

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DANIELA BRONDANI

**MATERIAIS NANOESTRUTURADOS E LÍQUIDO IÔNICO
APLICADOS NA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES
PARA COMPOSTOS FENÓLICOS**

Florianópolis – SC

2013

DANIELA BRONDANI

**MATERIAIS NANOESTRUTURADOS E LÍQUIDO IÔNICO
APLICADOS NA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES
PARA COMPOSTOS FENÓLICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iolanda Cruz Vieira

Florianópolis – SC

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Brondani, Daniela

Materiais nanoestruturados e líquido iônico aplicados na construção de biossensores para compostos fenólicos [tese] / Daniela Brondani ; orientadora, Iolanda Cruz Vieira - Florianópolis, SC, 2013.
119 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Biossensores. 3. Materiais nanoestruturados. 4. Líquidos iônicos. 5. Compostos fenólicos. I. Vieira, Iolanda Cruz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

DANIELA BRONDANI

**MATERIAIS NANOESTRUTURADOS E LÍQUIDO IÔNICO
APLICADOS NA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES
PARA COMPOSTOS FENÓLICOS**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Doutor em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 04 de março de 2013.



Prof. Dr. Almir Spinelli
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Iolanda Cruz Vieira
Orientadora (DQ-UFSC)



Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria
Relator (DQ-UFSCar)




Prof.ª Dr.ª Rosa Amália Fireman
Dutra (CTG-UFPE)



Prof. Dr. Almir Spinelli
(DQ-UFSC)



Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos
Madureira (DQ-UFSC)



Prof. Dr. Vanderlei Gageiro
Machado (DQ-UFSC)

*Aos meus pais,
Nestor e Pierina.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por tudo;

Aos meus pais, Nestor e Pierina, e aos meus irmãos, Paula e Marcelo, por todo amor, atenção e incentivo;

Ao meu namorado Eduardo pelo seu amor e compreensão, bem como constante incentivo e discussões críticas referentes aos trabalhos desenvolvidos;

Em especial, à Prof.^a Dr.^a Iolanda Cruz Vieira pela orientação, incentivo e dedicação durante todo o desenvolvimento desta tese;

Ao Prof. Dr. Jairton Dupont pela doação das nanopartículas de platina dispersas em líquido iônico e à Prof.^a Dr.^a Carla Weber Scheeren pela síntese, caracterização e contribuição dada no trabalho em colaboração;

Ao Prof. Dr. Ademir Neves e, em especial, ao doutorando Bernardo de Souza e ao Dr. Bruno Silveira de Souza pela síntese e caracterização das nanopartículas de ouro revestidas com PEI e decoradas com lacase, bem como pela contribuição ativa no trabalho desenvolvido em colaboração;

À empresa Novozymes pela doação da enzima lacase;

À UFSC e a todos os professores do Departamento de Química, especialmente àqueles que contribuíram para minha formação acadêmica;

A todos os professores da banca por aceitarem fazer parte da mesma;

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Biossensores (LaBios) pelos momentos de descontração e por serem tão prestativos sempre que precisei;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

LISTA DE TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO (2010-2013)

- ❖ BRONDANI, D.; SOUZA, B.; SOUZA, B. S.; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. PEI-coated gold nanoparticles decorated with laccase: a new platform for direct electrochemistry of enzymes and biosensing applications. **Biosens. Bioelectron.**, 42, 242–247, 2013.
- ❖ BRONDANI, D.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Halloysite clay nanotubes and platinum nanoparticles dispersed in ionic liquid applied in the development of a catecholamine biosensor. **Analyst**, 137, 3732–3739, 2012.
- ❖ ZAPP, E.; BRONDANI, D.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W. Gold nanoparticles and hydrophobic ionic liquid applied on the development of a voltammetric biosensor for polyphenol determination. **Electroanalysis**, 23, 1124–1133, 2011.
- ❖ FRANZOI, A. C.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; MOCCELINI, S. K.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J. Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. **Quim. Nova**, 34, 1042–1050, 2011.
- ❖ BRONDANI, D.; ZAPP, E.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W. Gold nanoparticles in an ionic liquid phase supported in a biopolymeric matrix applied in the development of a rosmarinic acid biosensor. **Analyst**, 136, 2495–2505, 2011.
- ❖ ZAPP, E.; BRONDANI, D.; VIEIRA, I. C.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J.; BARBOSA, A. M. J.; FERREIRA, V. S. Biomonitoring of methomyl pesticide by laccase inhibition on sensor containing platinum nanoparticles in ionic liquid phase supported in montmorillonite. **Sens. Actuators B**, 155, 331–339, 2011.
- ❖ ZAPP, E.; BRONDANI, D.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W. Bioelectroanalytical determination of rutin based on bi-enzymatic sensor containing iridium nanoparticles in ionic liquid phase supported in clay. **Electroanalysis**, 23, 764–776, 2011.
- ❖ BRONDANI, D.; VIEIRA, I. C.; PIOVEZAN, C.; SILVA, J. M. R.; NEVES, A.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W. Sensor for fisetin based on gold nanoparticles in ionic liquid and binuclear nickel complex immobilized in silica. **Analyst**, 135, 1015–1022, 2010.

RESUMO

Este trabalho relata o desenvolvimento de dois diferentes biossensores enzimáticos construídos a partir de materiais nanoestruturados (nanopartículas metálicas e nanotubos de argila) e líquido iônico. O primeiro biossensor foi construído com nanopartículas de platina dispersas em líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio e peroxidase de broto de trevo (*Trifolium*) imobilizada sobre nanotubos de haloisita. Esse biossensor foi otimizado para a determinação de catecolaminas por voltametria de onda quadrada, apresentando os seguintes limites de detecção: 0,05, 0,06, 0,07, 0,12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para dopamina, isoproterenol, dobutamina e epinefrina, respectivamente. O biossensor demonstrou alta sensibilidade, repetibilidade e reprodutibilidade, e adequada estabilidade (redução de apenas 18% nas respostas analíticas no decorrer de 180 dias de avaliação). Um estudo de recuperação de dopamina em amostras farmacêuticas resultou em valores 97,5–101,4%. O biossensor proposto foi aplicado com sucesso na determinação de dopamina em amostras farmacêuticas, com um erro relativo máximo de $\pm 1,0\%$, em relação a um método comparativo espectrofotométrico. Já o segundo biossensor foi construído com lacase de *Aspergillus oryzae* imobilizada sobre nanopartículas de ouro revestidas com polietilenoimina. A ocorrência de transferência eletrônica direta entre o centro eletroativo da lacase e a superfície do biossensor foi observada por voltametria cíclica, sugerindo que as nanopartículas de ouro estariam contribuindo para tal processo. A resposta do biossensor indicou um processo controlado por transferência de carga, com constante aparente de velocidade de transferência de elétrons (k_s) de $0,4 \text{ s}^{-1}$, coeficiente de transferência de carga (α) de 0,5, e concentração de espécies eletroativas na superfície do eletrodo (Γ) de $3,45 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. O biossensor otimizado mostrou os seguintes limites de detecção para os compostos fenólicos testados: 0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o catecol e o guaiacol, 0,14 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o pirogalol e 0,21 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a hidroquinona, utilizando voltametria de onda quadrada. O biossensor proposto demonstrou elevada sensibilidade, adequada repetibilidade e reprodutibilidade, e satisfatória estabilidade (decréscimo de apenas 20% na resposta analítica após 90 dias). Este biossensor foi aplicado com sucesso na quantificação de catecol em amostras de água fortificadas.

