) presença de $3 \times 10^{-3} M H_2O_2$ em 0,1 M PBS (pH 7,0) na velocidade de varredura de 100mV/s.

De acordo com a Figura 4.33, com o auxílio da técnica de voltametria linear, é possível observar a variação da corrente em função da concentração de H_2O_2 , principalmente a corrente de pico de redução que aumenta significativamente com a concentração de H_2O_2 , indicando que a HRP imobilizada reteve sua atividade bioeletrocatalítica para a redução do H_2O_2 (LI *et al.*, 2011). Ao mesmo tempo, os picos são deslocados para potenciais mais negativos, sugerindo que há a formação de algum novo composto durante o processo redox, como intermediários do processo eletrocatalítico da HRP (RUZGAS *et al.*, 1996).

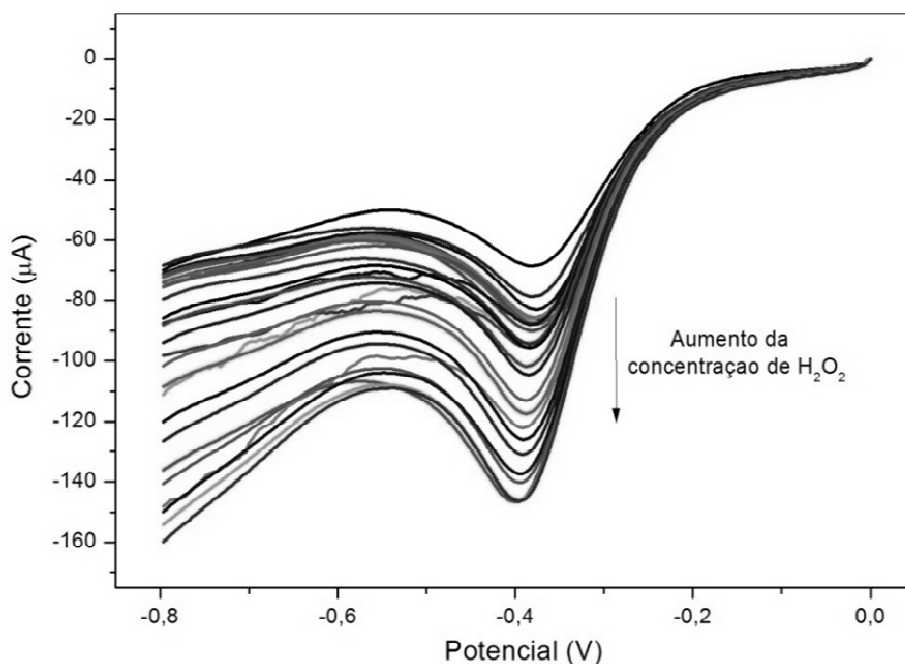
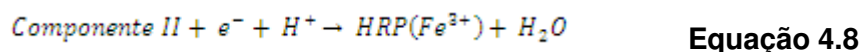
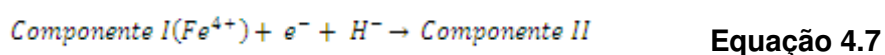
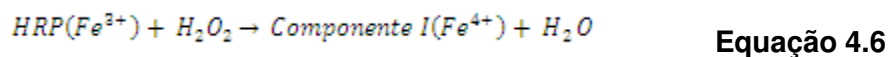


Figura 4.33 – Voltamograma linear do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP em solução 0,1 M PBS (pH 7,0) contendo H₂O₂ na velocidade de varredura de 100 mV/s.

Desta forma, o processo eletrocatalítico é proposto por muitos autores (LI *et al.*, 2011; KAFI *et al.*, 2008; WEI *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2006) da forma apresentada nas Equações 4.7 a 4.9.



A HRP reage com o H₂O₂ para formar o composto I intermediário, que é uma forma oxidada contendo hemo oxiferrico e um cátion radical π porfirina. O componente I tem atividade catalítica e o radical porfirina ganha um elétron do eletrodo para formar um outro composto II intermediário, que é posteriormente reduzido de volta para HRP nativa (KAFI *et al.*, 2008).

4.7.4 Influência do pH

O efeito do pH da solução também foi investigado, avaliando-se os pH 6, 7 e 8, conforme apresentados na Figura 4.34. Observaram-se voltamogramas cíclicos irreversíveis em que os potenciais catódicos, conforme os picos, não mudaram com o pH. Mas, pode-se perceber que as correntes redox da HRP são dependentes do pH da solução.

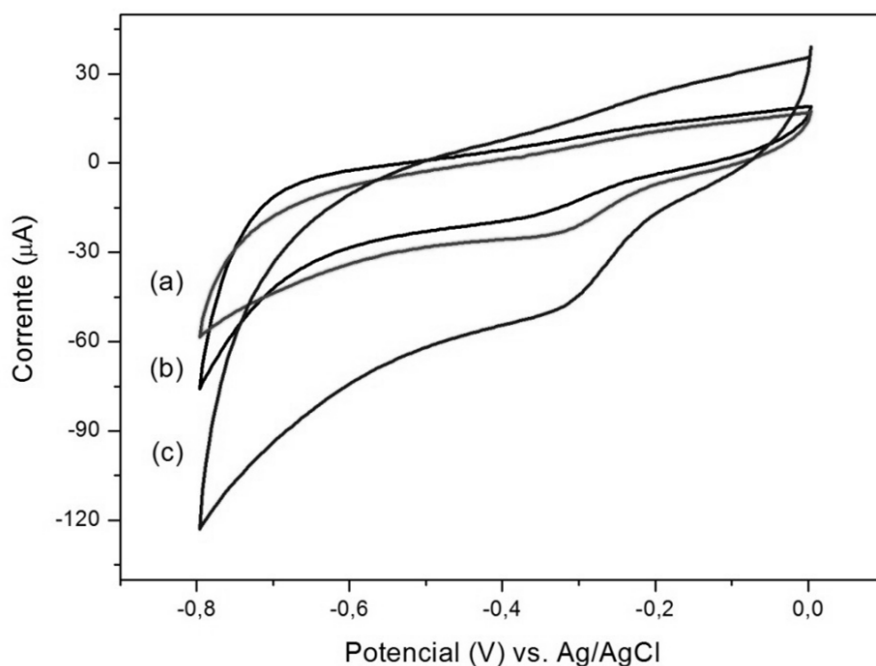


Figura 4.34 – Voltamograma cíclico do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP em solução 0,1 M PBS em pH (a) 6,0, (b) 8,0 e (c) 7,0, contendo $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ na velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

O resultado apresentado na Figura 4.35, indica que o pH ótimo foi 7,0 refletindo as condições de pH ótimo para a HRP, onde foi obtido o maior valor de corrente catódica. A diminuição da corrente em meios mais ácidos é atribuída à perda de cátions de cálcio e à distribuição da rede de ligações de hidrogênio em torno do grupo hemo, resultando na sua liberação, com inativação da enzima. A elevada concentração de H^+ promove a protonação dos grupos amina diminuindo a reação entre a HRP e a superfície do eletrodo e afetando a taxa de transferência de elétrons. Em pH mais alto, as formas não-protonadas da enzima predomina, complicando a formação do complexo enzima-substrato(KOZAN *et al.*, 2007,FERAPONTOVA e GORTON, 2001). Estes valores de pH ótimo estão de acordo com a literatura para biossensores com HRP imobilizada em nanotubos de TiO_2 (WU *et al.*, 2008),

nanotubos de TiO_2 e nanopartículas de Au (KAFI *et al.*, 2008) e nanotubos de carbono (WANG *et al.*, 2012a).

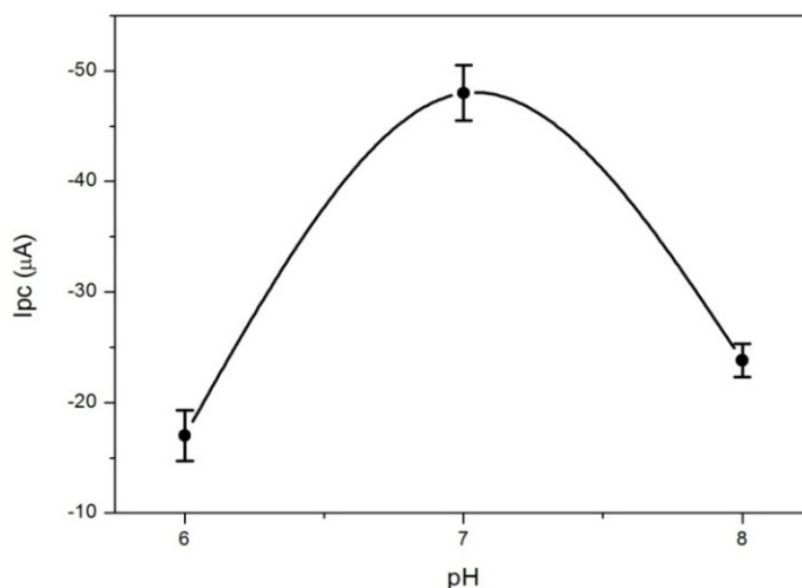


Figura 4.35 - Avaliação do melhor pH para o biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP. Correntes de pico das respostas voltamétricas em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS contendo $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ na velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

4.7.5 Características analíticas

Como visto nas medidas com voltametria cíclica, o potencial de redução do H_2O_2 utilizando o biossensor proposto, foi em torno de $-0,38 \text{ V}$ em pH 7,0. Desta forma, utilizando as condições ótimas, experimentos amperométricos foram realizados para avaliar a sensibilidade e linearidade da resposta ao H_2O_2 do biossensor proposto. Utilizando a técnica amperométrica de cronoamperometria, no potencial de $-0,38 \text{ V}$, foi possível avaliar a resposta do biossensor a sucessivas adições de $50 \mu\text{L}$ de uma solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 , conforme Figura 4.36.

O biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP apresentou resposta linear na faixa de $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $6,76 \text{ mmol L}^{-1}$, com coeficiente de correlação de 0,99, de acordo com a curva de calibração da Figura 4.37. Desta forma, foi possível calcular um limite de detecção (LD) de $27,245 \pm 0,012 \mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de quantificação (LQ) de $27,197 \pm 0,012 \mu\text{mol L}^{-1}$. O limite de detecção se apresentou baixo, como pode ser observado na Tabela 4.12, na mesma ordem de grandeza, quando comparado aos resultados encontrados para o desempenho de biossensores para detecção do peróxido de

hidrogênio reportados na literatura. Mas ainda são necessários testes do biossensor em concentrações mais baixas de peróxido de hidrogênio, como forma de aprimorar a técnica cronoamperométrica para determinação da curva de calibração, e verificar uma sensibilidade ainda maior para o biossensor proposto.

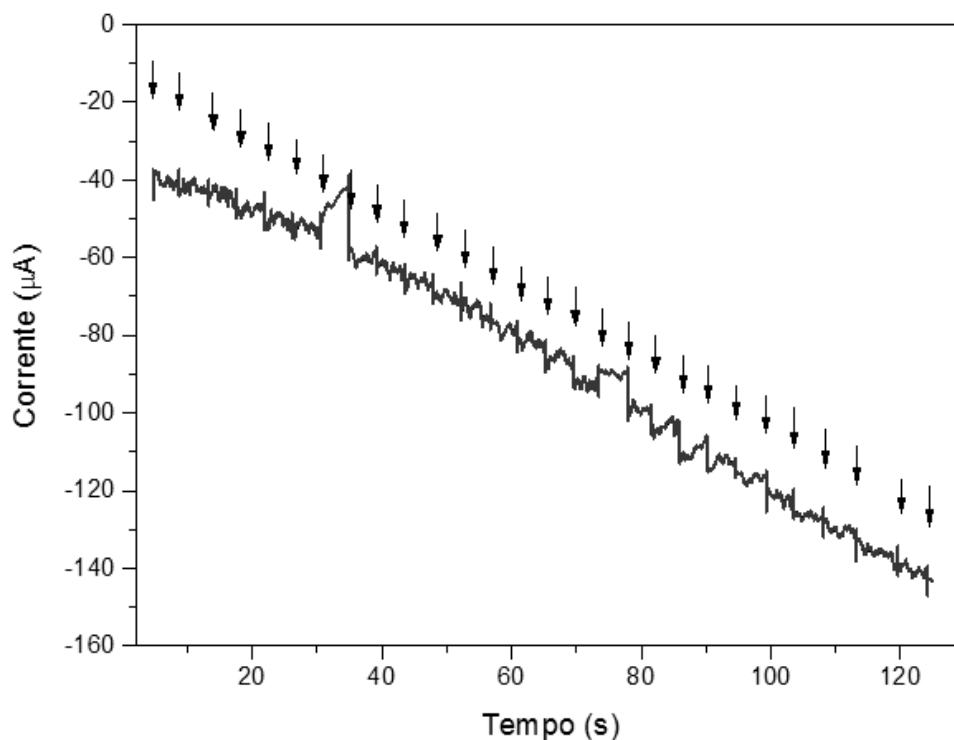


Figura 4.36 - Resposta cronoamperométrica do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP com o potencial de -0,38 V vs. Ag/AgCl em solução 0,1 mol L⁻¹ de PBS com sucessivas adições de 40 µL de H₂O₂. As setas indicam o momento da adição de H₂O₂.

Para o estudo da reprodutibilidade foram utilizados três biossensores preparados independentemente, e realizadas medidas em voltametria cíclica em uma solução contendo 3×10^{-5} mol L⁻¹ de H₂O₂ em 0,1 mol L⁻¹ de PBS (pH 7,0). Os resultados mostraram que o biossensor foi bem reprodutível, apresentando um desvio padrão relativo de 3,70%. Estes valores são muito próximos aos biossensores encontrados na literatura, como 3,1% (KAFI *et al.*, 2011), 5% (WEI *et al.*, 2011) e 2,8% (LI *et al.*, 2011). Quanto à repetibilidade, esta foi realizada também utilizando a voltametria cíclica, com dez (10) medidas sucessivas em uma solução 3×10^{-5} mol L⁻¹ de H₂O₂ em 0,1 mol L⁻¹ de PBS (pH 7,0). Sua performance exibiu uma repetibilidade com desvio padrão relativo de 9,37%. Os resultados estão apresentados no Anexo I.

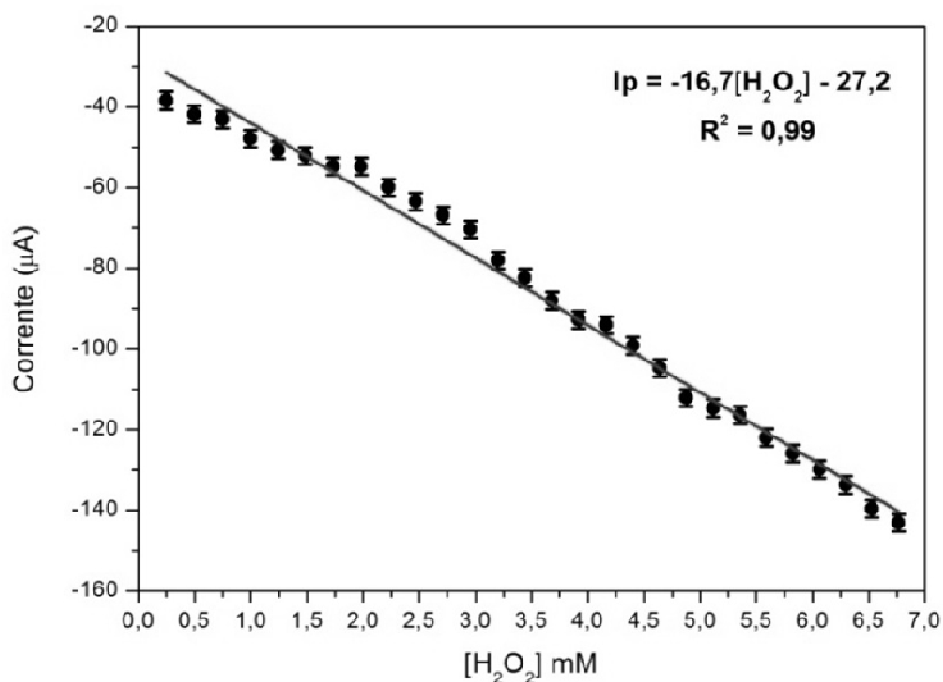


Figura 4.37 - Curva de calibração do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP. Relação entre corrente e concentração de H₂O₂.

A estabilidade do biossensor também foi avaliada. O biossensor preparado foi estocado em solução 0,1 mol L⁻¹ de PBS (pH 7,0) a 4 °C, quando não em uso. Por voltametria cíclica, foi avaliada a sua resposta em solução 3 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de H₂O₂ com 0,1 mol L⁻¹ de PBS (pH 7,0). O biossensor reteve 91% de sua corrente catódica inicial por 30 dias, conforme Figura 4.38.

Na Tabela 4.12, pode-se avaliar a estabilidade da resposta para detecção do H₂O₂ de biossensores encontrados na literatura. Pela comparação apresentada, observa-se que o biossensor proposto nesse trabalho apresenta excelente estabilidade. Esta estabilidade pode ser atribuída às condições de imobilização da HRP nos NTT, que geram um microambiente favorável, como visto na seção 4.6, mantendo a atividade e não desorvendo durante a armazenagem e a medição.

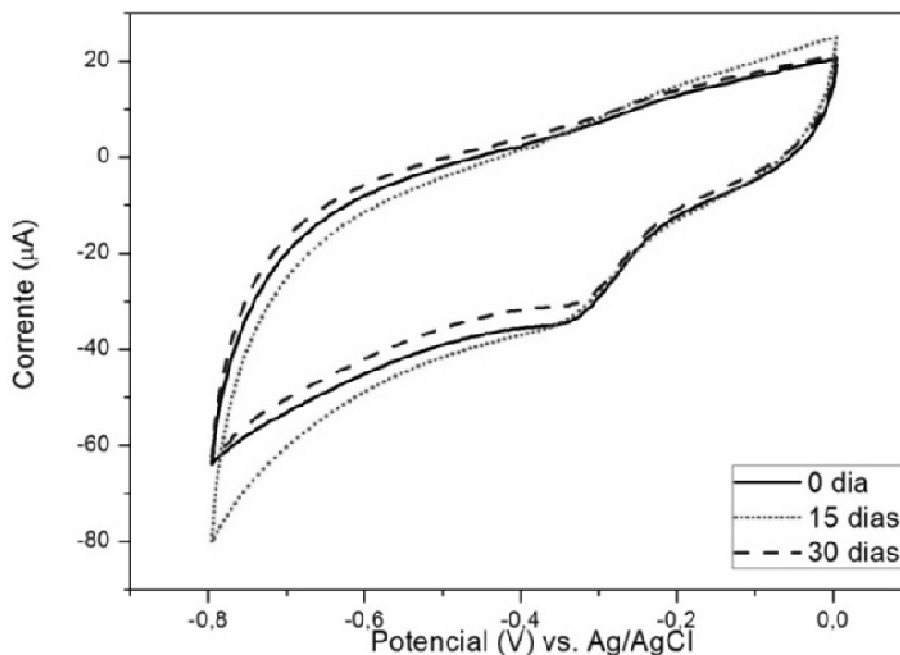


Figura 4.38 – Voltamograma cíclico da avaliação da estabilidade do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP armazenado a 4°C em solução 0,1 mol L⁻¹ PBS (pH 7,0). As medidas foram realizadas em solução 3 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de H₂O₂ em 0,1M de PBS (pH 7,0).

A Tabela 4.12 compara o desempenho do biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP proposto neste trabalho para detecção do peróxido de hidrogênio com biossensores reportados na literatura. Observa-se que para este trabalho, foi alcançado baixo potencial de redução do peróxido de hidrogênio, favorecendo a sensibilidade do biossensor, e seu emprego em amostras reais.

A constante de Michaelis-Menten aparente () reflete a afinidade enzimática da HRP imobilizada pelo H₂O₂. Esta constante pode ser obtida, utilizando os dados de medida da curva de calibração. As constantes podem ser obtidas pela versão eletroquímica da Equação 4.10, de Lineweaver-Burk (KAMIN e WILSON, 1980),

$$\frac{1}{i} = \left(\frac{K_m}{i_{máx}}\right) \left(\frac{1}{C}\right) + \frac{1}{i_{máx}}$$

Equação 4.9

onde i é a corrente no estado estacionário, após adição do substrato, C é a concentração do substrato e $i_{máx}$ é a corrente máxima medida na saturação com o saturado.

Tabela 4.12 – Comparação da performance de vários biossensores amperométricos para detecção do peróxido de hidrogênio.

Biossensor	Potencial (V vs. Ag/AgCl)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Range ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Estabilidade	Referência
NTT/ATPMS/GLU/HRP	-0,35V	27,245	250 a 6750	91% (30 dias)	Este estudo
HRP/NTC	0	0,5	0,5 - 1050	95% (15 dias)	CAO <i>et al.</i> , 2008
PC/HRP	-0,15V	40	200 - 3400	90 dias	KOZAN <i>et al.</i> , 2007
HRP/NpAu/SPAN	-0,15V	1,6	10 - 2000	95% (15 dias)	CHEN <i>et al.</i> , 2011
HRP/TiO ₂	-0,166	0,1	50 - 1000	96% (7 dias)	WU <i>et al.</i> , 2008
Mb/NTT	-0,3	0,6	2 - 160	-	LIU <i>et al.</i> , 2006
Cat/NTC	-0,3	1	10 - 100	-	SALIMI <i>et al.</i> , 2005
HRP/filme titanato	-0,35V	0,7	2,1 - 185	90% (30 dias)	ZHANG <i>et al.</i> , 2007
HRP/NTTiO ₂	-0,36V	-	0,1 - 11200	60% (15 dias)	XIAO <i>et al.</i> , 2011
Ti/TiO ₂ /NpAu/MB/HRP	-0,6V	2	5 - 400	95% (21 dias)	KAFI <i>et al.</i> , 2008
HRP/NpAu/NTT	-0,4	2,1	5 -1000	90% (10 dias)	LIU <i>et al.</i> , 2012
HRP/NpAu	-0,4	0,4	5 - 1400	94% (20dias)	XU <i>et al.</i> , 2006
Nafion/HRP/Grafeno/EGC	-0,4V	0,11	0,33 - 14	97% (30 dias)	LI <i>et al.</i> , 2011
HRP/NpTiO ₂	-0,52	0,6	50 -1000	90% (50 dias)	WEI <i>et al.</i> , 2011
HRP/NFC	0,65V	10	0,18 – 1,42	90% (15 dias)	LI <i>et al.</i> , 2007

NpAu = nanopartículas de Au; MB = mediador azul de metileno; EGC = eletrodo de carbono vítreo; PC = pasta de carbono; NT = nanotubos; NFC = nanofios de carbono; Mb = mioglobina; NTC = nanotubos de carbono; Cat = catalase; Span = nanofibras de polianilina.

O valor de k_m^{ap} encontrado para o biossensor foi de 1,83 mM, ao qual é menor que alguns valores encontrados na literatura, conforme Tabela 4.13.

Tabela 4.13 - Valores de constantes de Michaelis-Menten aparente para biossensores para detecção do peróxido de hidrogênio baseados em HRP.

Biossensor	K_m^{ap} (mmol L ⁻¹)	Referência
ATPMS/GLU/HRP	1,8	Este estudo
Filme de titanato	0,31	ZHANG <i>et al.</i> , 2007
NpAu	0,57	XU <i>et al.</i> , 2006
TiO ₂	1,9	WU <i>et al.</i> , 2008
NpAu/Span	2,21	CHEN <i>et al.</i> , 2011
NTC	4,04	CAO <i>et al.</i> , 2008
PC	8,9	KOZAN <i>et al.</i> , 2007

NpAu = nanopartículas de ouro; PC = pasta de carbono; Span = nanofibras de polianilina; NTC = nanotubos de carbono.

Observa-se que K_m^{ap} obtido se assemelha muito para os biossensores que utilizam nanotubos de TiO₂. O K_m^{ap} encontrado é maior do que o K_m da HRP livre encontrado neste trabalho (0,769 ± 0,247). A HRP perde parte de sua atividade ao ser imobilizada e a redução na afinidade reflete isto. Porém, este fato não comprometeu a eficiência do biossensor para detecção do H₂O₂, indicando que o emprego de NTT é ainda mais vantajoso que o emprego de NTC e NpAu, por exemplo.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

Nanotubos de titanato (NTT) protônicos sem presença de sódio, com pureza superior a 99%, foram produzidos de forma controlada e reprodutível, e se mostraram adequados à imobilização da enzima peroxidase (HRP). As matrizes de NTT apresentaram grande área específica, e oferecem um ambiente biocompatível para a imobilização da HRP.

A enzima peroxidase HRP livre apresentou atividade máxima entre pH 6,0 e 8,0. A cinética da reação enzimática em presença de H_2O_2 foi bem descrita pelo modelo de Michaelis-Menten. A adsorção não-específica da enzima HRP nos NTT foi ajustada pelo modelo de Langmuir-Freundlich, sugerindo a formação de multicamadas, atribuída ao fenômeno de adsorção cooperativa. No entanto, a atividade enzimática residual foi desprezível, justificada pelo elevado grau de movimentos e múltiplas ligações em seu sítio ativo, o que afeta sua estrutura ocasionando desnaturação.

A funcionalização dos NTT com grupos carboxílicos foi atingida, mas não houve aparente reação com os agentes de acoplamento EDC e NHS, provavelmente por um impedimento estérico pelos grupos carboxílicos, que limitariam a reação com EDC e NHS. Os resultados da caracterização eletrocinética sugerem que a adsorção da enzima HRP ocorreu por interações não-específicas, tendo havido perdas significativas da atividade enzimática.

A estratégia de imobilização covalente por ativação dos grupos amino mostrou-se bastante eficiente, com inserção dos grupos funcionais desejados, resultando em grandes quantidades de HRP imobilizadas. Pelo ajuste da isoterma experimental com o modelo de Langmuir-Freundlich, propõe-se que houve formação de multicamadas. Acredita-se que ocorre formação de uma primeira camada por ligação covalente da HRP e em seguida, por adsorção cooperativa, com interações intermoleculares com as moléculas já imobilizadas. Nesta imobilização foi observada menor perda da atividade enzimática, devida à ligação ordenada da HRP, não comprometendo sua estrutura conformacional natural.

A adsorção nos grupos amino apresentou-se estável, não tendo sido observada dessorção em solução PBS, água e solução de NaCl. A enzima manteve-se ativa por até 160 dias quando estocada a 4°C em solução 0,1 M de PBS (pH 7,0). Isto demonstra que os NTT oferecem uma matriz adequada para a imobilização da HRP. Logo, esta estratégia, de acordo com as condições utilizadas, mostrou-se adequada para a fabricação do biossensor.

Estudos voltamétricos utilizando no sistema redox $K_3[Fe(CN)_6]$ evidenciaram que os NTT quando inseridos em eletrodo de pasta de carbono, melhoraram o caráter eletroquímico e condutor. Pode-se concluir que os NTT aumentam a área eletroativa do eletrodo e a atividade eletroquímica do mesmo.

O biossensor NTT/ATPMS/GLU/HRP apresentou picos redox devidos à reação eletroquímica da HRP imobilizada, pela transferência direta de elétrons, exibindo uma taxa de transferência de elétrons (k_s) de $3,5 \text{ s}^{-1}$. Além disso, o processo redox é quase-reversível, ou seja, controlado pela reação na superfície do eletrodo. Estas medições eletroquímicas revelam que a HRP imobilizada apresenta alta atividade biológica e estabilidade.

O biossensor construído mostrou-se eficiente para a determinação de H_2O_2 , com baixo potencial de redução de $-0,38 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, grande sensibilidade, limite de detecção de $27,24 \mu\text{M}$, e excelente faixa linear de detecção de $250 \mu\text{M}$ a $6,76 \text{ mM}$. Além disso, mostrou elevada reprodutibilidade, repetibilidade e estabilidade por 30 dias. Estes resultados mostram que a matriz de NTT/HRP proporciona a fabricação de um biossensor amperométrico com excelente resposta para detecção do H_2O_2 .

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Em seguida, apresentam-se algumas sugestões para continuidade desta pesquisa:

- ✓ Aprofundamento na metodologia de imobilização por ativação dos grupos carboxílicos, como avaliação de outras condições de imobilização, como, por exemplo, aumento do tempo de reação;

- ✓ Investigação de mais variáveis do processo de adsorção covalente da HRP por ativação dos grupos amino, de forma a aumentar a eficiência de imobilização e manutenção da atividade enzimática;
- ✓ Avaliação da proporção NTT/ATPMS/GLU/HRP e pasta de carbono para fabricação do biossensor;
- ✓ Estudo do efeito de possíveis interferentes sobre o desempenho do biossensor;
- ✓ Teste do biossensor com amostras reais;
- ✓ Avaliação de outras plataformas para a produção dos biossensores, como FETs, visando sua miniaturização.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEDIRAN, S.A., LAMBEIR, A.M., 1989, "Kinetics of the Reaction of Compound II of Horseradish Peroxidase with Hydrogen Peroxide to form Compound III", *European Journal of Biochemistry*, v.186, n.3, pp. 571-576, 1989.
- ALVES, D.C.B., 2009, *Nanotubos de Titanatos aplicados como Sensores de Gás*. Dissertação MSc., Departamento de Física/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- ANSARI, S.A., HUSAIN, Q., 2012, "Potential Applications of Enzymes Immobilized on/in Nano Materials: A review", *Biotechnology Advances*, v. 30, n.3, pp. 512-523.
- ARINBRUSTER, D.A., TILLMAN, D., HUBBS, L.M., 1994, "Limit of Detection (LOD)/ Limit of Quantitation (LOQ): Comparison of the Empirical and the Statistical Methods Exemplified with GC-MS Assays of Abused Drugs", *Clinical Chemistry*, v. 40, n.7, pp. 1233–1238.
- ARYA, S.K., SINGH, S.P., MALHOTRA, B.D., "Electrochemical Techniques in Biosensors". In: Marks, R., Cullen, D. C., Karube, I., Lowe, C. R., Weetall, H. H., *Handbook of Biosensors and Biochips* , chapter 22, New Delhi, Índia, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.
- ASURI, P., BALE, S.S., PANGULE, R.C. *et al.*, 2007, "Structure, Function, and Stability of Enzymes Covalently Attached to Single-walled Carbon Nanotubes", *Langmuir*, v. 23, n. 24, pp. 12318-12321.
- BADELLINO, C., RODRIGUES, C.A., BERTAZZOLI, R., 2006, "Oxidation of pesticides by in situ electrogenerated hydrogen peroxide: study for the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid", *Journal of Hazardous Materials*, v. 137, n. 2, pp. 856-864.
- BARD, A.J., FAULKNER, L.R., 2001, *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*. 2 ed. New York, USA, John Wiley & Sond, Inc.