Palavras-chave: Biossensores. Materiais nanoestruturados. Líquidos iônicos. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

This study reports the development of two different enzyme biosensors constructed from nanostructured materials (metallic nanoparticles and clay nanotubes) and ionic liquid. The first biosensor was constructed with platinum nanoparticles dispersed in 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid and enzyme peroxidase from clover sprouts (*Trifolium*) immobilized on halloysite nanotubes. This biosensor was optimized for the determination of catecholamines by square-wave voltammetry, with the following detection limits: 0.05, 0.06, 0.07, 0.12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for dopamine, isoproterenol, dobutamine and epinephrine, respectively. The biosensor demonstrated high sensitivity, repeatability and reproducibility, and adequate stability (reduction of only 18% in the analytical responses during 180 days of evaluation). A recovery study of dopamine in pharmaceutical samples gave values from 97.5 to 101.4%. The proposed biosensor has been successfully applied in the determination of dopamine in pharmaceutical samples, with a maximum relative error of $\pm 1.0\%$ compared to the spectrophotometric official method. The second biosensor was constructed with laccase from *Aspergillus oryzae* immobilized on polyethyleneimine-coated gold nanoparticles. The occurrence of direct electron transfer between the electroactive center of laccase and the electrode surface was observed by cyclic voltammetry, suggesting that the gold nanoparticles would be contributing to this process. The biosensor response indicated a process controlled by charge transfer with an apparent electron transfer rate constant (k_s) of 0.4 s^{-1} , charge transfer coefficient (α) of 0.5, and surface coverage concentration (Γ) of $3.45 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. The optimized biosensor showed the following limits of detection for the phenolic compounds tested: $0.03 \mu\text{mol L}^{-1}$ for catechol and guaiacol; $0.14 \mu\text{mol L}^{-1}$ for pyrogallol and $0.21 \mu\text{mol L}^{-1}$ for hydroquinone, using square-wave voltammetry. The proposed biosensor demonstrated high sensitivity, adequate repeatability and reproducibility, and satisfactory stability (decrease of only 20% in analytical response after 90 days). This biosensor was successfully applied to catechol quantification in spiked water samples.

Keywords: Biosensors. Nanostructured materials. Ionic liquids. Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da estrutura e princípio operacional de um biossensor (adaptada de SOLANKI <i>et al.</i> , 2011).....	21
Figura 2. Representação esquemática do princípio de transdução do sinal eletroquímico em diferentes gerações de biossensores. (A) Primeira geração; (B) Segunda geração e (C) Terceira geração (adaptada de FREIRE <i>et al.</i> , 2003).....	23
Figura 3. Mecanismos de estabilização da estrutura de uma proteína (adaptada de GOMES <i>et al.</i> , 2007).....	25
Figura 4. Diagramas que mostram a atividade enzimática através do modelo do encaixe induzido.....	25
Figura 5. Gráfico da velocidade da reação em função da concentração do substrato, para uma enzima que obedece à cinética de Michaelis-Menten (adaptada de STRYER, 1996).....	27
Figura 6. Grupo Fe(III) protoporfirina IX (“grupo heme”), sítio ativo de enzimas PO hêmicas (adaptada de VEITCH, 2004).....	28
Figura 7. Ciclo catalítico das PO hêmicas, na presença de H ₂ O ₂ e catecol (adaptada de BERGLUND <i>et al.</i> , 2002 e BATTISTUZZI <i>et al.</i> , 2010).....	29
Figura 8. Representação esquemática da oxidação de um composto fenólico (ácido rosmarínico) catalisada pela PO, na presença de H ₂ O ₂ , e subsequente redução eletroquímica da quinona formada na superfície do biossensor (adaptada de BRONDANI <i>et al.</i> , 2011).....	30
Figura 9. Representação estrutural do sítio ativo das lacases. Tipo 1 ou azul (T1); Tipo 2 (T2) e Tipo 3 (T3) (reproduzido de RIVA, 2006).....	32
Figura 10. Representação esquemática do ciclo catalítico da lacase. Sub: substrato; Sub•: substrato oxidado radicalar (adaptado de JENSEN <i>et al.</i> , 2012).....	32
Figura 11. Representação de mecanismo hipotético para a transferência eletrônica intramolecular (IET) do sítio T1 para o sítio T2/T3 através das cadeias peptídicas (cisteína e histidina). HET: transferência eletrônica heterogênea (reproduzida de FRASCONI <i>et al.</i> , 2010).....	33
Figura 12. Principais métodos de imobilização de enzimas (adaptado de SASSOLAS <i>et al.</i> , 2012).....	35
Figura 13. Estrutura química e nomenclatura de cátions e ânions comumente empregados na síntese de IL (adaptada de SUN e	

ARMSTRONG, 2010).....	37
Figura 14. Esquema tridimensional dos arranjos dos cátions 1,3-dialquilimidazólio, mostrando os canais em que os ânions "esféricos" são acomodados (reproduzida de DUPONT e SUAREZ, 2006).....	38
Figura 15. Representação dos possíveis processos de um analito polar na superfície de (A) CPE e (B) CILE. Setas arqueadas marcam a transferência de elétrons heterogênea, enquanto setas retas a transferência na interface líquido/líquido (adaptado de OPALLO e LESNIEWSKI, 2011).....	41
Figura 16. Estrutura química da polietilenoimina (A) linear e (B) ramificada (adaptado de INTRA e SALEM, 2008).....	44
Figura 17. Representações esquemáticas da (A) estrutura cristalina da haloisita (10 Å) e da (B) estrutura de um HNT (reproduzido de YUAN <i>et al.</i> , 2008).....	46
Figura 18. Imagens de (A) SEM (reproduzida de SHCHUKIN <i>et al.</i> , 2005) e (B) TEM (reproduzida de VERGARO <i>et al.</i> , 2010) de HNT. (C) Representação esquemática das paredes múltiplas dos HNT, juntamente com imagem de HRTEM de um corte transversal (reproduzida de WHITE <i>et al.</i> , 2012).....	46
Figura 19. Estruturas químicas de algumas catecolaminas.....	51
Figura 20. Reação de formação do tetraguaiacol a partir do guaiacol, catalisada pela enzima PO, na presença de peróxido de hidrogênio.....	57
Figura 21. Variação da absorbância ($\lambda = 470$ nm) do tetraguaiacol formado na reação com a enzima PO de brotos de trevo (<i>Trifolium</i>) em função do tempo.....	57
Figura 22. Representação esquemática de (A) pasta de carbono modificada com Pt-BMI.PF ₆ e PO imobilizada em HNT, e (B) reação enzimática entre dopamina e PO, na presença de H ₂ O ₂ , com redução eletroquímica da <i>o</i> -quinona formada na superfície do biossensor.....	59
Figura 23. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando diferentes eletrodos: (a) CPE sem modificação, (b) CPE-PO, (c) CPE-HNT, (d) CPE-HNT-PO, (e) CPE-HNT-BMI.PF ₆ , (f) CPE-HNT-BMI.PF ₆ -PO, (g) CPE-HNT-Pt-BMI.PF ₆ , (h) CPE-HNT-Pt-BMI.PF ₆ -PO em solução tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 7,0) contendo 98,0 μmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ e 18,87 μmol L ⁻¹ de dopamina em frequência de 50 Hz, amplitude de 100 mV e incremento de 5 mV. (B) Valores médios de corrente obtidos com cada um dos	

diferentes eletrodos (n=3).....	61
Figura 24. Voltamogramas cíclicos obtidos usando diferentes eletrodos: (a) CPE sem modificação, (b) CPE-HNT, (c) CPE-HNT-BMI.PF ₆ , (d) CPE-HNT-Pt-BMI.PF ₆ e (e) CPE-HNT-Pt-BMI.PF ₆ -PO, em solução tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 7,0) contendo 98,0 μmol L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio e 0,90 mmol L ⁻¹ de dopamina, com velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹	63
Figura 25. Influência do pH sobre o potencial de pico (a) e a corrente de pico resultante (b) do biossensor proposto em solução de eletrólito suporte (0,1 mol L ⁻¹ solução tampão de acetato pH 4–5 e 0,1 mol L ⁻¹ solução tampão fosfato pH 6–8) contendo 98,0 μmol L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio e 3,92 μmol L ⁻¹ de dopamina, investigada por SWV.....	64
Figura 26. Estudo da concentração de enzima no biossensor proposto (em unidades por mg de pasta de carbono) realizado em 0,1 mol L ⁻¹ solução tampão fosfato (pH 7,0) contendo 98,0 μmol L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio e 3,92 μmol L ⁻¹ de dopamina, utilizando SWV.....	65
Figura 27. Estudo do efeito da concentração do peróxido de hidrogênio sobre a resposta do biossensor, realizado em solução tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 7,0) contendo 3,92 μmol L ⁻¹ de dopamina, utilizando SWV.....	66
Figura 28. Investigação dos parâmetros de SWV sobre a resposta analítica do biossensor proposto em 0,1 mol L ⁻¹ de solução tampão fosfato (pH 7,0) contendo 98,0 μmol L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio e 15,24 μmol L ⁻¹ de dopamina. (A) Estudo da frequência; (B) Estudo da amplitude; (C) Estudo do incremento....	67
Figura 29. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto em (a) solução tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0) contendo 98,0 μmol L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio (branco) e diferentes concentrações de dopamina: (b) 0,40, (c) 0,79, (d) 1,97, (e) 2,75, (f) 3,92, (g) 7,77, (h) 11,54, (i) 15,24, (j) 18,87 μmol L ⁻¹ . (B) Curva analítica para dopamina.....	69
Figura 30. Estudo da estabilidade do biossensor proposto por SWV em solução tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 7,0) contendo 98,0 μmol L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio e 18,87 μmol L ⁻¹ de dopamina.....	70
Figura 31. Estruturas químicas de alguns compostos fenólicos tóxicos e/ou potencialmente poluentes.....	76
Figura 32. Reação de oxidação do ABTS pela enzima LAC, com a formação do cátion radical ABTS ^{•+} (adaptado de CHILDS e	

BARDSLEY, 1975).....	81
Figura 33. Variação da absorbância ($\lambda = 420 \text{ nm}$) do cátion radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ formado na reação com a enzima LAC (<i>Aspergillus oryzae</i>) em função do tempo.....	82
Figura 34. Espectros de impedância eletroquímica de diferentes eletrodos: (a) GCE não modificado, (b) GCE-PEI-AuNP e (c) GCE-PEI-AuNP-LAC, obtidos em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de nitrato de potássio contendo $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1:1), em uma faixa de frequência de $0,1 \text{ Hz}$ a 100 kHz e amplitude de 10 mV , usando potencial de circuito aberto. Inserido (parte superior): Representação do circuito equivalente de Randles, onde R_{ct} : resistência à transferência de carga, C_d : capacitância da dupla camada elétrica, R_s : resistência da solução eletrolítica e Z_w : impedância de Warburg.....	83
Figura 35. Voltamogramas cíclicos obtidos usando diferentes eletrodos: (a) GCE não modificado, (b) GCE-PEI, (c) GCE-PEI-AuNP, (d) GCE-PEI-AuNP-LAC e (e) GCE-PEI-LAC em solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0), com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}	85
Figura 36. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos usando o biossensor proposto (GCE-PEI-AuNP-LAC) em solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) em diferentes velocidades de varredura ($20\text{--}300 \text{ mV s}^{-1}$). (B) Corrente de pico anódico (i_{pa}) e catódico (i_{pc}) vs. velocidade de varredura (v). (C) i_{pa} e i_{pc} vs. $v^{1/2}$	87
Figura 37. Gráfico de E_{pa} e E_{pc} vs. logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$) referente aos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 36.....	88
Figura 38. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o biossensor proposto (GCE-PEI-AuNP-LAC) em diferentes valores de pH (pH 3,0–5,0: solução tampão acetato; pH 6,0–7,0: solução tampão fosfato) sob velocidade de varredura de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. (B) Gráficos de E_{pa} , E_{pc} e E^0 vs. pH.....	89
Figura 39. Representação esquemática dos (A) componentes usados na construção do GCE revestido com filme bioestruturado e (B) oxidação do catecol catalizada pela enzima com subsequente redução eletroquímica da quinona formada sobre a superfície do biossensor.....	90
Figura 40. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando diferentes eletrodos: (a) GCE não modificado, (b) GCE-PEI, (c) GCE-PEI-AuNP e (d) GCE-PEI-AuNP-LAC (biossensor) em solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) contendo $5,0 \text{ }\mu\text{mol}$	