- BARREIROS, A.L.B.S., DAVID, J.P., DAVID, J., 2006, "Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo", *Química Nova*, v. 29, n.1, pp. 113-123.
- BAVYKIN, D.V., FRIEDRICH, J.M., WALSH, F.C., 2006, "*Protonated Titanates and TiO₂ Nanostructured Materials: Synthesis, Properties, and Applications*", *Advanced Materials*, v. 18, n. 21, pp. 2807-2824.
- BO, X., BAI, J., WANG, L., *et al.*, 2010, "In Situ Growth of Copper Sulfide Nanoparticles on Ordered Mesoporous Carbon and their Application as Nonenzymatic Amperometric Sensor of Hydrogen Peroxide", *Talanta*, v. 81, n. 1-2, pp. 339-345.
- BRADFORD, M.M., 1976, "A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, v. 72, pp. 248-54.
- BRETT, C.M.A., BRETT, A.M.O., 1993, *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*. Oxford, Oxford University Press.
- BRUCKNER-LEA, C.J., 2004, "Biosensor Systems for Homeland Security", *Interface*, v. 13, pp. 36-41.
- BUTT, H., GRAF, K., KAPPL, M., 2001, *Physics and Chemistry Interfaces*. Weinheim, WILEY-VCH GmbH & Co. KgaA.
- CAO, Z., JIANG, X., XIE, Q., *et al.*, 2008, "A third-generation Hydrogen Peroxide Biosensor based on Horseradish Peroxidase Immobilized in a Tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane/multiwalled Carbon Nanotubes Film", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n.2, pp. 222-227.
- CARP, O., HUISMAN, C.L., RELLER, A., 2004, "Photoinduced Reactivity of Titanium Dioxide", *Progress in Solid State Chemistry*, v. 32, n. 1-2, pp. 33-177.
- CARVALHO, R.H., LEMOS, F., LEMOS, M.A.N.D.A., *et al.*, 2006, "Kinetic modelling of phenol co-oxidation using horseradish peroxidase", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 29, n. 2, pp. 99-108.
- CASS, T., "Enzymology". In: Marks, R., Cullen, D. C., Karube, I., Lowe, C. R., Weetall, H. H., *Handbook of Biosensors and Biochips*, chapter 5, New Delhi, Índia, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.

- CASTILLO, J., GÁSPÁR, S., LETH, S., *et al.*, 2004, "Biosensors for Life Quality Design, Development and Applications", *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 102, n. 2, pp. 179-194.
- CESAR, D.V., FONSECA, G.F., BONFIM, R.P.F., RESENDE, N.S., "Efeito da Adição do Cobre nas Propriedades Estruturais de Titanatos Nanoestruturados". *16º Congresso Brasileiro de Catálise*, Campos dos Jordão, São Paulo, Brasil, Maio 2011.
- CHATTOPADHYAY, K., MAZUMDAR, S., 2000, "Structural and Conformational Stability of Horseradish Peroxidase: Effect of Temperature and pH", *Biochemistry*, v. 39, n. 1, pp. 263-270.
- CHAUBEY, A., MALHOTRA, B.D., 2002, "Mediated Biosensors", *Biosensors and Bioelectronics*, v.17, n. 6-7, pp. 441-456.
- CHEN, H., ZHANG, Z., CAI, D., *et al.*, 2011a, "A Hydrogen Peroxide Sensor based on Ag Nanoparticles Electrodeposited on Natural Nano-structure Attapulgite Modified Glassy Carbon Electrode", *Talanta*, v. 86, pp. 266-270.
- CHEN, X., CHEN, Z., ZHU, J., *et al.*, 2011b, "A Novel H₂O₂ Amperometric Biosensor based on Gold Nanoparticles/self-doped Polyaniline Nanofibers", *Bioelectrochemistry*, v. 82, n. 2, pp. 87-94.
- CHEN, W., CAI, S., REN, Q.Q., *et al.*, 2012, "Recent Advances in Electrochemical Sensing for Hydrogen Peroxide: a Review", *Analyst*, v. 137, n.1, pp. 49-58.
- CHEN, Y.C., LO, S.L., KUO, J., 2010, "Pb(II) Adsorption Capacity and Behavior of Titanate Nanotubes made by Microwave Hydrothermal Method". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 361, n. 1-3, pp. 126-131.
- CHIBBAR, R. N., VAN HUYSTEE, R. B., 1984, "Characterization of Peroxidase in Plant Cells", *Plant Physiology*, v. 75, n. 4, pp. 956-958.
- CHOI, M.M.F., YIU, T.P., 2004, "Immobilization of Beef liver Catalase on Eggshell Membrane for Fabrication of Hydrogen Peroxide Biosensor", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34, n. 1, pp. 41-47.

- CLAESSON, P.M., BLOMBERGL, E., FROBERGL, J.C., *et al.*, 1995, "Protein Interactions at Solid Surfaces", *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 57, pp. 161-227.
- CLAPP, P.A., EVANS, D. F., SHERIFF, T.S.S., 1989, "Spectrophotometric Determination of Hydrogen Peroxide after Extraction with Ethyl Acetate", *Analytica Chimica Acta*, v. 218, pp. 331-334.
- COEN, M., LEHMANN, R., GRÖNING, P., *et al.*, 2001, "Adsorption and Bioactivity of Protein A on Silicon Surfaces Studied by AFM and XPS", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 233, n. 2, pp. 180-189.
- CORCUERA, I.R.D., CAVALIERI, R.P., 2003, "Biosensors". *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering*, pp. 119-123.
- COTTON, M.L., DUNFORD, H.B., 1972, "Studies on Horseradish Peroxidase XI. On the Nature of Compounds I and II as Determined from the Kinetics of the Oxidation of Ferrocyanide", *Canadian Journal of Chemistry*, v. 51, pp. 582-586.
- COX, J.A., GADD, S.E., DAS, B.K., 1998, "Modification of Glassy Carbon with a Stable Film Containing Iridium Oxide and Palladium", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 256, n. 1, pp. 199-205.
- CULLITY, B.D., STOCK, S.R., 1958, *Elements of x-ray Diffraction*. 1 ed. Massachusetts, Addison – Wesley Publishing Company, Inc.
- DEDAVID, B.A., GOMES, C.I., MACHADO, G., 2007, *Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e Preparação de Amostras : Materiais Poliméricos , Metálicos e Semicondutores*. Porto Alegre, PUCRS.
- DELVAUX, M., CHAMPAGNE, S. D., 2003, "Immobilisation of Glucose Oxidase within Metallic Nanotubes Arrays for Application to Enzyme Biosensors", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 18, n. 7, pp. 943-951.
- DEYHIMI, F., NAMI, F., 2012, "Electrochemical Assay of Hydrogen Peroxide: A Ping – Pong Mechanism", *International Journal of Chemical Kinetics*, v. 44, n. 10, pp. 699-704.

- DRAKE, L.R., LIN, S., RAYSON, G.D., *et al.*, 1996, "Chemical Modification and Metal Binding Studies of *Datura innoxia*", *Environmental Science and Technology*, v. 30, n. 1, pp. 110-114.
- DUTTA, R., 2008, *Fundamentals of Biochemical Engineering*. 1 ed. India, Springer .
- EGGINS, B., 1997, *Biosensors, An Introduction*. 1 ed. England, Jhon Wiley & Sons Ltd.
- ELZANOWSKA, H., ABU-IRHAYEM, E., SKRZYNECKA, B., *et al.*, 2004, "Hydrogen Peroxide Detection at Electrochemically and Sol-Gel Derived Ir Oxide Films", *Electroanalysis*, v. 16, n. 6, p. 478-490.
- ERDEM, A., PABUCCUOGLU, A., MERIC, B., *et al.*, 2000, "Electrochemical Biosensor Based on Horseradish Peroxidase for the Determination of Oxidizable Drugs", *Turkish Journal of Medical Sciences*, v. 30, n. 1, pp. 349-354.
- FAIR, B., JAMIESON, A., 1980, "Studies of Protein Adsorption on Polystyrene Latex Surfaces", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 77, n. 2, pp. 525-534.
- FAM, D.W.H.; PALANIAPPAN, A., TOK, A.I.Y., *et al.*, 2011, "A review on Technological Aspects Influencing Commercialization of Carbon Nanotube Sensors", *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 157, n. 1, pp. 1-7.
- FERAPONTOVA, E.E., GORTON, L., 2001, "Effect of Proton Donors on Direct Electron Transfer in the System Gold Electrode - Horseradish Peroxidase", *Electrochemistry Communications*, v. 3, n.12, pp. 767-774.
- FERRI, T., POSCIA, A., SANTUCCI, R., 1998, "Direct electrochemistry of membrane-entrapped horseradish peroxidase. Part II: Amperometric detection of hydrogen peroxide", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 45, n. 2, pp. 221-226.
- FIORITO, P.A., TORRESI, S.I.C., 2004, "Optimized Multilayer Oxalate Biosensor", *Talanta*, v. 62, n. 3, p. 649-654.
- FISHER, A.C., 1996, *Electrode Dynamics*. 1 ed. Oxford, Oxford Chemistry Primers.
- FOO, K.Y., HAMEED, B.H., 2010, "Insights into the Modeling of Adsorption Isotherm Systems", *Chemical Engineering Journal*, v. 156, n. 1, pp. 2-10.

- FORZANI, E.S., RIVAS, G.A., SOLIS, V.M., 1995, "Amperometric determination of dopamine on an enzymatically modified carbon paste electrode", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 382, n. 1-2, pp. 33-40.
- FRADEN, J., 2004, *Handbook of Modern Sensors- Physics, Designs and Applications*. 3 ed. New York, Springer – Verlag.
- FREEMAN, T.M., SELTZ, W.R., 1978, "Chemiluminescence fiber optic probe for hydrogen peroxide based on the luminol reaction", *Analytical Chemistry*, v. 50, n. 9, pp. 1242-1246.
- FREIRE, R.S., PELEGRINI, R., KUBOTA, L.T., *et al.*, 2000, "Novas Tendências para o Tratamento de Resíduos Industriais contendo Espécies Organocloradas", *Química Nova*, v. 23, n. 4, pp. 504-511.
- FREY, B.L., CORN, R.M., 1996, "Covalent Attachment and Derivatization of Poly (L - lysine) Monolayers on Gold Surfaces As Characterized by Polarization-Modulation FT-IR Spectroscopy", *Analytical Chemistry*, v. 68, n. 18, pp. 3187-3193.
- FUJIMOTO, J., ALEXANDRE, E., REIS, D.O., *et al.*, 2002, "Formação de Multicamadas de Polissacarídeos e Proteína", *Química Nova*, v. 25, n. 5, pp. 757-761.
- GALLI, A., 2009, *Desenvolvimento de um Biossensor Bienzimático Imobilizado sobre Monocamadas Auto-organizadas para Determinação de Açúcares em Alimentos*. Tese de D.Sc., Instituto de Química/UFSCar, São Carlos, SP, Brasil.
- GAO, T., FJELLVAG, H., NORBY, P., 2008, "Crystal Structures of Titanate Nanotubes: a Raman Scattering Study", *Inorganic Chemistry*, v. 48, n. 4, pp. 1423-1432.
- GARCIA, M.B.F., 2010, *Imobilização de Enzimas em Materiais Nanoestruturados: Atividade, Estabilidade e Aplicação da Peroxidase Imobilizada em Bicamadas Lipídicas e Nanopartículas Poliméricas*. Tese de D.Sc., UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.
- GIANNOUDI, L., PILETSKA, E.V., SERGEY, A.P., "Development of Biosensors for the Detection of Hydrogen Peroxide". In GIARD, M.T., PILETSKA, E.V.,

Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices, 1 ed., chapter 6, USA, Springer, 2006.

GILLIS, E.H., GOSLING, J.P., SREENAN, J.M., *et al.*, 2002, "Development and Validation of a Biosensor-based Immunoassay for Progesterone in Bovine Milk", *Journal of Immunological Methods*, v. 267, n. 2, pp. 131-138.

GLOBAL INFORMATION , 2010. Disponível em: http://www.prweb.com/releases/biosensors/medical_biosensors/prweb8067456.htm. Acesso em: 01 dez. 2011.

GORTON, L., 1985, "A carbon electrode sputtered with palladium and gold for the amperometric detection of hydrogen peroxide", *Analytica Chimica Acta*, v. 178, pp. 247-253, 1985.

GORTON, L., LINDGREN, A., LARSSON, T., *et al.*, 1999, "Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors", *Analytica Chimica Acta*, v. 400, n. 1-3, pp. 91-108.

GREEN, R.J., HOPKINSON, I., JONES, R.A.L., 1999, "Unfolding and Intermolecular Association in Globular Proteins Adsorbed at Interfaces", *Langmuir*, v. 15, n. 15, pp. 5102-5110.

GRUNDLER, P., 2007, *Chemicals Sensors – An introduction for Scientists and Engineers*. 1 ed. Berlin, Springer – Verlag.

GUWY, A.J., HAWKES, F.R., MARTIN, S.R., *et al.*, 2000, "A Technique for Monitoring Hydrogen Peroxide Concentration Off-Line and On-Line" , v. 34, n. 8, pp. 2191-2198.

HAMER, M., CARBALLO, R.R., REZZANO, I.N., 2009, "Electrocatalytic Reduction of Hydrogen Peroxide by Nanostructured Bimetallic Films of Metalloporphyrins", *Electroanalysis*, v. 21, n. 19, pp. 2133-2138.

HAN, C.H., HONG, D.W., KIM, I.J., *et al.*, 2007, "Synthesis of Pd or Pt/titanate Nanotube and its Application to Catalytic Type Hydrogen Gas Sensor", *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 128, n. 1, pp. 320-325.

HARBURY, H.A., 1957, "Oxidation-Reduction Potentials of Horseradish Peroxidase", *Journal of The American Chemical Society*, v. 75, n. 18, pp. 4625-4626.

- HODOS, M., HORVÁTH, E., HASPEL, H., *et al.*, 2004, "Photosensitization of ion-exchangeable titanate nanotubes by CdS nanoparticles", *Chemical Physics Letters*, v. 399, n. 4-6, pp. 512-515.
- HOLM, T.R., GEORGE, G.K., BARCELONA, M.J., 1987, "Fluorometric Determination of Hydrogen Peroxide in Groundwater", *Analytical Chemistry*, v. 59, n. 4, pp. 582-586.
- HUA, M.Y., CHEN, H. C., CHUANG, C.K., *et al.*, 2011, "The Intrinsic Redox Reactions of Polyamic Acid Derivatives and their Application in Hydrogen Peroxide Sensor", *Biomaterials*, v. 32, n. 21, pp. 4885-4895.
- HUANG, K.J., NIU, D.J., LIU, X., *et al.*, 2011, "Direct Electrochemistry of Catalase at Amine-functionalized Graphene/Gold Nanoparticles Composite Film for Hydrogen Peroxide Sensor", *Electrochimica Acta*, v. 56, n. 7, pp. 2947-2953.
- HULANICKI, A., GLAB, S., INGMAN, F., 1991, "Chemical Sensors Definitions and Classification", *Pure and Applied Chemistry*, v. 63, n. 9, pp. 1247-1250.
- JAWORSKI, R.K., COX, J.A., STROHMEIER, B.R., 1992, "Characterization of Oxide Films Electrochemically Deposited from Solutions of Palladium Chloride and Sodium Hexachloroiridate", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 325, n. 1-2, pp. 111-123.
- JEPPU, G.P., CLEMENT, T.P., 2012, "A modified Langmuir-Freundlich Isotherm Model for Simulating pH-dependent Adsorption Effects", *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 129-130, pp. 46-53.
- JIA, J., WANG, B., WU, A., *et al.*, 2002, "A Method to Construct a Third-Generation Horseradish Peroxidase Biosensor: Self-Assembling Gold Nanoparticles to Three-Dimensional Sol-Gel", *Analytical Chemistry*, v. 74, n. 9, p. 2217-2223.
- KAFI, A.K.M., WU, G., CHEN, A., 2008, "A novel hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase onto Au-modified titanium dioxide nanotube arrays", *Biosensors and bioelectronics*, v. 24, n. 4, pp. 566-571.
- KAFI, A.K.M., WU, G., BENVENUTO, P., CHEN, A., 2011, "Highly sensitive amperometric H₂O₂ biosensor based on hemoglobin modified TiO₂ nanotubes", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 662, n. 1, p. 64-69.

- KAOUTIT, M.E., RODRIGUEZ, I.N., TEMSAMANI, K.R., *et al.*, 2007, "The Sonogel-Carbon Materials as Basis for Development of Enzyme Biosensors for Phenols and Polyphenols Monitoring: a Detailed Comparative Study of three Immobilization Matrixes", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, n.12, pp. 2958-2966.
- KAMIN, R.A., WILSON, G.S., 1980, "Rotating Ring-Disk Electrode for Biocatalysis Kinetic Studies and Characterization of the Immobilized Enzyme Layer", *Analytical Chemistry*, v. 52, n. 8, pp. 1198-1205.
- KARYAKIN, A. A., KARYAKINA, E.E., GORTON, L.; 1998, "The electrocatalytic activity of Prussian blue in hydrogen peroxide reduction studied using a wall-jet electrode with continuous flow". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 456, n. 1-2, pp. 97-104.
- KARYAKIN, A.A., KARYAKINA, E. E., 1999, "Prussian Blue-based 'artificial peroxidase' as a transducer for hydrogen peroxide detection. Application to biosensors", *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 57, n. 1-3, pp. 268-273.
- KARYAKIN, A.A., KARYAKINA, E.E., GORTON, L., 2000, "Amperometric biosensor for glutamate using prussian blue-based "artificial peroxidase" as a transducer for hydrogen peroxide", *Analytical Chemistry*, v. 72, n. 7, p. 1720-1723.
- KARYAKIN, A., "Chemical and biological sensors based on electroactive inorganic polycrystals". In: ZHANG, X., JU, H., WANG, J., *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*, 1 ed., chapter 13, USA, Elsevier Inc., 2008.
- KASUGA, T., HIRAMATSU, M., HOSON, A., SEKINO, T., NIIHARA, K., 1999, "Titania Nanotubes Prepared by Chemical Processing", *Advanced Materials*, v. 11, n.15, pp. 1307–1311.
- KAVAN, L., BACSA, R., TUNCKOL, M., *et al.*, 2010, "Multi-walled carbon nanotubes functionalized by carboxylic groups: Activation of TiO₂ (anatase) and phosphate olivines (LiMnPO₄; LiFePO₄) for electrochemical Li-storage", *Journal of Power Sources*, v. 195, n. 16, pp. 5360-5369.
- KAVAN, L., KALBAC, M., ZUKALOVA, M., *et al.*, 2004, "Lithium Storage in Nanostructured TiO₂ Made by Hydrothermal Growth", v. 16, n. 18, pp. 840-848.

- KLASSEN, N. V., MARCHINGTON, D., MCGOWANT, H.C.E., 1994, "H₂O₂ Determination by the I₃⁻ Method and by KmnO₄ Titration", *Analytical Chemistry*, v. 66, n. 18, pp. 2921-2925.
- KIM, G.Y., LEE, K.B., CHO, S.H., *et al.*, 2005, "Electroenzymatic Degradation of azo dye using an Immobilized Peroxidase Enzyme". *Journal of Hazardous Materials*, v. 126, n. 1-3, pp. 183-138.
- KIM, J., GRATE, J.W., WANG, P., 2006, "Nanostructures for Enzyme Stabilization", *Chemical Engineering Science*, v. 61, n. 3, pp. 1017-1026.
- KISSINGER, P.T., 2005, "Biosensors- a Perspective", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 20, n. 12, pp. 2512-2516.
- KOZAN, J.V.B., SILVA, R.P. SERRANO, S.H.P., *et al.*, 2007, "Biosensing Hydrogen Peroxide utilizing Carbon Paste Electrodes Containing Peroxidases Naturally Immobilized on Coconut (*Cocos nucifera* L.) Fibers", *Analytica Chimica Acta*, v. 591, n. 2, pp. 200-207.
- KUMAR, S.A., CHEN, S.M., 2007, "Electrocatalytic reduction of oxygen and hydrogen peroxide at poly(p-aminobenzene sulfonic acid)-modified glassy carbon electrodes", *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 278, n. 1-2, pp. 244-250.
- LARISCH, B.C., DUFF, S.J.B., 1997, "Effect of H₂O₂ and DTPA on the characteristics and treatment of TCF (totally chlorine-free) and ECF (elementally chlorinefree) kraft pulping effluents", *Water Science and Technology*, v. 35, n. 2-3, pp. 163-171.
- LAURENT, N., HADDOUB, R., FLITSCH, S.L., 2008, "Enzyme catalysis on solid surfaces", *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 6, pp. 328-337.
- LAVIRON, E., 1979, "General Expression of the Linear Potential Sweep Voltammogram in the case of Diffusionless Electrochemical Systems", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 101, pp. 19-28.
- LEE, C.K., LIU, S.S., JUANG, L.C., *et al.*, 2007, "Application of titanate nanotubes for dyes adsorptive removal from aqueous solution", *Journal of Hazardous Materials*, v. 148, n. 3, pp. 756-760.

- LEE, Y.M., KWON, O.Y. YOON, Y.J., *et al.*, 2006, "Immobilization of Horseradish Peroxidase on Multi-wall Carbon Nanotubes and its Electrochemical Properties", *Biotechnology Letters*, v. 28, n. 1, pp. 39-43.
- LEI, C.X., HU, S.Q., SHEN, G.L., *et al.*, 2003, "Immobilization of Horseradish Peroxidase to a Nano-Au Monolayer Modified Chitosan-Entrapped Carbon Paste Electrode for the Detection of Hydrogen Peroxide", *Talanta*, v. 59, n. 5, pp. 981-988.
- LEHNINGER, A. L., *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. 3 ed. São Paulo, Sarvier, 2006.
- LEWIS, I.,R., EDWARDS, H.G.M., 2001, *Handbook of Raman Spectroscopy from the Research Laboratory to the Process Line*. v. 28. Switzerland, Marcel Dekker, Inc.
- LI, L., DU, Z., LIU, S., *et al.*, 2010, "A Novel Nonenzymatic Hydrogen Peroxide Sensor based on MnO₂/graphene Oxide Nanocomposite", *Talanta*, v. 82, n. 5, pp. 1637-1641.
- LI, M., XU, S., TANG, M., *et al.*, 2011, "Direct electrochemistry of horseradish peroxidase on graphene-modified electrode for electrocatalytic reduction towards H₂O₂", *Electrochimica Acta*, v. 56, n. 3, pp. 1144-1149.
- LI, Z., CUI, X., ZHENG, J., *et al.*, 2007, "Effects of Microstructure of Carbon Nanofibers for Amperometric Detection of Hydrogen Peroxide", *Analytica Chimica Acta*, v. 597, n. 2, p. 238-244.
- LIMA, R.S., NUNES, G.S., NOGUER, T., *et al.*, 2007, "Biossensor Enzimático para Detecção de Fungicidas Ditiocarbamatos. Estudo Cinético da Enzima Aldeído Desidrogenase e Otimização do Biossensor", *Química Nova*, v. 30, n. 1, pp. 9-17.
- LIN, L., HUANG, X., WANG, L., *et al.*, 2010, "Synthesis, Characterization and the Electrocatalytic Application of Prussian Blue/Titanate Nanotubes Nanocomposite", *Solid State Sciences*, v.12, n.10, pp. 1764 – 1769.
- LIN, S.S., GUROL, M.D., 1996, "Heterogeneous catalytic oxidation of organic compounds by hydrogen peroxide", *Water Science and Technology*, v. 34, n. 9, pp. 57-64.

- LINDGREN, A., EMNÉUS, J., RUZGAS, *et al.*, 1997, "Amperometric detection of phenols using peroxidase-modified graphite electrodes", *Analytica Chimica Acta*, v. 137, n. 1-2, pp. 51-62.
- LIU, A., WEI, M., HONMA, I., *et al.*, 2005, "Direct Electrochemistry of Myoglobin in Titanate Nanotubes Film contrast to the significant denaturation of Mb in TNP film", *Analytical Chemistry*, v. 77, n. 24, pp. 8068-8074.
- LIU, A., WEI, M.D., HONMA, I., *et al.*, 2006, "Biosensing Properties of Titanate Nanotube Films: Selective Detection of Dopamine in the Presence of Ascorbate and Uric Acid", *Advanced Functional Materials*, v. 16, n. 3, pp. 371-376.
- LIU, C., HU, J., 2008, "Direct Electrochemistry of Hemoglobin Entrapped in Composite Electrodeposited Chitosan-Multiwall Carbon Nanotubes and Nanogold Particles Membrane and Its Electrocatalytic Application", *Electroanalysis*, v. 20, n. 10, pp. 1067-1072.
- LIU, M., WEN, Y., LI, D., *et al.*, 2011, "A Stable Sandwich-Type Amperometric Biosensor based on Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-Single Walled Carbon Nanotubes/ascorbate Oxidase/Nafion Films for Detection of L-ascorbic Acid", *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 159, n. 1, pp. 277-285.
- LIU, S.S., LEE, C.K., CHEN, H.C., *et al.*, 2009, "Application of Titanate Nanotubes for Cu(II) Ions Adsorptive Removal from Aqueous Solution", *Chemical Engineering Journal*, v. 147, n. 2-3, pp. 188-193.
- LIU, S.Q., JU, H.X., 2002, "Renewable Reagentless Hydrogen Peroxide Sensor based on Direct Electron Transfer of Horseradish Peroxidase Immobilized on Colloidal Gold-modified Electrode", *Analytical Biochemistry*, v. 307, n. 1, pp. 110-116.
- LIU, X., ZWEIER, J.L., 2001, "A real-time Electrochemical Technique for Measurement of Cellular Hydrogen Peroxide Generation and Consumption: Evaluation in Human Polymorphonuclear Leukocytes", *Free Radical Biology and Medicine*, v. 31, n. 7, pp. 894-901.
- LIU, X., FENG, H., ZHAO, R., *et al.*, 2012, "A Novel Approach to Construct a Horseradish Peroxidase|hydrophilic Ionic Liquids|Au Nanoparticles Dotted

Titanate Nanotubes Biosensor for Amperometric Sensing of Hydrogen Peroxide”, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 31, n. 1, p. 101-104.

LIU, Z., ZHANG, X., NISHIMOTO, S., *et al.*, 2007, “Anatase TiO₂ Nanoparticles on rutile TiO₂ Nanorods: a Heterogeneous Nanostructure via Layer-by-Layer Assembly”, *Langmuir*, v. 23, n. 22, pp. 10916-10919.

LIU, H., YING, T., SUNA, K., *et al.*, 1997, “Reagentless Amperometric Biosensors Highly Sensitive to Hydrogen Peroxide, Glucose and Lactose based on N-methyl Phenazine Methosulfate Incorporated in a Nafion Film as an Electron Transfer Mediator Between Horseradish Peroxidase and an Electrode”, *Analytical Chimica Acta*, v. 344, n. 97, pp. 187-199.

LOWE, C.R., “Overview of Biosensor and Bioarray Technologies”. In: Marks, R., Cullen, D. C., Karube, I., Lowe, C. R., Weetall, H. H., *Handbook of Biosensors and Biochips*, chapter 1, New Delhi, India, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.

LUECHINGER, M., PRINS, R., PIRNGRUBER, G.D., 2005, “Functionalization of Silica Surfaces with Mixtures of 3-aminopropyl and Methyl Groups”, *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 85, n. 1-2, p. 111-118.

LUO, Y., LIU, H., RUI, Q., *et al.*, 2009, “Detection of Extracellular H₂O₂ Released from Human Liver Cancer Cells based on TiO₂ Nanoneedles with Enhanced Electron Transfer of Cytochrome c”, *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 8, p. 3035-3041.

MALARCZYK, E., 2008, “Kinetic Changes in the Activity of HR-peroxidase Induced by very low doses of Phenol”. *International Journal of Hight Dilution Research*, v. 7, n. 23, pp. 48-55.

MALITESTA, C., GUASCITO, M. R., 2005, “Heavy Metal Determination by Biosensors based on Enzyme Immobilised by Electropolymerisation”, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 20, n. 8, pp. 1643-1647, 2005.

MAO, C.J., CHEN, X.B., NIU, H.L., *et al.*, 2012, “A novel enzymatic hydrogen peroxide biosensor based on Ag/C nanocables”, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 31, n. 1, pp. 544-547.

MARTINEZ, M.T., 2011, *Desenvolvimento de Biossensores de Pasta de Carbono e de Pasta de Nanotubos de Carbono Modificados com a Enzima Acetilcolinesterase*

para Detecção de Pesticida da Classe dos Carbamatos. Dissertação de M.Sc., Instituto de Química/USP, São Carlos, SP, Brasil.

MATHEW, M., SANDHYARANI, N., 2011, "A novel Electrochemical Sensor Surface for the Detection of Hydrogen Peroxide using Cyclic Bisureas/gold Nanoparticle Composite". *Biosensors and Bioelectronics*, v. 28, n. 1, p. 210-215.

MATTOS, I.L.D., SHIRAISHI, K.A., DELPHINI, A., *et al.*, 2003, "Peróxido de Hidrogênio: Importância e Determinação", *Química Nova*, v. 26, n. 3, pp. 373-380.

MELO, A.F., 2008, *Desenvolvimento Preliminar de um Biossensor Enzimático para Determinação de Taninos Hidrolisáveis*. Dissertação de M.Sc., Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MEHTA, A., PATIL, S., BANG, H., *et al.*, 2007, "A Novel Multivalent Nanomaterial based Hydrogen Peroxide Sensor". *Sensors and Actuators A: Physical*, v. 134, n. 1, pp. 146-151.

MOHAMED, S.A., ABULNAJA, K.O., ADS, A.S., *et al.*, 2011, "Characterisation of an Anionic Peroxidase from Horseradish cv. Balady", *Food Chemistry*, v. 128, n. 3, pp. 725-730.

MORGADO, E., ABREU, M.A.S.D., MOURE, G.T., *et al.*, 2007, "Characterization of Nanostructured Titanates Obtained by Alkali Treatment of TiO₂ -Anatases with Distinct Crystal Sizes", *Langmuir*, v. 19, n. 6, pp. 665-676.

MORGADO, E., 2007, *Estudo de Titanatos Nanoestruturados obtidos por Tratamento Hidrotérmico de Óxido de Titânio em meio alcalino*. Tese DSc., Centro de Ciências Exatas e da Terra/UFRN, Natal, RN, Brasil.

MOZAZ, R.S., MARCO, M.P., ALDA, M.J.L., *et al.*, 2004, "Biosensors for Environmental Monitoring of Endocrine Disruptors: a Review Article". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 378, n. 3, pp. 588-598.

NAKATA, S., KIDO, N., HAYASHI, M., *et al.*, 1996, "Chemisorption of Proteins and their Thiol Derivatives onto Gold Surfaces: Characterization based on Electrochemical Nonlinearity", *Biophysical Chemistry*, v. 62, n. 1-3, pp. 63-72.

- NAVES, A.F., 2008, *Estudo da adsorção de horseradish peroxidase (HRP) sobre superfícies planas e de sua atividade catalítica*. Tese de D.Sc., Instituto de Química/USP, São Paulo, SP, Brasil.
- NEWMAN, J.D., TURNER, A.P. F., “Historical Perspective of Biosensor and Biochip Development”. In: Marks, R., Cullen, D. C., Karube, I., Lowe, C. R., Weetall, H. H., *Handbook of Biosensors and Biochips* , chapter 3, New Delhi, Índia, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.
- NICELL, J.A., WRIGHT, H., 1997, “A Model of Peroxidase Activity with Inhibition by Hydrogen Peroxide”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, n. 97, p. 302-310.
- NISTOR, C., EMNÉUS, J., 1999, “Bioanalytical Tools for Monitoring Polar Pollutants”, *Waste Management*, v. 19, n.2, pp. 147-170.
- NIU, H.Y., WANG, J.M.; SHI, Y.L., *et al.*, 2009, “Adsorption Behavior of Arsenic onto Protonated Titanate Nanotubes Prepared via Hydrothermal Method”, *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 122, n. 1-3, pp. 28-35.
- NORDE, W., 1986, “Adsorption of Proteins from Solution at the Solid-Liquid Interface”, *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 25, pp. 267-340.
- NORDE, W., TAN, W., KOOPAL, L., 2008, “Protein Adsorption at Solid Surfaces and Protein Complexation with Humic Acids”, *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal*, v. 8, n especial, pp.64-74.
- NORDE, W., 2008, “My voyage of Discovery to proteins in Flatland ...and Beyond”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 61, n. 1, pp. 1-9.
- OJANI, R., RAOOF, J., & ZAREI, E., 2006, “Electrocatalytic Reduction of Nitrite Using Ferricyanide: Application for its Simple and Selective Determination”, *Eletrochimica Acta*, v. 52, n.3, pp. 753–759.
- OHSAKI, Y., MASAKI, N., KITAMURA, T. *et al.*, 2005, “Dye-sensitized TiO₂ Nanotube Solar Cells: Fabrication and Electronic Characterization”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 7, n. 24, pp. 4157-4163.
- OSTUNI, E., GRZYBOWSKI, B.A., MRKSICH, M., *et al.*, 2003, “Adsorption of Proteins to Hydrophobic Sites on Mixed Self-Assembled Monolayers”, *Langmuir*, v. 19, n. 1, pp. 1861-1872.