L ⁻¹ de catecol em frequência de 60 Hz, amplitude de pulso de 100 mV e incremento de 5 mV. Branco “d” foi obtido em solução tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 5,0) sem catecol. Inserido: Valores médios de corrente para catecol (subtraindo as correntes do branco) obtidos usando cada um dos eletrodos estudados.....	91
Figura 41. Influência da quantidade de solução de AuNP-PEI-LAC gotejada na superfície do GCE para a formação do filme sobre a resposta analítica do biossensor em solução tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 5,0) contendo 5,0 µmol L ⁻¹ de catecol, investigada por SWV.....	92
Figura 42. Influência do pH sobre a resposta analítica do biossensor proposto em solução de eletrólito suporte (0,1 mol L ⁻¹ solução tampão de acetato pH 3–5 e 0,1 mol L ⁻¹ solução tampão fosfato pH 6–8) contendo 5,0 µmol L ⁻¹ de catecol, investigada por SWV.....	93
Figura 43. Investigação dos parâmetros de SWV sobre a resposta analítica do biossensor proposto em 0,1 mol L ⁻¹ solução tampão acetato (pH 5,0) contendo 5,0 µmol L ⁻¹ de catecol. (A) Estudo da frequência; (B) Estudo da amplitude; (C) Estudo do incremento....	94
Figura 44. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto em (a) solução tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,0) (branco) contendo diferentes concentrações de catecol: (b) 0,36, (c) 0,72, (d) 1,40, (e) 2,50, (f) 3,20, (g) 5,00, (h) 7,10, (i) 8,80, (j) 11,00 µmol L ⁻¹ . (B) Curva analítica para catecol (subtraindo a corrente do branco).....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipo de reação catalisada pelas diferentes classes de enzimas.....	27
Tabela 2. Parâmetros analíticos do método proposto para determinação de catecolaminas.....	71
Tabela 3. Recuperação de dopamina em amostras de fármacos usando o biossensor proposto.....	72
Tabela 4. Determinação de dopamina em amostras farmacêuticas usando um método comparativo espectrofotométrico (FARMACOPÉIA AMERICANA, 1995) e o biossensor proposto.	73
Tabela 5. Parâmetros analíticos obtidos com o biossensor proposto na determinação de compostos fenólicos.....	97
Tabela 6. Estudo de recuperação e quantificação de catecol em amostras de água fortificadas usando o biossensor proposto.....	98

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

- ABTS** – sal de amônio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
- Ag/AgCl** – Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata
- AuNP** – Nanopartículas de ouro
- BMI.PF₆** – Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio
- CILE** – Eletrodo de carbono e líquido iônico (*carbon ionic liquid electrode*)
- CPE** – Eletrodo de pasta de carbono (*carbon paste electrode*)
- CV** – Voltametria cíclica (*cyclic voltammetry*)
- DET** – Transferência eletrônica direta (*direct electron transfer*)
- E⁰** – potencial padrão de redução
- EIS** – Espectroscopia de impedância eletroquímica (*electrochemical impedance spectroscopy*)
- GCE** – Eletrodo de carbono vítreo (*glassy carbon electrode*)
- HET** – Transferência eletrônica heterogênea (*heterogeneous electron transfer*)
- HNT** – Nanotubos de haloisita (*halloysite nanotube*)
- HRTEM** – Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (*high-resolution transmission electron microscopy*)
- IET** – Transferência eletrônica intramolecular (*intramolecular electron transfer*)
- IL** – Líquidos iônicos (*ionic liquids*)
- IUPAC** – União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure Applied Chemistry*)
- LAC** – Lacase
- LOD** – Limite de detecção (*limit of detection*)
- LOQ** – Limite de quantificação (*limit of quantitation*)
- NC-IUBMB** – Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*)
- NHE** – Eletrodo normal de hidrogênio (*normal hydrogen electrode*)
- NP** – Nanopartículas
- PEI** – Polietilenoimina

PEI-AuNP – Nanopartículas de ouro revestidas com PEI

PEI-AuNP-LAC – Nanopartículas de ouro revestidas com PEI e decoradas com LAC

PO – Peroxidase

Pt-BMI.PF₆ – Nanopartículas de platina dispersas em hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio

PtNP – Nanopartículas de platina

R_{ct} – Resistência à transferência de carga (*charge-transfer resistance*)

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

SEM – Microscopia eletrônica de varredura (*scanning electron microscopy*)

SWV – Voltametria de onda quadrada (*square-wave voltammetry*)

TEM – Microscopia eletrônica de transmissão (*transmission electron microscopy*)

v_{max} – Velocidade máxima

XRD – Difração de raios-X (*X-ray diffraction*)

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	19
CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
1.1. BIOUSSENSORES	20
1.2. ENZIMAS	23
1.2.1. Peroxidase	28
1.2.2. Lacase	31
1.3. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	34
1.4. LÍQUIDOS IÔNICOS	36
1.4.1. Eletrodo de pasta de carbono modificado com IL	40
1.5. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	42
1.5.1. NP metálicas estabilizadas em polímeros	43
1.5.1.1. Polietilenoimina	43
1.5.2. NP metálicas estabilizadas em IL	44
1.6. NANOTUBOS DE HALOISITA	44
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS	48
2.1. OBJETIVO GERAL	48
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
2.2.1. Biossensor contendo NP de platina (PtNP) dispersas em IL e PO imobilizada em HNT	48
2.2.2. Biossensor à base de NP de ouro (AuNP) revestidas com PEI e decoradas com lacase	49
CAPÍTULO 3 – BIOUSSENSOR CONTENDO PtNP DISPERSAS EM IL E PO IMOBILIZADA EM HNT	50
3.1. INTRODUÇÃO	50
3.2. PARTE EXPERIMENTAL	52
3.2.1. Instrumentação	52
3.2.2. Reagentes, soluções e amostras	53
3.2.3. Obtenção do extrato vegetal e determinação de atividade enzimática da PO	54
3.2.4. Imobilização de PO sobre HNT	55
3.2.5. Construção do biossensor	55
3.2.6. Medidas eletroquímicas	55
3.2.7. Preparação das amostras farmacêuticas e quantificação da dopamina	56
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.3.1. Determinação da atividade enzimática da PO	56
3.3.2. Imobilização de PO em HNT	58
3.3.3. Princípio de funcionamento do biossensor proposto	58

3.3.4. Estudo sobre a contribuição dos modificadores utilizados na construção do biossensor.....	60
3.3.5. Efeito do pH sobre a resposta voltamétrica.....	63
3.3.6. Otimização da construção do biossensor e das condições experimentais.....	64
3.3.7. Desempenho analítico do biossensor.....	68
3.3.8. Resposta do biossensor para outras catecolaminas.....	71
3.3.9. Estudo de recuperação e aplicação analítica.....	72
CAPÍTULO 4 – BIOSENSOR CONTENDO AuNP REVESTIDAS COM PEI E DECORADAS COM LAC.....	75
4.1. INTRODUÇÃO.....	75
4.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	77
4.2.1. Instrumentação e eletrodos.....	77
4.2.2. Materiais, reagentes e soluções.....	77
4.2.3. Extração da LAC e determinação de atividade enzimática e proteína total.....	78
4.2.4. Preparação do biossensor.....	80
4.2.5. Medidas eletroquímicas.....	80
4.2.6. Preparação de amostras de águas fortificadas.....	80
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4.3.1. Determinação de atividade da LAC e concentração de proteína total no extrato enzimático.....	81
4.3.2. Imobilização de LAC sobre PEI-AuNP.....	82
4.3.3. Caracterização do filme PEI-AuNP-LAC por EIS.....	82
4.3.4. Eletroquímica direta da LAC imobilizada em GCE-PEI-AuNP.....	84
4.3.5. Princípio de funcionamento do biossensor proposto.....	89
4.3.6. Estudo sobre a contribuição dos modificadores usados na construção do biossensor.....	90
4.3.7. Otimização da construção do biossensor e condições experimentais.....	92
4.3.8. Desempenho analítico do biossensor.....	95
4.3.9. Estudo de recuperação e aplicação analítica.....	98
CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS.....	101