- PADDLE, B.M., 1996, "Review Article Biosensors for Chemical and Biological Agents of Defence Interest", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 11, n. 11, pp. 1079-1113.
- PADILHA, A.F., FILHO, F.A., 2004, *Técnicas de Análise Micro Estrutural*. Brasil, Hemus.
- PATEL, N., DAVIES, M. C., HEATON, R.J., *et al.*, 1998, "A Scanning Probe Microscopy Study of the Physisorption and Chemisorption of Protein Molecules onto Carboxylate terminated Self-assembled Monolayers", *Applied Physics A*, v. 66, n. 1, pp.569-574.
- PAULINO, P.N., 2011, Fotorredução Catalítica do CO₂ para Geração de Produtos de Alto Teor Energético. Dissertação de M. Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- PEREZ, E.F., 2000, *Desenvolvimento de um Biossensor Amperométrico para Oxalato*. Dissertação de M.Sc., Instituto de Química/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- PRAUS, P., TURICOVÁ, M., 2007, "A Physico-Chemical Study of the Cationic Surfactants Adsorption on Montmorillonite", *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n. 2, pp. 378-383.
- PUGANOVA, E.A., KARYAKIN, A.A., 2005, "New Materials based on Nanostructured Prussian Blue for Development of Hydrogen Peroxide Sensors", *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 109, n. 1, pp. 167-170.
- QIAN, L., DU, Z.L., YANG, S.Y., *et al.*, 2005, "Raman Study of Titania Nanotube by Soft Chemical Process", *Journal of Molecular Structure*, v. 749, n. 1-3, pp. 103-107.
- QIN, W., ZHANG, Z., LI, B., LIU, S., 1998, "Chemiluminescence Flow-sensing System for Hydrogen Peroxide with Immobilized Reagents", *Analytica Chimica Acta*, v. 372, n. 3, pp. 357-363.
- QUEIROZ, A.A.A., VARGAS, R.R., HIGA, O.Z., RIBEIRO, R.R., VITOLO, M., 2002, "Lactam-amide Graft Copolymers as Novel Support for Enzyme Immobilization", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 84 (Ago), pp. 767-777.

- RABE, M., VERDES, D., SEEGER, S., 2011, "Understanding Protein Adsorption Phenomena at Solid Surfaces", *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 162, n. 1-2, pp. 87-106.
- RABELO, M.S., SILVA, V.L., PIRES, D., *et al.*, 2009, "Branqueamento de Polpa Celulósica Kraft de Eucalipto com Peróxido Ácido Ativado por Molibdênio", *Química Nova*, v. 32, n. 5, pp. 1095-1098.
- RADI, A.E., BERBEL, X.M., PUIG, M.C., *et al.*, 2009, "Novel Protocol for Covalent Immobilization of Horseradish Peroxidase on Gold Electrode Surface", *Electroanalysis*, v. 21, n. 6, pp. 696-700.
- RAN, Q., PENG, R., LIANG, C., *et al.*, 2011, "Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase Immobilized on Electrografted 4-ethynylphenyl Film via Click Chemistry", *Analytica Chimica Acta*, v. 697, n. 1-2, pp. 27-31.
- RIBBENS, S., MEYNEN, V., TENDELOO, G.V., *et al.*, 2008, "Development of Photocatalytic Efficient Ti-based Nanotubes and Nanoribbons by Conventional and Microwave Assisted Synthesis Strategies", *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 114, n. 1-3, pp. 401-409.
- RISIO, S., YAN, N., 2009, "Adsorption and inactivation behavior of horseradish peroxidase on cellulosic fiber surfaces", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 338, n. 2, pp. 410-419.
- RISIO, S., YAN, N., 2010, "Adsorption and inactivation behavior of horseradish peroxidase on various substrates", *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, v. 79, n. 2, pp. 397-402.
- ROGERS, K.R., 2006, "Recent Advances in Biosensor Techniques for Environmental Monitoring", *Analytica Chimica Acta*, v. 568, n. 1-2, pp. 222-231.
- ROMÁN, L.T., LOMILLO, M.A.A., RENEDO, O.D., *et al.*, 2011, "Fabrication and characterization of disposable sensors and biosensors for detection of formaldehyde", *Talanta*, v. 86, pp. 324-328.
- RUAN, C.X., LOU, J., DUAN, Y.Y., *et al.*, 2010, "Electrochemical Oxidation of Cytosine on Carbon Paste Electrode and Its Determination", *Journal of the Chinese Chemical Society*, v. 57, n. 5A, pp. 1056-1060.

- RUZGAS, T.I., EMNÉUS, J., GORTON, L., 1995, "The Development of a Peroxidase Biosensor for Monitoring Phenol and Related Aromatic Compounds", *Analytica Chimica Acta*, v. 311, n. 3, pp. 245-253.
- RUZGAS, T.I., CSREGIB, E., EMNÉUS, J., *et al.*, 1996, "Peroxidase-Modified Electrodes: Fundamentals and Application", *Analytica Chimica Acta*, v. 330, n. 2-3, pp. 123-138.
- SALGADO, A.M., 2001, Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo. Tese de D.Sc., Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SALIMI, A., NOORBAKHS, A., GHADERMARZ, M., 2005, "Direct electrochemistry and electrocatalytic activity of catalase incorporated onto multiwall carbon nanotubes-modified glassy carbon electrode", *Analytical Biochemistry*, v. 344, n. 1, pp. 16-24.
- SANDWICK, R.K., SCHRAY, K.J., 1987, "The Inactivation of Enzymes upon Interaction with a Hydrophobic Latex Surface", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 115, n. 1, pp. 130-138.
- SASSOLAS, A., BLUM, L.J., BOUVIER, B.D.L., 2011, "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors", *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 3, pp. 489-511.
- SHACKLEY, M.S., 2011, *X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF) in Geoarchaeology*. 1 ed. New York, Springer.
- SILVA, J.S., 2010, *Biossensor Amperométrico à Base de Peroxidase em Matriz de Bastão de Grafite Comercial: Estudos Preliminares*. Dissertação M.Sc., Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SILVA, R.A., RIBEIRO, A.M.C., PETRI, D.F.S., 2007, "Adsorption behavior and Activity of Horseradish Peroxidase onto Polysaccharide-decorated Particles". *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 41, n. 4, pp. 404-409.
- SINHA, N., MA, J., YOW, J.T.W., 2006, "Carbon Nanotube-Based Sensors". *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 6, n.3, pp. 573-590.

- SILVERSTEIN, R.M., FRANCIS, X., WEBSTER, D.J., *et al.*, 2006, *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7 ed. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.
- SKOOG, D.A., HOLLER, E.J., CROUCH, S.R., 2007, *Principles of Instrumental Analysis*. 6 ed. USA, Thomson.
- SONG, M.J., HWANG, S.W., WHANG, D., 2010, "Non-enzymatic Electrochemical CuO Nanoflowers Sensor for Hydrogen Peroxide Detection", *Talanta*, v. 80, n. 5, pp. 1648-1652.
- SOTOMAYOR, M.D.P.T., KUBOTA, L.T., 2002, "Enzymeless Biosensors: Uma Nova Área para o Desenvolvimento de Sensores", *Química Nova*, v. 25, n.1, pp. 123-128.
- SOUZA, D.D., MACHADO, S.A.S., AVACA, L.A., 2003, "Voltametria de Onda Quadrada. Primeira Parte: Aspectos Teóricos", *Química Nova*, v. 26, n. 1, pp. 81-89.
- SOVIC, D., GAJOVIC, A., IVEKOVIC, D., 2011, "Bioelectrocatalytic and Biosensing Properties of Horseradish Peroxidase Covalently Immobilized on (3-aminopropyl) trimethoxysilane-modified Titanate Nanotubes", *Electrochimica Acta*, v. 56, n. 26, pp. 9953-9960.
- SU, S., NUTIU, R., FILIPE, C.D. M., *et al.*, 2007, "Adsorption and Covalent Coupling of ATP-binding DNA Aptamers onto Cellulose", *Langmuir*, v. 23, n. 3, pp. 1300-1302.
- SUN, D.M., CAI, C.X., XING, W., *et al.*, 2004, "Direct Electrochemical Reaction of Horseradish Peroxidase Immobilized on the Surface of Active Carbon Powders", *Chinese Chemical Letters*, v. 15, n. 4, pp. 453-454.
- TALBERT, J.N., GODDARD, J.M., 2012, "Enzymes on Material Surfaces", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 93, pp. 8-19, 2012.
- TANGKUARAM, T., PONCHIO, C., KANGKASOMBOON, T., *et al.*, 2007, "Design and Development of a Highly Stable Hydrogen Peroxide Biosensor on Screen Printed Carbon Electrode based on Horseradish Peroxidase bound with Gold

Nanoparticles in the Matrix of Chitosan”, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, n. 9-10, pp. 2071-2078.

THEVENOT, D.R., TOTH, K., DURST, R. A., *et al.*, 2001, “Technical Report Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification”, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, n. 1-2, pp. 121-131.

TOKUDOME, H., MIYAUCHI, M., 2005, “Electrochromism of Titanate-Based Nanotubes”, *Angewandte Chemie International Edition*, v. 44, n. 13, pp. 1974-1977.

TORRES, M.C.L., SOARES, N.F.F., MAIA, J.F., 2004, “Parâmetros Cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua Ativação por Extratos de Vegetais”, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 2, pp 243–248.

TRIPLETT, B.A., MELLON, J.E., 1992, “Purification and Characterization of Anionic Peroxidases from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)”, *Plant Science*, v. 81, n. 2, pp. 147-154.

ULIANA, C.V., RICCARDI, C.S., YAMANAKA, H., 2008a, “Estudo do Comportamento Eletroquímico da Enzima Peroxidase na Presença de Peróxido de Hidrogênio e Ácido 5-aminossalicílico”, *Eclética Química*, v. 33, n. 1, pp. 2-7.

ULIANA, C.V., RICCARDI, C.S., TOGNOLLI, J.O., YAMANAKA, H., 2008b, “Optimization of an Amperometric Biosensor for the Detection of Hepatitis C Vírus using Fractional Factorial Designs”, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 19, n. 4, pp. 782-787.

UMPLEBY, R.J., BAXTER, S.C., CHEN, Y., *et al.*, 2001, “Characterization of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir-Freundlich Isotherm”, *Analytical Chemistry*, v. 73, n. 19, pp. 4584-4591.

VALCÁRCEL, M., CASTRO, M.D., 1994, *Flow-through(Bio)Chemical Sensors*. 1 ed. Amsterdã, Elsevier Science B.V.

VEITCH, N.C., 2004, “Horseradish Peroxidase: A Modern View of a Classic Enzyme”, *Phytochemistry*, v. 65, n. 3, pp. 249-259.

- VELDE, F., LOURENÇO, N.D., PINHEIRO, H.M., *et al.*, 2002, "Carrageenan: A Food-Grade and Biocompatible Support for Immobilisation Techniques", *Advanced Synthesis and Catalysis*, v. 344, n. 8, pp. 815-835.
- VIEIRA, I.C., LUPETTI, K.O., FILHO, O.F., 2003, "Determinação de Paracetamol em Produtos Farmacêuticos usando um Biossensor de Pasta de Carbono Modificado com Extrato Bruto de Abobrinha (*Cucurbita pepo*)", *Química Nova*. v. 26, n.1, pp. 39-43.
- VIEIRA, N.C.S., 2006, *Biossensores de Glicose Nanoestruturados Baseados em Dendrímeros PAMAM e Filmes finos de $In_2 O_3:Sn$* . Dissertação de M.Sc., Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, MG, Brasil.
- VOJINOVIĆ, V., AZEVEDO, A.M, MARTINS, V.C.B., CABRAL, J.M.S., GIBSON, T.D., FONSECA, L.P., 2004, "Assay of H_2O_2 by HRP catalysed co-oxidation of phenol-4-sulphonic acid and 4-aminoantipyrine: characterisation and optimisation". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 28, n. 2-3, pp. 129-135.
- WADE, A.P., DAVID, B., BAILEY, M.N.,*et al.*,1991, "An Analytical Perspective on Acoustic Emission", *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 9, pp. 497-507.
- WAN, M.M., LIN, W.G., GAO, L., *et al.*, 2012, "Promoting Immobilization and Catalytic Activity of Horseradish Peroxidase on Mesoporous Silica through Template Micelles", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 377, n. 1, pp. 497-503.
- WANEKAYA, A.K., CHEN, W., MYUNG, N.V., *et al.*, "Conducting Polymer Nanowire-Based Biosensors". In: Marks, R., Cullen, D. C., Karube, I., Lowe, C. R., Weetall, H. H., *Handbook of Biosensors and Biochips* , chaper 51, New Delhi, Índia, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.
- WANG, J., 2000, *Analytical Electrochemistry*. 2 ed. USA, John Wiley & Sons, Inc.
- WANG, J., 2005, "Nanomaterial-based Electrochemical Biosensors", *The Analyst*, v. 130, n. 4, p. 421-426.
- WANG, J., 2006, "Electrochemical Biosensors: Towards point-of-care Cancer Diagnostics", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 21, n. 10, pp. 1887-1892.
- WANG, J., NASER, N., ANGNES, L., *et al.*, 1992, "Metal-Dispersed Carbon Paste Electrodes", *Analytical Chemistry*, v. 64, n. 11, pp. 1285-1288.

- WANG, Y., DU, J., LI, Y. *et al.*, 2012a, "A amperometric Biosensor for Hydrogen Peroxide by Adsorption of Horseradish Peroxidase onto Single-Walled Carbon Nanotubes", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 90, pp. 62-67.
- WANG, Q., KROMKA, A., HOUDKOVA, J., *et al.*, 2012b, "Nanomolar Hydrogen Peroxide Detection using Horseradish Peroxidase Covalently Linked to Undoped Nanocrystalline Diamond Surfaces", *Langmuir*, v. 28, n. 1, pp. 587-592.
- WANG, Y., HASEBE, Y., 2012, "Uricase-adsorbed Carbon-felt Reactor coupled with a Peroxidase-modified Carbon-felt-based H₂O₂ Detector for Highly Sensitive Amperometric flow determination of Uric Acid", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 57, pp. 125-32.
- WANG, A.J., ZHANG, P.P., LI, Y.F., *et al.*, 2011, "Hydrogen Peroxide Sensor based on Glassy Carbon Electrode Modified with β -Manganese Dioxide Nanorods", *Microchimica Acta*, v. 175, n. 1-2, pp. 31-37.
- WANG, W., VARGHESE, O.K., PAULOSE, M., GRIMES, C., 2004, "A study on the Growth and Structure of Titania Nanotubes", *Journal of Materials Research*, v. 19, n. 2, pp. 417-422.
- WEI, N., XIN, X., DU, J., *et al.*, 2011, "A Novel Hydrogen Peroxide Biosensor based on the Immobilization of Hemoglobin on Three-dimensionally Ordered Macroporous (3DOM) Gold-nanoparticle-doped Titanium Dioxide (GTD) Film", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 26, n. 8, pp. 3602-3607.
- WELCH, C.M., COMPTON, R.G., 2006, "The Use of Nanoparticles in Electroanalysis: A Review", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 384, n. 3, pp. 601-619.
- WHITE, L., TRIPP, C., 2000, "Reaction of (3-Aminopropyl)dimethylethoxysilane with Amine Catalysts on Silica Surfaces", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 232, n. 2, pp. 400-407.
- WU, F., XU, J., TIAN, Y., *et al.*, 2008, "Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase on TiO₂ Nanotube Arrays via Seeded-growth Synthesis", *Biosensors & Bioelectronics*, v. 24, n. 2, pp. 198-203.