APRESENTAÇÃO

Neste trabalho de Tese são apresentados dois diferentes biossensores enzimáticos desenvolvidos a partir da utilização de materiais nanoestruturados (nanopartículas metálicas e nanotubos de argila) e líquido iônico, visando contribuir com o desenvolvimento de novas metodologias para a determinação de compostos fenólicos.

Esta tese é composta de quatro capítulos, sendo o primeiro uma fundamentação teórica sobre biossensores, enzimas (peroxidase e lacase), imobilização enzimática, líquidos iônicos, nanopartículas metálicas e nanotubos de haloisita. O segundo capítulo trata dos objetivos do trabalho, dividido em 2 partes, as quais se referem aos 2 biossensores propostos. No terceiro capítulo é descrito o desenvolvimento do biossensor contendo nanopartículas de platina dispersas em líquido iônico e peroxidase de broto de trevo (*Trifolium*) imobilizada em nanotubos de haloisita, o qual foi aplicado na determinação de catecolaminas. O quarto capítulo descreve a construção do biossensor contendo nanopartículas de ouro revestidas com polietilenoimina e decoradas com lacase (*Aspergillus oryzae*), sendo este aplicado na determinação de compostos fenólicos tóxicos e/ou potencialmente poluentes. Por último, são apresentadas as conclusões e as referências citadas neste trabalho.

CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. BIOSENSORES

De acordo com a definição proposta pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure Applied Chemistry* – IUPAC), biossensor é um dispositivo integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica (qualitativa ou quantitativa) através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico), o qual é mantido em contato direto com um transdutor (THÉVENOT *et al.*, 2001; IUPAC, 2011).

Vários elementos de reconhecimento biológico (também chamados de biorreceptores), incluindo enzimas, anticorpos, oligonucleotídeos, organelas, tecidos, células e microorganismos, têm sido utilizados na construção de biossensores (MELLO e KUBOTA, 2002; D’ORAZIO, 2003; CÂMPAS *et al.*, 2008; SOLANKI *et al.*, 2011). Além disso, alguns autores incluem os materiais biomiméticos como potenciais biorreceptores sintéticos (CÂMPAS *et al.*, 2008; VELASCO-GARCIA, 2009). A finalidade principal do biorreceptor é fornecer ao sensor um alto grau de seletividade e/ou especificidade para o composto (ou classe de compostos) de interesse (THÉVENOT *et al.*, 2001). O processo de reconhecimento pode acontecer de duas formas principais, de acordo com o elemento biológico empregado, sendo elas: interação por afinidade (ex.: oligonucleotídeos – reconhecimento das seqüências complementares) e reação biocatalítica (ex.: enzimas – reconhecimento de substrato específico ou classe de compostos e catálise das reações correspondentes). A interação do elemento de reconhecimento com o “analito-alvo” resulta na variação de alguma propriedade físico-química (transferência de elétrons, variação de pH ou de massa, absorção e emissão de radiações eletromagnéticas, alteração de temperatura, etc.) que é reconhecida por um transdutor, o qual a converte em um sinal elétrico. Então, este sinal é amplificado e processado para fornecer uma medida que corresponde à concentração do analito na amostra (MELLO e KUBOTA, 2002; D’ORAZIO, 2003; CÂMPAS *et al.*, 2008; GRIESHABER *et al.*, 2008; SOLANKI *et al.*, 2011). A Figura 1 ilustra a estrutura e o princípio operacional de um biossensor.

O componente do biossensor responsável pela conversão da variação da propriedade físico-química em um sinal elétrico quantificável é o transdutor, o qual é também chamado de detector,

sensor ou eletrodo; contudo, o termo “transdutor” é o mais recomendado (THÉVENOT *et al.*, 2001). Existem vários tipos de transdutores, os quais podem ser classificados em quatro grupos: eletroquímicos, ópticos, piezoelétricos ou calorimétricos. Os transdutores eletroquímicos são os mais empregados, os quais podem ser amperométricos, potenciométricos, impedimétricos ou condutimétricos (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; CÂMPAS *et al.*, 2008; GRIESHABER *et al.*, 2008).

Os biossensores eletroquímicos enzimáticos são os mais amplamente explorados em aplicações analíticas, devido à possibilidade de se combinar a seletividade da enzima com a sensibilidade, simplicidade e relativo baixo custo de um transdutor eletroquímico (PEREIRA *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2006; SU *et al.*, 2011; SASSOLAS *et al.*, 2012).

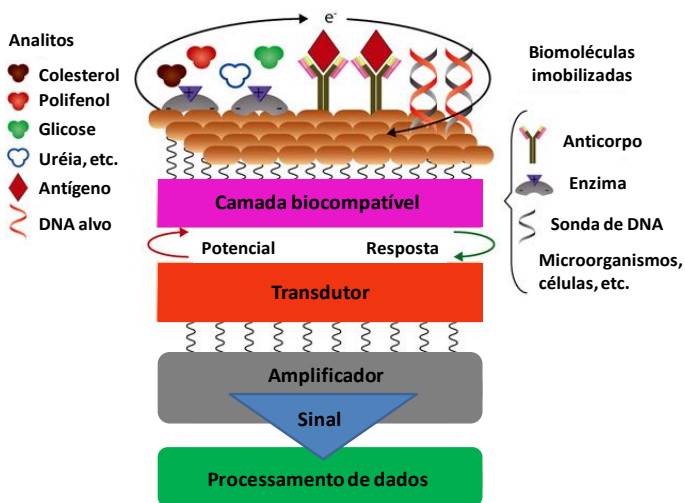


Figura 1. Esquema da estrutura e princípio operacional de um biossensor (adaptada de SOLANKI *et al.*, 2011).