- WU, L., ZHANG, X., JU, H., 2007, "Highly sensitive flow injection detection of hydrogen peroxide with high throughput using a carbon nanofiber-modified electrode", *Analyst*, v. 132, n. 5, p. 406-408.
- XIALING, C., LIN, M., 2009, "Horseradish Peroxidase Catalyzed Free Radical Cannot Free Move in Reaction Solution", *Journal of Biochemical Technology*, v. 1, n. 4, pp. 92-95.
- XIAO, P., GARCIA, B.B., GUO, Q., *et al.*, 2007, "TiO₂ Nanotube Arrays Fabricated by Anodization in Different Electrolytes for Biosensing", *Electrochemistry Communications*, v. 9, n. 9, pp. 2441-2447.
- XIAO, P., ZHANG, Y., CAO, G., 2011, "Effect of Surface Defects on Biosensing Properties of TiO₂ Nanotube Arrays", *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 155, n. 1, pp. 159-164.
- XIONG, L., CHEN, C., CHEN, Q., *et al.*, 2011, "Adsorption of Pb(II) and Cd(II) from Aqueous Solutions Using Titanate Nanotubes prepared via Hydrothermal Method", *Journal of Hazardous Materials*, v. 189, n. 3, pp. 741-748.
- XU, F., SUN, Y., ZHANG, Y., *et al.*, 2011, "Graphene–Pt Nanocomposite for Nonenzymatic Detection of Hydrogen Peroxide with Enhanced Sensitivity", *Electrochemistry Communications*, v. 13, n. 10, pp. 1131-1134.
- XU, Q., MAO, C., LIU, N.N., *et al.*, 2006, "Direct electrochemistry of horseradish peroxidase based on biocompatible carboxymethyl chitosan-gold nanoparticle nanocomposite", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, n. 5, pp. 768-773.
- YAN, Q., WANG, Z., ZHANG, J., *et al.*, 2012, "Nickel Hydroxide Modified Silicon Nanowires Electrode for Hydrogen Peroxide Sensor Applications", *Electrochimica Acta*, v. 61, n.1, pp. 148-153.
- YI, X., HUANG, J.X., YUAN, C.H., 2000, "Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase Immobilized on a Colloid/cysteamine-modified Gold Electrode", *Analytical biochemistry*, v. 278, n. 1, pp. 22-28.
- YOGESWARAN, U., CHEN, S.M., 2008, "A Review on the Electrochemical Sensors and Biosensors Composed of Nanowires as Sensing Material", *Sensors*, v. 8, n. 1, pp. 290-313.

- YU, X., CHATTOPADHYAY, D., GALESKA, I., 2003, "Peroxidase activity of enzymes bound to the ends of single-wall carbon nanotube forest electrodes", *Electrochemistry Communications*, v. 5, n. 5, pp. 408-411.
- ZAIA, D.A.M., ZAIA, C.T.B.V, LICHTIG, J., 1998, "Determinação de Proteínas Totais vis Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes", *Química Nova*, v. 21, n. 6, pp. 787–793.
- ZANELO, P., 2003, *Inorganic Electrochemistry, Theory, Practice and Application*. 1 ed. UK, RSC Advancing the Chemical Sciences.
- ZHANG, L., LI, H., NI, Y., *et al.*, 2009, "Porous cuprous oxide microcubes for non-enzymatic amperometric hydrogen peroxide and glucose sensing", *Electrochemistry Communications*, v. 11, n. 4, pp. 812-815.
- ZHANG, L., ZHAI, Y., GAO, N., *et al.*, 2008, "Sensing H₂O₂ with layer-by-layer Assembled Fe₃O₄–PDDA Nanocomposite Film", *Electrochemistry Communications*, v. 10, n. 10, pp. 1524-1526.
- ZHANG, L., ZHANG, Q., LU, X., *et al.*, 2007, "Direct Electrochemistry and Electrocatalysis based on Film of Horseradish Peroxidase Intercalated into Layered Titanate Nano-Sheets", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 23, n. 1, pp. 102-106.
- ZHANG, Y., HE, P., HU, N., 2004, "Horseradish Peroxidase Immobilized in TiO₂ Nanoparticle Films on Pyrolytic Graphite Electrodes: Direct Electrochemistry and Bioelectrocatalysis", *Electrochimica Acta*, v. 49, n. 12, pp. 1981-1988.
- ZHANG, Y., WILSON, G.S., 1993, "Electrochemical oxidation of H₂O₂ on Pt and Pt + Ir electrodes in physiological buffer and its applicability to H₂O₂ -based biosensors", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 345, pp. 253-271.
- ZHAO, Y.D., ZHANG, W.D., CHEN, H., *et al.*, 2002, "Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase at Carbon Nanotube Powder Microelectrode", *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 87, n. 1, pp. 168-172.
- ZOUNGRANA, T., FINDENEGG, G., NORDE, W., 1997, "Structure, Stability, and Activity of Adsorbed Enzymes", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 190, n. 2, pp. 437-48.

ANEXO A

Técnicas de caracterização físico-química

Difração de raios X (DRX)

O DRX é uma técnica de grande importância na análise de microestrutura, fornecendo informações sobre as espécies cristalinas nelas presentes. Um feixe de raios-X com determinada frequência, segundo um ângulo θ , incide sobre um átomo isolado, como mostrado na Figura A.1. Elétrons deste átomo emitem raios X em todas as direções, sendo o ângulo de reflexão igual ao ângulo de incidência (PADILHA e FILHO, 2004).

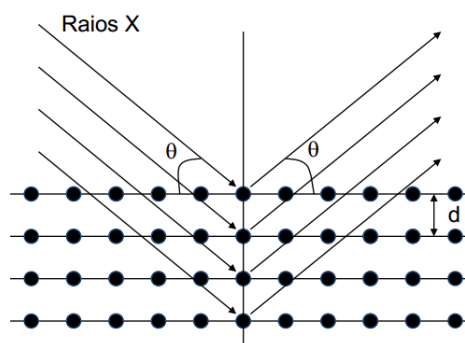


Figura A.1 - Condição de ocorrência da difração de raios X

Em um material onde os átomos estejam arranjados periodicamente no espaço, característico de estruturas cristalinas, o fenômeno de difração de raios X ocorre nas direções de espalhamento que satisfazem a Lei de Bragg, conforme Equação A.1 (CULLITY e STOCK, 1958):

$$n \lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad \text{Equação A.1}$$

onde h, k, l são os índices de Miller do plano cristalográfico (hkl) considerado, d_{hkl} a distância entre dois planos adjacentes, θ o ângulo entre o feixe incidente e o plano considerado, λ comprimento de onda característico da radiação incidente e n define a ordem de reflexão. Observando esta equação, fica claro que as direções para as

quais ocorre a difração são determinadas pela geometria da estrutura cristalina (CULLITY e STOCK, 1958).

Fluorescência de raios X (FRX)

O FRX é um método quali-quantitativo baseado na medida das intensidades dos raios característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra. Um átomo ao receber uma radiação X de uma fonte de raios X, tem elétrons retirados da camada atômica de menor energia de subníveis mais internos, deixando uma vacância. Esta é preenchida por um elétron de maior energia. Este processo é acompanhado pela liberação de energia sob a forma de radiação X, que são direcionadas a um sistema chamado dispersivo, coletando e medindo os seus comprimentos de onda. Com isso é possível a identificação e quantificação dos elementos presentes na amostra (SHACKLEY, 2011).

Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman fornece dados baseados na frequência vibracional de ligações químicas. Para isto, utiliza uma fonte de luz monocromática que, ao atingir a amostra, é espalhada por todas as direções, podendo dar origem a fenômenos de difusão inelástica e elástica. Na difusão inelástica, pequena parcela da luz é espalhada com frequência diferente da incidente, ou seja, o fóton excita a molécula, cedendo a ela parte de sua energia inicial. Este efeito foi intitulado efeito Raman e essas trocas de energia dão origem aos picos no espectro Raman (LEWIS e EDWARDS, 2001)

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) com detectores de energia dispersiva de raios X (MEV/EDS)

O MEV permite caracterizar a morfologia de materiais sólidos. A imagem da amostra é obtida pela utilização de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro, ponto a ponto, por linhas sucessivas. Parte do feixe eletrônico sofre reflexão, na interação dos elétrons com a superfície da amostra. Este feixe é controlado pela diferença de potencial variável existente entre dois eletrodos. Esta voltagem variável permite a

variação da aceleração dos elétrons, sendo possível conseguir imagens mais ou menos profundas da amostra (DEDAVID *et al.*, 2007).

O detector de energia dispersiva de raios X é um acessório muito importante na caracterização microscópica de materiais. Desta forma é possível obter um espectro com uma série de picos que representam o tipo e a quantidade de cada elemento presente na amostra. Quando o feixe de elétrons incide sobre o material, os elétrons mais externos dos átomos são excitados, mudando de níveis energéticos. Esta energia adquirida é liberada ao retornarem à sua posição original, sendo emitida em comprimento de onda no espectro de raios X. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV, mede energia associada ao elétron, sendo possível identificar os elementos químicos presentes, já que os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas (VIEIRA, 2006).

Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho baseia-se na absorção de radiação infravermelha por moléculas, convertendo em energia de vibração molecular. Isto fornece dados sobre a frequência vibracional das moléculas existentes na amostra. Ela baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração que são específicas, onde cada ligação presente na molécula absorve em um comprimento de onda. O espectro é obtido em forma de bandas, pois a cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a mudanças de níveis de energia rotacional (SILVERSTEIN, 2006).

Espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV/vis)

A espectroscopia UV/vis utiliza energia dos fótons na região do ultravioleta-visível e do espectro eletromagnético, onde as moléculas sofrem transições eletrônicas e moleculares. No máximo de absorção (λ) é possível estabelecer, por exemplo, relações com a concentração de substâncias (QUEIROZ *et al.*, 2002).

Potencial Zeta

A suspensão de nanomateriais dispersos em um meio líquido dá origem a uma suspensão do tipo coloidal, que pode adquirir carga por diversos mecanismos. Quanto maior a carga, mais intensas serão as forças de repulsão eletrostática entre as partículas. Ao conjunto partícula mais íons em solução se chama camada elétrica dupla. A camada mais interna é conhecida como camada de Stern e a região externa é a camada difusa. O potencial na região em que a camada limite de Stern termina e a camada difusa móvel começa é o potencial zeta (ζ) ou potencial eletrocinético (Figura A.2). O potencial zeta é uma medida da diferença do potencial elétrico das partículas em suspensão e o meio em que estão suspensas. A concentração de íons que determinam em que o potencial zeta é zero ($\zeta = 0$) é chamado de ponto isoelétrico (IEP) (BUTT *et al.*, 2001).

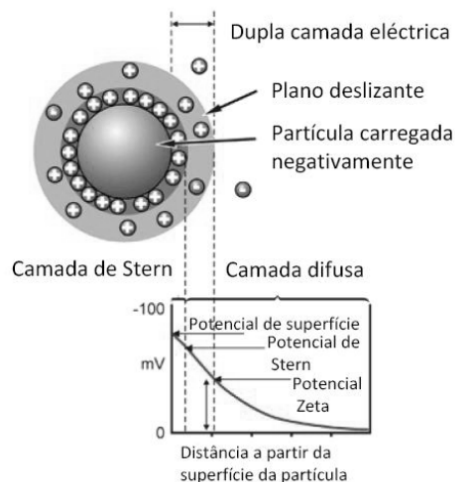


Figura A.2 - Representação esquemática do potencial zeta (Adaptado de GARCIA, 2010).

A determinação do potencial zeta pode ser feita a partir do fenômeno eletrocinético da eletroforese. O cálculo pode ser feito a partir da equação de Smoluchowski (Equação A.2):

$$\zeta = \frac{4\pi\eta v}{\epsilon_d \epsilon_0}$$

Equação A.2

onde η é a viscosidade do meio, v é a mobilidade eletroforética, ϵ_d é a constante dielétrica e ϵ_0 é a permissividade do ar.

ANEXO B

Método Bradford para dosagem de proteínas totais

Preparo dos reagentes:

Solução de Azul Brilhante de Coomassie 100 mg L⁻¹. Para o preparo de 1 L deste reagente, pesou-se 0,1 g do reagente Azul Brilhante de Coomassie G e dissolveu-se em 50 mL de etanol 95% sob agitação constante por 20 minutos. Após este período, adicionou-se 100 mL de ácido ortofosfórico 85%, mantendo sob agitação por cerca de 1 hora para completa homogeneização. Em seguida, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 L e completado o volume com água destilada. A solução era armazenada a 4°C em frasco âmbar, já que o mesmo é fotossensível. Sempre antes do uso, o reagente era filtrado.

Solução de Albumina de Soro Bovina (BSA, bovine serum albumin) 0,1 g L⁻¹. Pesou-se 100 mg de BSA e esta foi diluída em água Mili-Q e completou-se o volume para 100 mL em balão volumétrico. A cada dia de análise, esta solução era preparada.

Determinação da Curva de Calibração.

A curva padrão foi construída com valores de concentração conhecidos na faixa de 0,02 a 0,1 g L⁻¹ de solução BSA. Os resultados foram comparados a esta curva, permitindo a determinação da concentração da HRP. As amostras foram preparadas misturando 1 mL da solução Azul Brilhante de Coomassie a 0,1 mL da solução a ser analisada, com tempo de reação de 10 minutos. Após este período, era realizada a leitura no comprimento de onda de 595 nm. A cada dia de análise era construída uma curva de calibração, dada a instabilidade do reagente Azul Brilhante de Coomassie.

ANEXO C

Determinação da atividade específica (U/mg) da HRP

Preparo das soluções:

Solução 0,0017M de peróxido de hidrogênio. Diluiu-se 1 mL de peróxido de hidrogênio para 100 mL de água Milli-Q. Desta solução, retirou-se a alíquota de 1 mL e diluiu-se para 50 mL de 0,1 M de tampão fosfato de potássio pH 7,0.

Solução 0,0025 M de 4-aminoantipirina com 0,17 M de fenol. Esta solução foi preparada dissolvendo 810 mg de fenol e 25 mg de a-aminoantipirina em água Milli-Q e completando para um balão volumétrico de 50 mL.

A mistura de reação (3 mL) continha 1,5 mL da solução 0,0017 M de peróxido de hidrogênio e 1,4 mL da solução 0,0025 M de 4-aminoantipirina com 0,17 M de fenol. A mistura era incubada em espectrofotômetro em 510nm a temperatura ambiente, estabelecendo a taxa de branco. Após, era adicionado 0,1 mL da amostra e registrado o aumento da absorvância por 5 minutos. A amostra era diluída em água para obter uma taxa de 0,02 a 0,04 $\Delta A(510\text{nm})/\text{min}$. Isto possibilita o cálculo da $\Delta A(510\text{nm})/\text{min}$ da porção linear da curva, onde a atividade específica (U/mg) é dada pela equação C.1:

$$U/mg = \frac{\Delta A(510)/min}{6,58 * \frac{mg \text{ enzima}}{3 mL}} \quad \text{Equação C.1}$$

onde mg_{enzima} era determinado pelo método de Bradford como detalhado no Anexo B. A mistura de reação foi preparada imediatamente antes da utilização.