Mesmo após décadas de pesquisa, uma das principais preocupações na construção de biossensores continua sendo a velocidade de transferência de elétrons do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo. As características dos biossensores foram intensivamente melhoradas desde o desenvolvimento do primeiro dispositivo (CLARK e LYONS, 1962), sempre em busca de uma maior seletividade e eficiência na transferência de elétrons. Os biossensores desenvolvidos durante este período de evolução (mais de 50 anos) foram

classificados em gerações de acordo com o princípio de transdução do sinal eletroquímico. A primeira geração (Figura 2-A) é composta principalmente por biossensores de oxigênio, os quais são baseados na eletroatividade do substrato ou produto da reação enzimática, sendo o sinal amperométrico produzido pela oxidação ou redução do substrato sobre a superfície do eletrodo. A glicose oxidase foi uma das enzimas mais utilizadas na construção desses biossensores, monitorando-se o consumo de oxigênio ou a produção de peróxido de hidrogênio. A desvantagem dessa configuração é a dependência da concentração de oxigênio que é difícil manter a um nível constante durante as análises, além de apresentar problemas de interferência devido à necessidade de potenciais muito elevados (SOTOMAYOR e KUBOTA, 2002; GRIESHABER *et al.*, 2008; GALLI, 2009; YOO e LEE, 2010).

Na tentativa de solucionar estes problemas, surgiram os biossensores de segunda geração (Figura 2-B), onde o oxigênio foi substituído por outros reagentes oxidantes (aceptores de elétrons), conhecidos como mediadores de elétrons. Alguns exemplos de mediadores comumente utilizados são: ferroceno e seus derivados, ferrocianeto, azul de metileno, benzoquinona, entre outros. (GRIESHABER *et al.*, 2008). O funcionamento dos biossensores “mediados” envolve basicamente as seguintes etapas: primeiro há uma reação redox entre a enzima e o substrato, subsequentemente a enzima catalisa a oxidação ou redução do mediador, e por fim a transformação redox (regeneração) do mediador ocorre na superfície do eletrodo (MEHRVAR e ABDI, 2004; GRIESHABER *et al.*, 2008). Os mediadores são utilizados livres em solução ou imobilizados juntamente com a enzima, auxiliando no transporte de elétrons entre a enzima e o eletrodo. Entretanto, esses biossensores podem apresentar problemas de interferência, uma vez que, esse arranjo pode facilitar também a transferência de elétrons proveniente de reações redox paralelas à reação entre a enzima e o substrato (FREIRE *et al.*, 2003).

Com o intuito de suprimir a interferência causada pelo uso de mediadores e melhorar o desempenho analítico, foi proposta uma nova categoria de biossensores, chamada de terceira geração (Figura 2-C). Essa é baseada na transferência eletrônica direta (*direct electron transfer* – DET) entre o sítio ativo das enzimas e a superfície do eletrodo, dispensando o uso de mediadores. Essa ausência de mediadores redox é a principal vantagem, já que proporciona uma seletividade superior, pois os biossensores operam em potenciais mais próximos ao da própria enzima e, portanto, as reações interferentes são bastante reduzidas (SOTOMAYOR e KUBOTA, 2002; HU *et al.*, 2008).

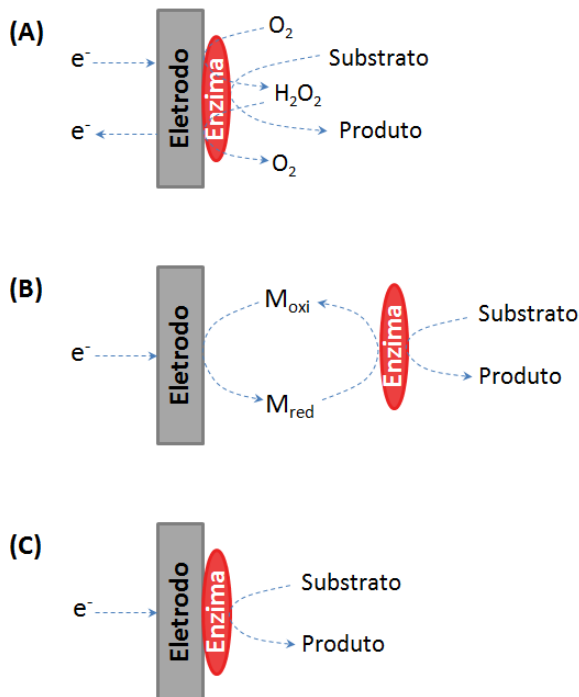


Figura 2. Representação esquemática do princípio de transdução do sinal eletroquímico em diferentes gerações de biossensores. (A) Primeira geração; (B) Segunda geração e (C) Terceira geração (adaptada de FREIRE *et al.*, 2003).

1.2. ENZIMAS

As enzimas são importantes catalisadores dos sistemas biológicos, as quais determinam o perfil de transformações bioquímicas. Essas biomoléculas são responsáveis por acelerar vários tipos de reações de conversão de substratos em produtos, na maioria das vezes superando em eficiência os catalisadores sintéticos. Dentre as características mais impressionantes dessas biomoléculas destaca-se a sua especificidade ou seletividade frente a um determinado substrato ou uma classe de substratos, respectivamente. Desta forma, uma enzima geralmente catalisa uma reação química única ou um conjunto de reações estreitamente relacionadas, evitando reações colaterais (STRYER, 1996; CHAMPE e HARVEY, 1996; LEHNINGER *et al.*, 2006).

Todas as enzimas conhecidas são proteínas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA cataliticamente ativas, conhecidas como ribozimas (nome derivado da combinação das palavras ácido ribonucleico e enzima). As enzimas proteicas são altamente eficientes na catálise de inúmeras reações, por causa da sua capacidade de interagir seletivamente a uma ampla variedade de substratos. Por meio de diversas forças intermoleculares, as enzimas aproximam-se dos substratos em uma orientação favorável com o propósito de quebrar e formar ligações químicas. Essencialmente, elas catalisam reações pela estabilização dos estados de transição, oferecendo um caminho reacional alternativo (de menor energia de ativação), e fazendo isso de forma seletiva (STRYER, 1996; LEHNINGER *et al.*, 2006).

A maioria das enzimas possui apenas um sítio ativo (centro ativo), local onde se processam as reações com os substratos, levando à formação de produtos. Em geral, o sítio ativo é constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia proteica e um ou mais componentes não proteicos, sendo responsável pela atividade biológica da enzima. Os componentes não proteicos podem ser de íons inorgânicos (ex.: Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}), denominados de cofatores, ou complexos orgânicos ou moléculas organometálicas, denominados de coenzimas. O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator/coenzima é denominado de holoenzima. A parte proteica de tal enzima é chamada de apoenzima. Em certas enzimas, a coenzima ou o íon metálico está ligado fracamente ou apenas de forma transitória à parte proteica, enquanto que em outras se ligam permanentemente. Neste último caso, recebe a denominação de grupo prostético (VOET e VOET, 1995; STRYER, 1996; LEHNINGER *et al.*, 2006; DEVLIN, 2007).