ANEXO D

Técnicas eletroquímicas

Com o objetivo de se obter informações sobre propriedades intrínsecas de substâncias, as técnicas eletroquímicas estão cada vez mais sendo utilizadas nas mais diversas áreas. As técnicas eletroquímicas são empregadas em estudos de processos de oxidação e redução de espécies em diferentes meios, adsorção em superfícies e mecanismos de transferência de elétrons (SKOOG, 2007). Além disso, permitem estabelecer relações diretas entre a concentração do analito e alguma propriedade elétrica, como a corrente, por exemplo (SOUZA *et al.*, 2003).

Métodos eletroquímicos são baseados em processos eletroquímicos que ocorrem na superfície de um eletrodo. Com a aplicação de um potencial/corrente, o sinal elétrico muda devido a uma reação eletroquímica na superfície do eletrodo. Desta forma, a detecção eletroquímica se baseia no monitoramento do sinal elétrico devido a estas mudanças (ARYA *et al.*, 2007). Em uma solução, o equilíbrio das concentrações das espécies reduzidas e oxidadas de um par redox, estão relacionadas ao potencial (E) através da equação de Nernst (Equação D.1).

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{ox}}{C_{red}} \quad \text{Equação D.1}$$

Nesta equação, E^0 é o potencial formal padrão, F é a constante de Faraday, T é a temperatura, C_{ox} e C_{red} são as concentrações das espécies oxidadas e reduzidas (BARD e FAULKNER, 2001). O potencial padrão (E^0) existe para cada par redox onde se estabelece um equilíbrio entre as concentrações das formas reduzidas e oxidadas. Estes processos podem ser compreendidos através da voltametria (ARYA *et al.*, 2007).

Dentre as técnicas eletroanalíticas, a voltametria investiga a relação da corrente com o potencial aplicado em células eletroquímicas com o uso de três eletrodos, sendo eles: eletrodo de trabalho, contra eletrodo e eletrodo de referência (ARYA *et al.*, 2007). O eletrodo de trabalho é onde ocorre a reação de interesse, podendo ser

composto de diferentes materiais, tais como carbono, ouro, prata, cobre, platina, níquel, paládio, etc. O eletrodo de referência permite o monitoramento do potencial no eletrodo de trabalho, sendo usualmente empregado o eletrodo de calomelano saturado (ECS) e o Ag/AgCl. O eletrodo auxiliar tem o papel de controlar a corrente necessária para sustentar a eletrólise que ocorre no eletrodo de trabalho (SKOOG, 2007). Em biossensores, estas técnicas são empregadas na sua caracterização e obtenção de dados de quantificação.

Voltametria Linear e Voltametria Cíclica

As técnicas de varredura do potencial são provavelmente os métodos mais usados para o estudo de processos eletroquímicos. Elas consistem na aplicação contínua de um potencial (E) no eletrodo de trabalho, que é variado com o tempo (t) (BRETT e BRETT, 1993).

Na voltametria linear, o potencial no eletrodo é variado de um valor inicial (E_i) a um valor final (E_f), numa velocidade de varredura constante (v), conforme Figura D.1 (A) (BRETT e BRETT, 1993). Na voltametria cíclica, o potencial é aplicado em forma de rampa, onde uma vez que o potencial E_f é atingido, a direção de varredura é invertida até atingir E_i , conforme Figura D.1 (B) (AYRA *et al*, 2007).

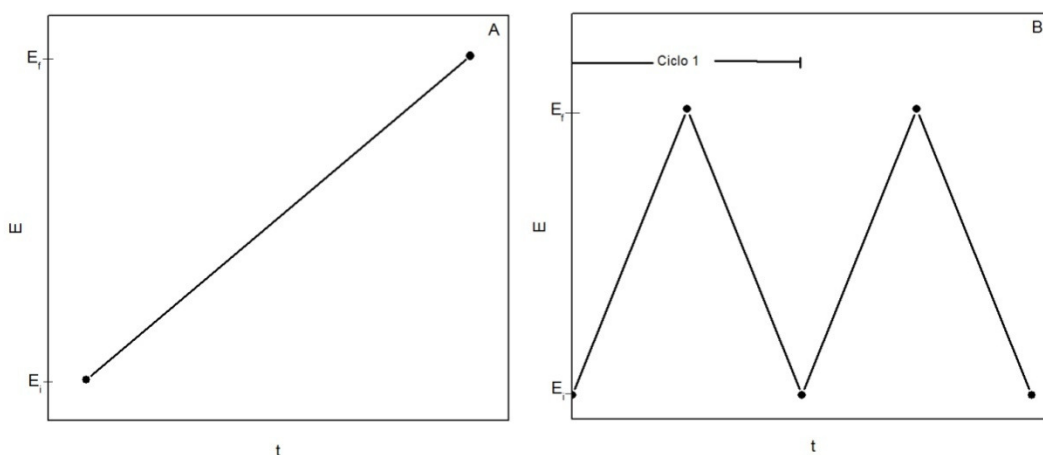


Figura D.1 - Variação do potencial aplicado com o tempo: (A) Voltametria linear e (B) Voltametria cíclica.

A voltametria cíclica (CV – cyclic voltammetry) é utilizada com freqüência no estudo de reações redox, com a finalidade de descobrir o potencial no qual o processo redox ocorre e a reversibilidade do sistema (ZANELO, 2003). A reversibilidade eletroquímica está associada à troca de elétrons entre as espécies redox e o eletrodo (WANG, 2000). Também é aplicada na detecção de intermediários de reação, na observação e acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos e avaliar se um material é condutor (ZANELO, 2003).

O potencial é aplicado pela varredura do potencial, sendo medida a intensidade da corrente resultante dos fenômenos que ocorrem na interface eletrodo e solução (BARD e FAULKNER, 2001). Um voltamograma típico é apresentado na Figura D.2.

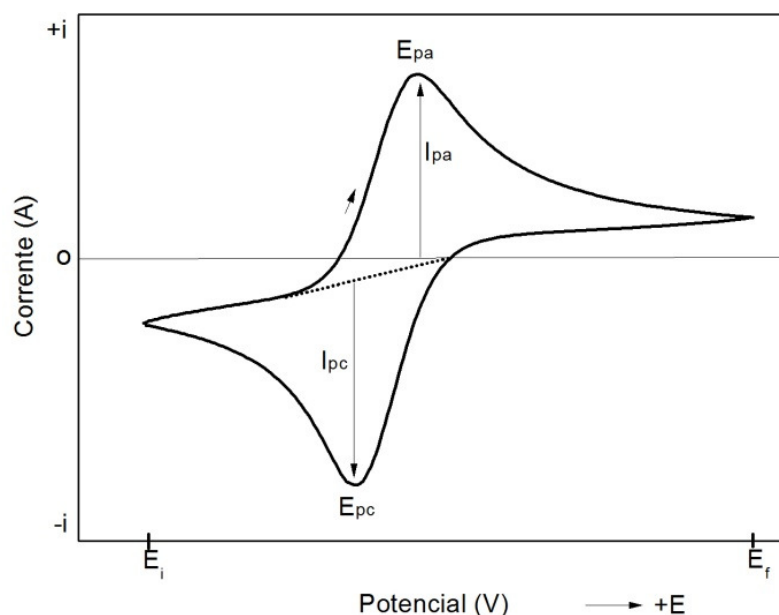


Figura D.2 - Voltamograma típico da voltametria cíclica.

A verificação do potencial para frente (no sentido anódico, ou de potenciais mais positivos), produz um pico de corrente anódico (I_{pa}), devido à oxidação do analito no potencial de pico anódico (E_{pa}). A corrente aumenta a medida que o potencial alcança o potencial de oxidação do analito, mas, em seguida, cai pois a concentração da espécie oxidada diminui próxima à superfície do eletrodo. Em seguida, o potencial aplicado é invertido, atingindo o potencial em que a redução do produto formado durante a varredura anterior inicia. Desta forma, surge o pico de corrente catódico (I_{pc}) no potencial de pico catódico (E_{pc}). Outros parâmetros importantes em voltametria cíclica são o potencial de meia onda ($E_{1/2}$) e potencial de inversão (E_{λ}) (ZANELO, 2003).

Equações matemáticas que correlacionam os componentes do voltamograma (E_{pa} , E_{pc} , I_{pa} , I_{pc}) podem descrever o comportamento das espécies presentes. Informações como reversibilidades, quase reversibilidades e irreversibilidades do processo de transferência de elétrons, presença de reações químicas acopladas, adsorção e determinação do fenômeno que controla a corrente de pico, podem ser obtidas (BARD e FAULKNER, 2001).

Em processos reversíveis, a taxa de transferência de elétrons é maior que a taxa de transferência de massa, e o pico de corrente é dado pela equação de Randles-Sevcik (Equação D.2), onde a corrente é proporcional a concentração e aumenta com a raiz quadrada da velocidade de varredura à 25°C.

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

onde n é o número de elétrons, A é a área do eletrodo (cm^2), C é a concentração (mol cm^{-3}), D é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), e v é a velocidade de varredura do potencial (V s^{-1}) (WANG, 2000).

No critério de reversibilidade, o potencial formal redox (E^0) é centrado entre os potenciais E_{pc} e E_{pa} , sendo definido como potencial de meia onda ($E_{1/2}$), conforme descrito pela equação D.3 (WANG, 2000):

$$E^0 = E_{1/2} = \frac{E_{pc} + E_{pa}}{2} \quad \text{Equação D.3}$$

Existem ainda outras propriedades relacionadas (BRETT e BRETT, 1993):

- a) O potencial de pico independe da taxa de varredura;
- b) A separação dos potenciais E_{pc} e E_{pa} é dada pela equação D.4.

$$\Delta E_p (mV) = \frac{E_{pc} - E_{pa}}{n} \cong \frac{0,059}{n} \quad \text{Equação D.4}$$

- c) Obedecendo ao critério (a), esse valor é constante com a velocidade de varredura;

d) A relação I_{pc} e I_{pa} deve ser, aproximadamente, igual a 1, conforme equação D.5.

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} \cong 1 \quad \text{Equação D.5}$$

A corrente de pico (I_p) é diretamente proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura do potencial (I_p vs $v^{1/2}$).

Em processos irreversíveis, a taxa de transferência de elétrons é menor do que a taxa de transferência de massa, e algumas propriedades podem ser relacionadas ao potencial (BRETT e BRETT, 1993):

- a) O potencial de pico (E_p) muda com a taxa de varredura, geralmente no sentido de valores mais catódicos para processos de redução;
- b) A relação I_{pc} e I_{pa} não existe;
- c) A corrente de pico (I_p) é diretamente proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura do potencial (I_p vs $v^{1/2}$).

Em alguns casos, em baixas velocidades de varredura (v), o sistema pode ser reversível e irreversível se aumentar a velocidade. A taxa de transferência de elétrons é da mesma ordem de grandeza que a taxa de transferência de massa (WANG, 2010). Neste caso, o processo é denominado *quasi-reversível*, e apresenta as seguintes características (BRETT e BRETT, 1993):

- a) O potencial de pico (E_p) é maior que $59/n$ (mV), e aumenta gradativamente com o aumento da velocidade de varredura (v);
- b) A relação $I_p/v^{1/2}$ pode não ser constante.

A Figura D.3 apresenta uma ilustração dos três processos possíveis.

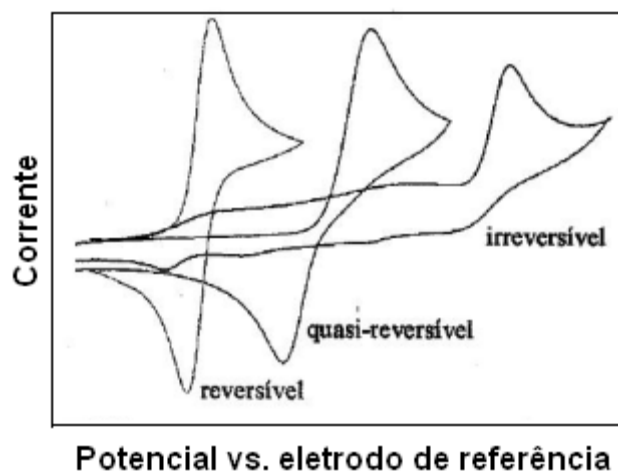


Figura D.3 - Voltametria cíclica de processos reversíveis, quase-reversíveis e irreversíveis (Adaptado de FISHER, 1996).

Cronoamperometria

A cronoamperometria é uma técnica eletroquímica baseada em situações dinâmicas, ou seja, de fluxo de corrente através de um potencial controlado. A aplicação do potencial no eletrodo de trabalho força uma mudança nas concentrações das espécies eletroativas na superfície do eletrodo por meio da reação redox (Figura D.4 (a)) (ZANELO, 2003). A transferência de massa para o eletrodo ocorrerá por difusão e a corrente resultante é medida como uma função do tempo (Figura D.4 (b)) (BARD e FAULKNER, 2001).

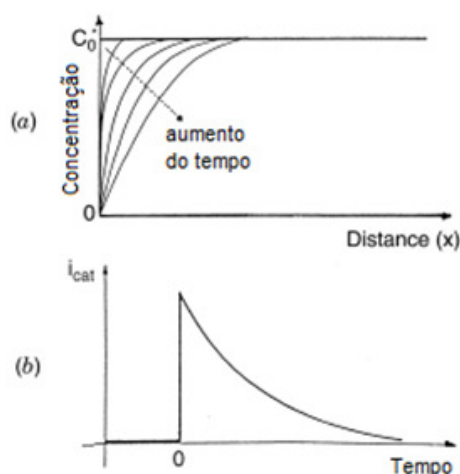


Figura D.4 - Experimento cronoamperométrico: (a) aplicação do potencial com o tempo; (b) mudança dos perfis de concentração com o tempo; (c) resultado da resposta da corrente com o tempo (Adaptado de WANG, 2010).

O fluxo de corrente é correlacionado com o gradiente de concentração das espécies oxidadas na superfície do eletrodo de trabalho por meio da equação de Cottrell (BRETT e BRETT, 1993):

$$I(t) = \frac{nFAD^{1/2}C_{\infty}}{(\pi t)^{1/2}} = bt^{-1/2} \quad \text{Equação D.6}$$

onde: $I(t)$ é a corrente a um tempo t (s), n é o número de elétrons envolvidos na reação, F é a constante de Faraday, A é a área geométrica do eletrodo (cm^2), D é o coeficiente de difusão das espécies oxidadas ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e C_{∞} é a concentração no bulk das espécies oxidadas (mol cm^{-3}).

Dentre as técnicas coulométricas, a cronoamperometria é uma importante ferramenta para utilização com biossensores amperométricos, pois o potencial aplicado ao biossensor promove a reação eletroquímica para a quantificação do analito de interesse.

ANEXO E

Procedimento básico para teste em Voltametria Cíclica

Equipamentos

- ✓ Potenciostato Palm Sens;
- ✓ Célula eletroquímica e eletrodos
 - Eletrodo de pasta de carbono com orifício de 3 mm como eletrodo de trabalho;
 - Eletrodo de Pt como eletrodo auxiliar;
 - Ag/AgCl como eletrodo de referência.

Soluções químicas

100 mL de solução estoque de 5 mmol L⁻¹ de ferrocianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆] em 0,1 mol L⁻¹ de nitrato de potássio (KNO₃);

Procedimento

1. Prepare o eletrodo de pasta de carbono. Prepare a pasta de carbono na proporção de 75% de pó de grafite em óleo mineral. Homogeneize esta mistura com grau e pistilo por 20 minutos até completa homogeneização da mistura. Insira a mistura no orifício do eletrodo e compacte a mesma;
2. Prepare solução 0,5 mmol L⁻¹ de ferrocianeto em 0,1 M de KNO₃ num volume de 50 mL;
3. Insira os eletrodos na célula e encha a célula com 5 mmol L⁻¹ de ferrocianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆] em 0,1 mol L⁻¹ de nitrato de potássio (KNO₃), até que os eletrodos sejam imersos. Antes de iniciar a análise, homogeneize a solução com um agitador magnético, para que a solução entre em equilíbrio;
4. Ajuste o equipamento para que a varredura seja realizada no intervalo de potencial inicial (E_i) de 600 mV ao potencial final (E_f) de 0,0 mV na velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Repita a agitação da solução na célula por 10 a 15 segundos. Desligue a agitação e realize a varredura nas mesmas

- condições anteriores. Os dois voltamogramas devem ter no máximo diferenças de um em relação ao outro de 2 a 3 %;
5. Realize as varreduras do potencial com solução de ferrocianeto na velocidade de 100 mV s^{-1} ;
 6. Realize as varreduras do potencial com solução de ferrocianeto nas velocidades de 20, 50, 200 e 500 mV s^{-1} .

Análise dos dados e discussão

1. Compare os voltamogramas cíclicos para soluções de ferrocianeto com os obtidos pela literatura, como da Figura E.1;
2. Plote I_p vs $v^{1/2}$ e verifique a reversibilidade do sistema;
3. Avalie a relação I_{pc}/I_{pa} , sendo que para este sistema reversível deve ser igual a uma unidade.

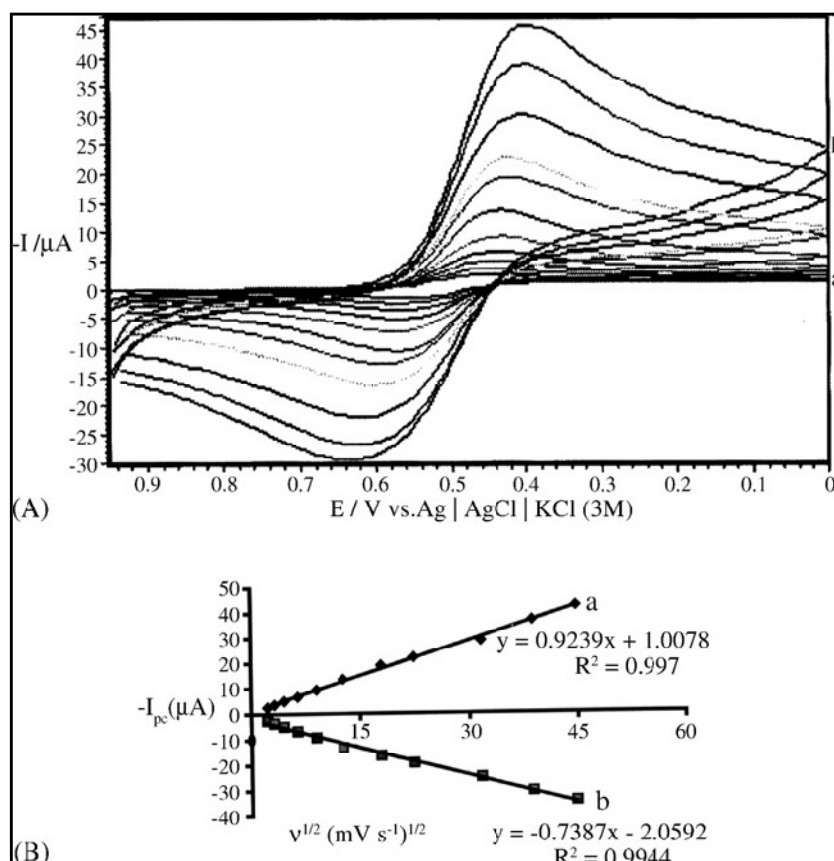


Figura E.1 - (A) Voltamograma cíclico de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferricianeto em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KNO_3 em eletrodo de pasta de carbono em várias velocidades de varredura: 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 500, 1000, 1500 e 2000 mV s^{-1} . (B) Correntes de pico catódico (a) e correntes de pico anódico (b) (Adaptado de OJANI et al, 2006).

ANEXO F

Avaliação da velocidade de reação

Tabela F.1 - Taxa da reação (Abs/min) das concentrações da solução de H₂O₂

Tempo (min)	0,0001			0,0003			0,0005			0,0007			0,001		
	Medidas			Medidas			Medidas			Medidas			Medidas		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	0,008	0,006	0,01	0,01	0,05	0,015	0,011	0,015	0,005	0,01	0,02	0,018	0,01	0,002	0,019
1	0,022	0,021	0,02	0,051	0,05	0,052	0,073	0,076	0,074	0,08	0,08	0,082	0,089	0,09	0,091
2	0,04	0,041	0,042	0,094	0,091	0,095	0,135	0,139	0,137	0,151	0,15	0,152	0,164	0,165	0,167
3	0,057	0,056	0,058	0,137	0,135	0,138	0,195	0,197	0,197	0,23	0,24	0,22	0,235	0,236	0,239
4	0,074	0,075	0,076	0,177	0,176	0,176	0,255	0,258	0,255	0,285	0,288	0,287	0,309	0,31	0,311
5	0,089	0,077	0,095	0,217	0,22	0,205	0,311	0,32	0,303	0,349	0,48	0,452	0,379	0,35	0,398

Tabela F.2 - Dados de velocidade inicial (V_0) a partir da taxa de reação

$[\text{H}_2\text{O}_2]$ (mmol L^{-1})	Coefficiente angular = V_0	Média	DP	Erro
0,1	0,0165	0,016367	0,001106	0,002212
	0,0152			
	0,0174			
0,3	0,0416	0,038967	0,00265	0,0053
	0,0363			
	0,039			
0,5	0,0602	0,060267	0,000503	0,001007
	0,0608			
	0,0598			
0,7	0,0683	0,078633	0,00924	0,01848
	0,0861			
	0,0815			
1	0,0736	0,0731	0,002291	0,004583
	0,0706			
	0,0751			

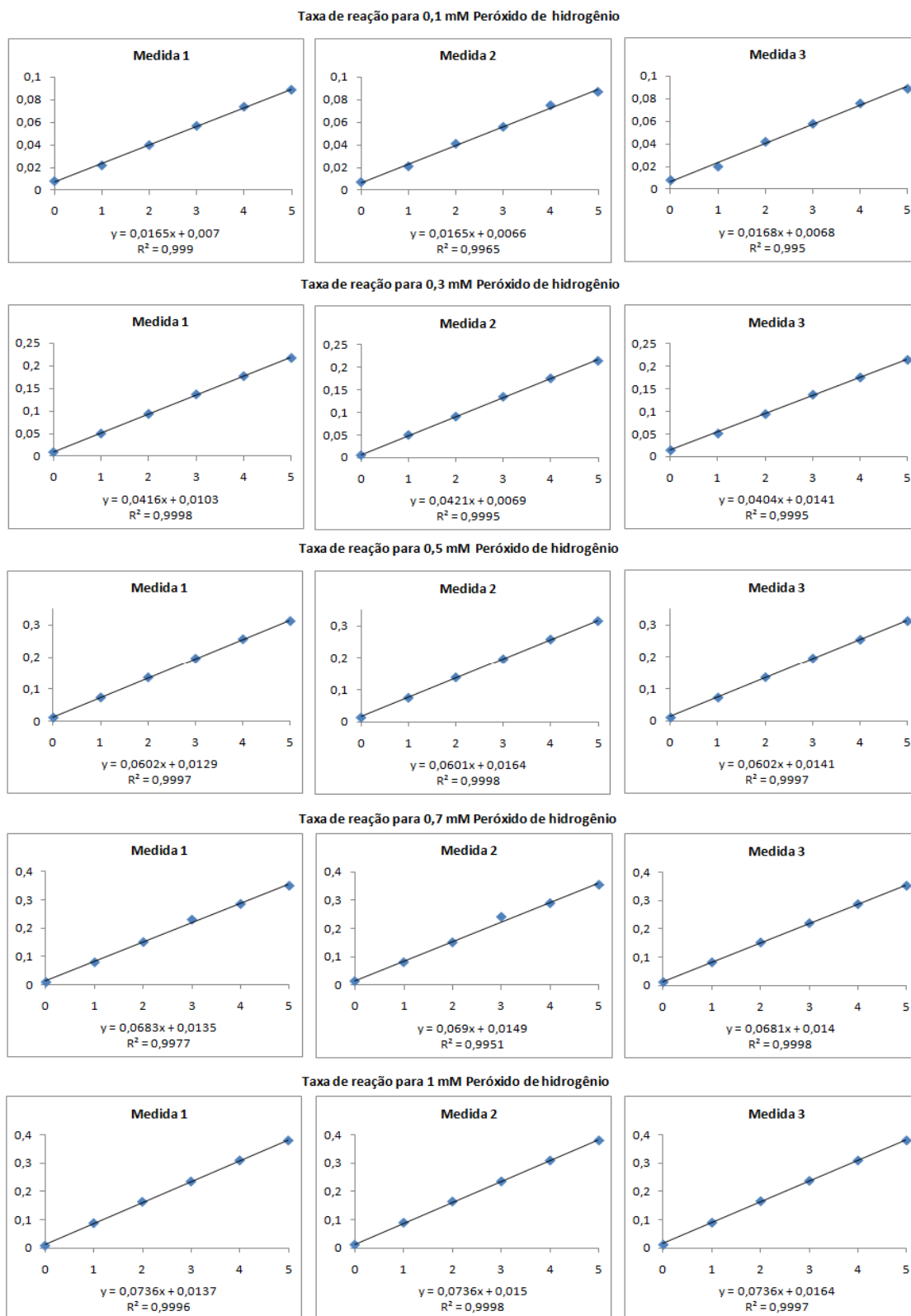


Figura F.1 – Taxa de reação (Abs/min) para as concentrações de H₂O₂.

ANEXO G

Dados experimentais de ensaios de adsorção não específica

Cinética de adsorção

Tabela G.1 - Dados de concentração de equilíbrio da HRP.

Massa de NT (mg)	Concentração de equilíbrio (mg/mL)						
	0	1	3	5	8	20	24
0,5	0,4306	0,200	0,197	0,197	0,200	0,144	0,144
1	0,4306	0,128	0,125	0,150	0,135	0,094	0,094
2	0,4306	0,128	0,125	0,132	0,141	0,088	0,088
4	0,4306	0,132	0,128	0,122	0,125	0,085	0,094

Tabela G.2 - Dados de massa de HRP adsorvida.

m ² NTT	mg HRP/m ² NTT						
	0	1	3	5	8	20	24
0,059	0	3,902	3,955	3,955	3,902	4,857	4,857
0,118	0	2,561	2,588	2,376	2,508	2,853	2,853
0,236	0	1,281	1,294	1,267	1,228	1,453	1,453
0,472	0	0,634	0,640	0,654	0,647	0,733	0,713

Considerado erro constante referente a triplicata do ponto central: 0,176412 mg HRP/m² NTT. erro = baseado em 98% de confiança (2 * desvio padrão).

Isoterma de adsorção

Tabela G.3 - Concentração de equilíbrio (mg HRP/mL).

M1	M2	M3	Média	erro
1,469	1,425	1,465	1,447	0,062
0,873	0,912	0,873	0,886	0,046
0,405	0,356	0,388	0,383	0,049
0,276	0,241	0,258	0,258	0,034
0,122	0,110	0,113	0,115	0,013
0,068	0,077	0,076	0,073	0,010

*M = medida; erro = baseado em 98% de confiança (2 * desvio padrão).

Tabela G.4 - Quantidade de HRP adsorvida (mg HRP/m² NTT).

M1	M2	M3	Média	erro
14,664	16,372	14,785	15,518	2,416
16,111	15,209	16,111	15,660	1,275
9,125	9,755	9,335	9,440	0,892
1,805	2,029	1,917	1,917	0,316
0,502	0,543	0,533	0,522	0,058
0,139	0,110	0,114	0,125	0,041

*M = medida; erro = baseado em 98% de confiança (2 * desvio padrão).

ANEXO H

Dados experimentais de adsorção covalente por ativação dos grupos amino.

Isoterma de adsorção

Tabela H.1 - Concentração de equilíbrio (mg HRP/mL).			
M1	M2	Média	erro
1,150	1,264	1,210	0,163
0,876	0,103	0,961	0,150
0,500	0,514	0,507	0,021
0,201	0,225	0,210	0,034
0,080	0,117	0,099	0,056
0,072	0,087	0,080	0,023

*M = medida. erro = baseado em 98% de confiança (2 * desvio padrão).

Tabela H.2 - Quantidade de HRP adsorvida (mg HRP/m² NTT).			
M1	M2	Média	erro
6,871	8,28	7,564	2,037
6,734	8,149	7,442	1,872
7,122	7,349	7,280	0,267
2,01	2,163	2,091	0,210
0,486	0,598	0,541	0,175
0,062	0,115	0,089	0,073

*M = medida. erro = baseado em 98% de confiança (2 * desvio padrão).

ANEXO I

Características analíticas do Biossensor

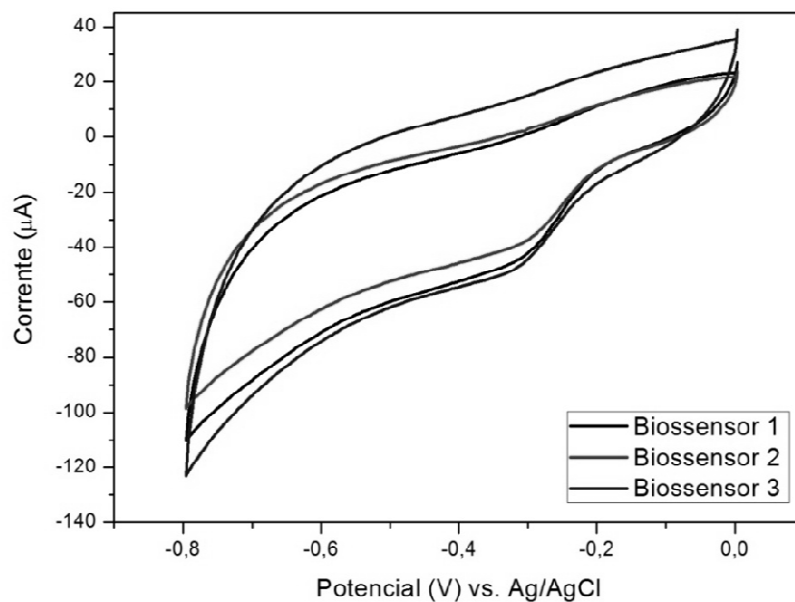


Figura I.1 - Medidas de reprodutibilidade em solução contendo $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS (pH 7,0).

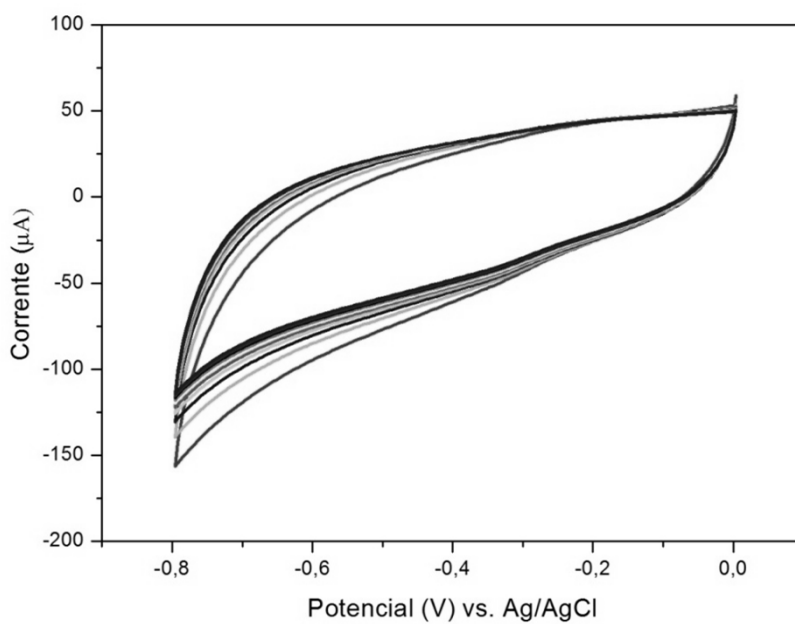


Figura I.2 - Medidas de repetibilidade em solução contendo $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS (pH 7,0).