As características do ambiente onde a enzima se encontra, tais como temperatura, pressão, pH, concentração de sal, entre outros influenciam enormemente na sua atividade catalítica, bem como na manutenção da sua estrutura nativa. A estrutura proteica é mantida através de um conjunto de forças, tais como ligações de hidrogênio, pontes de dissulfeto, interações iônicas e efeito hidrofóbico (Figura 3). Uma enzima submetida a agentes como calor, solventes orgânicos, ácidos e bases fortes, entre outros, pode sofrer desnaturação, ou seja, essas interações que estabilizavam sua estrutura são rompidas e sua conformação proteica nativa é perdida, tornando-se inativa (GOMES *et al.*, 2007; IYER e ANANTHANARAYAN, 2008).

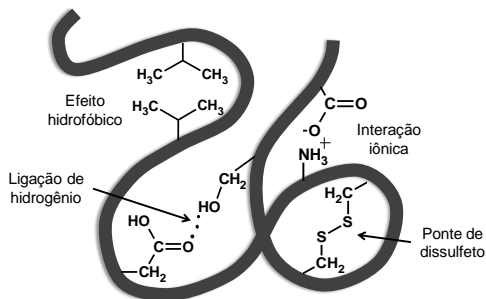


Figura 3. Mecanismos de estabilização da estrutura de uma proteína (adaptada de GOMES *et al.*, 2007).

Pelo fato de serem proteínas com estrutura terciária ou quaternária, as enzimas são dotadas de dobramentos tridimensionais em suas cadeias polipeptídicas, o que lhes confere uma forma característica e única (STRYER, 1996; LEHNINGER *et al.*, 2006). Em 1894, Hermann Emil Fischer propôs um modelo para explicar a especificidade enzimática, no qual tanto as enzimas como os substratos apresentam formas complementares, fazendo com que se encaixem de maneira exata. Entretanto, esta teoria, conhecida como “modelo chave-fechadura”, falha em explicar a estabilização dos estados de transição que as enzimas apresentam. Posteriormente, em 1958, Daniel E. Koshland Jr. propôs que os formatos dos sítios ativos de muitas enzimas são acentuadamente modificados na interação com o substrato. De acordo com essa teoria, uma vez que as enzimas exibem estruturas flexíveis, as cadeias laterais dos aminoácidos que formam os sítios ativos sofrem uma reorientação de maneira que as suas posições potencializem a ação catalítica da enzima. Esse processo de reconhecimento dinâmico é chamado de “encaixe induzido” (Figura 4).

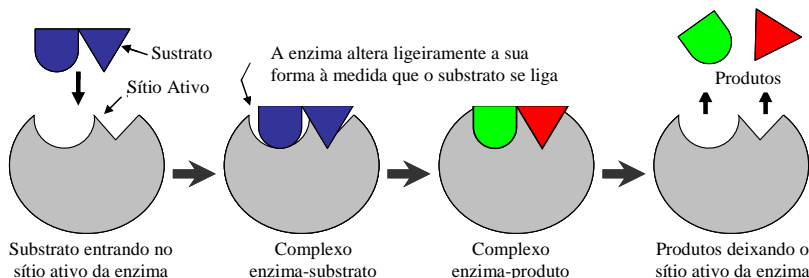
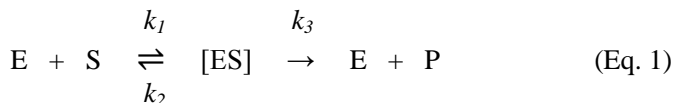


Figura 4. Diagramas que mostram a atividade enzimática através do modelo do encaixe induzido.

Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Menten propuseram uma teoria para explicar as características cinéticas apresentadas por muitas enzimas. De acordo com esta proposta, uma enzima (E) se combina com um substrato (S), para formar um complexo enzima-substrato (ES), o qual pode prosseguir para formar um produto (P), ou para se dissociar em E e S, de acordo com a Equação 1.



De acordo com a Figura 5, a velocidade de catálise v varia com a concentração do substrato $[S]$, onde v é definida como o número de moléculas de produto formadas por segundo. Pode-se observar que v é quase linearmente proporcional a $[S]$, quando $[S]$ é baixa; porém, em alta $[S]$, v é quase independente de $[S]$. A velocidade v de formação do produto é dada pela equação de Michaelis-Menten (Equação 2):

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Eq. 2})$$

na qual v_{\max} é a velocidade quando a enzima está totalmente saturada com substrato, e K_M (constante de Michaelis-Menten) é a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é metade da máxima ($v_{\max}/2$). Essa constante é característica de um substrato para uma enzima específica, fornecendo um parâmetro de especificidade entre substrato-enzima. A velocidade máxima, v_{\max} , é igual ao produto de k_3 pela concentração total da enzima. A constante cinética k_3 , chamada de número de renovação (*turnover number*), é o número de moléculas de substrato transformadas por unidade de tempo, em um único sítio catalítico, quando a enzima está totalmente saturada com o substrato. Os números de renovação para a maioria das enzimas estão entre 1 e 10^4 s^{-1} (STRYER, 1996; LEHNINGER *et al.*, 2006).

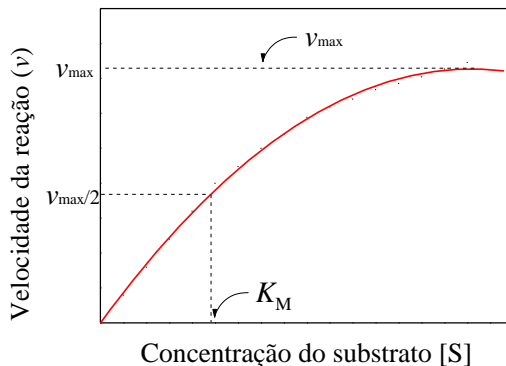


Figura 5. Gráfico da velocidade da reação em função da concentração do substrato, para uma enzima que obedece à cinética de Michaelis-Menten (adaptada de STRYER, 1996).

De acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology – NC-IUBMB*), as enzimas são divididas em 6 classes conforme o tipo de reações que catalisam (Tabela 1).

Tabela 1. Tipo de reação catalisada pelas diferentes classes de enzimas*

Classe	Tipo de reação
Oxidoredutase	Transferência de elétrons
Transferase	Transferência de grupos funcionais
Hidrolase	Hidrólise de ligações covalentes
Liase	Adição ou remoção de duplas ligações ou grupos funcionais
Isomerase	Alterações geométricas ou estruturais dentro de uma molécula
Ligase	União de duas moléculas associada à hidrólise de uma ligação de trifosfato de adenosina (ATP)

*NC-IUBMB, 1992.

1.2.1. Peroxidase

As peroxidases (PO) pertencem à classe das oxirredutases e são amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em plantas, fungos, bactérias e animais, onde elas desempenham papéis importantes. Em plantas, por exemplo, estas enzimas participam do processo de lignificação e no mecanismo de defesa dos tecidos fisicamente danificados ou infectados (REGALADO *et al.*, 2004). As PO apresentam massas molares que variam de 30 a 150 kDa (251–726 resíduos de aminoácidos). Elas catalisam reações de oxidação de vários substratos doadores de elétrons, tais como monofenóis, difenóis, polifenóis e aminofenóis, na presença de peróxido de hidrogênio ou peróxidos orgânicos (acceptor de elétrons). As enzimas PO podem ser classificadas em relação ao seu grupo prostético (sítio ativo) em hêmicas ou não-hêmicas. As PO hêmicas possuem no seu sítio ativo um grupo Fe(III) protoporfirina IX (Figura 6), chamado de “grupo heme”. Esse grupo prostético está ligado não covalentemente à cadeia polipeptídica, sendo que o íon férrico central da referida protoporfirina está coordenado a um resíduo de histidina (FREIRE *et al.*, 2003; VEITCH, 2004; BATTISTUZZI *et al.*, 2010; POULOS, 2010).

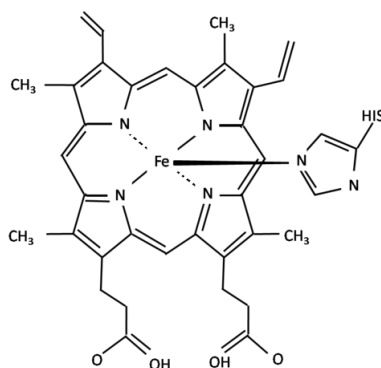


Figura 6. Grupo Fe(III) protoporfirina IX (“grupo heme”), sítio ativo de enzimas PO hêmicas (adaptada de VEITCH, 2004).

O ciclo catalítico das PO hêmicas é composto por 3 etapas consecutivas de reação (Figura 7), envolvendo inicialmente o sítio ativo da enzima e peróxido de hidrogênio. Nesta primeira etapa (processo de oxirredução envolvendo 2 elétrons), ocorre a oxidação do “grupo heme”

(Fe^{3+}) pelo peróxido de hidrogênio para formar um composto intermediário, chamado de Composto I, consistindo do grupo oxiferril ($\text{O}=\text{Fe}^{4+}$) e do cátion radical π porfirínico (R^{\bullet}), e, conseqüentemente, a redução do peróxido à água. Na etapa seguinte, o cátion orgânico radicalar (Composto I) sofre uma reação de redução pela transferência de um elétron do substrato doador (ex.: catecol), formando um substrato radicalar e outro composto intermediário (Composto II). Na última etapa, outro elétron da molécula do substrato doador é transferido para o Composto II, o qual é reduzido para a forma nativa da enzima (Fe^{3+}), com concomitante oxidação do substrato (FERAPONTOVA *et al.*, 2001; REGALADO *et al.*, 2004; VEITCH, 2004; BATTISTUZZI *et al.*, 2010).

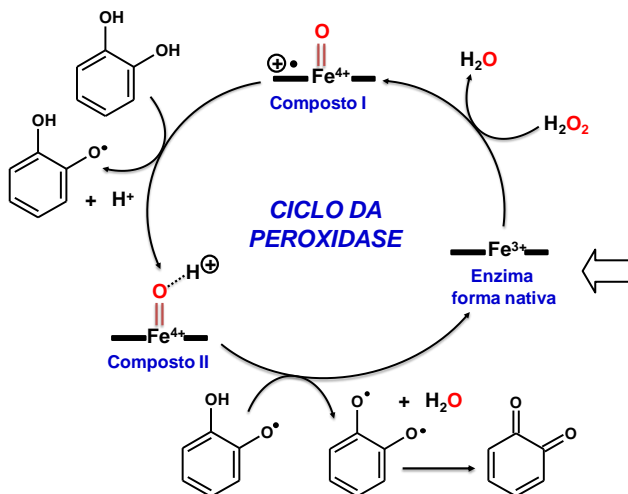
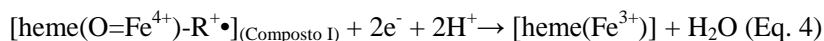
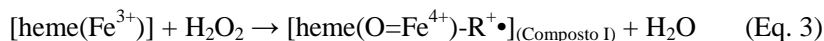


Figura 7. Ciclo catalítico das PO hêmicas, na presença de H_2O_2 e catecol (adaptada de BERGLUND *et al.*, 2002 e BATTISTUZZI *et al.*, 2010).

Quando um eletrodo substitui o substrato doador de elétrons em um ciclo comum de reação do peróxido, o processo é denominado de transferência eletrônica direta (DET). Enzimas imobilizadas em um eletrodo podem ser oxidadas pelo peróxido de hidrogênio (equação 3) e, em seguida, reduzidas por elétrons fornecidos pelo eletrodo (equação 4) (FREIRE *et al.*, 2003; REGALADO *et al.*, 2004).



Quando o peróxido de hidrogênio e um substrato doador de elétrons (ex.: composto fenólico) estão presentes no sistema eletrodo-PO (biossensor), os processos de transferência de elétrons direta e mediada podem ocorrer simultaneamente. Nesse caso, o substrato pode ser oxidado enzimaticamente à *o*-quinona correspondente, e, na sequência, reduzido eletroquimicamente pelo biossensor (Figura 8). Esse sistema tem sido usado para desenvolver métodos altamente sensíveis para determinação de compostos fenólicos e aminas aromáticas (FREIRE *et al.*, 2003; REGALADO *et al.*, 2004).

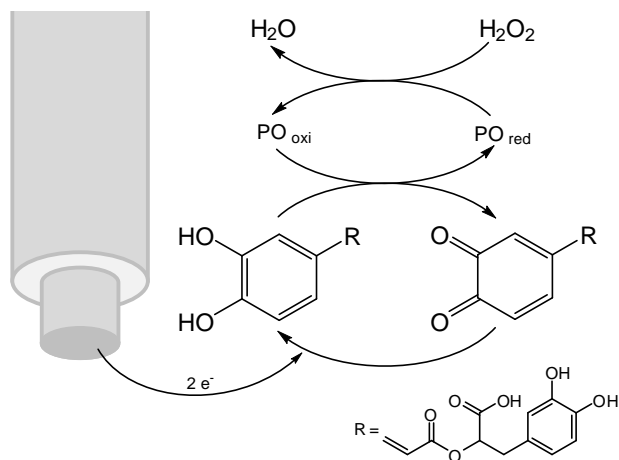


Figura 8. Representação esquemática da oxidação de um composto fenólico (ácido rosmarínico) catalisada pela PO, na presença de H_2O_2 , e subsequente redução eletroquímica da quinona formada na superfície do biossensor (adaptada de BRONDANI *et al.*, 2011).

Há um amplo interesse pelas PO, devido às suas múltiplas aplicações industriais e analíticas, especialmente em indústrias de alimentos, de papel e celulose, e tratamentos de águas residuais (REGALADO *et al.*, 2004; HAMID e KHALIL-UR-REHMAN, 2009). Além disso, existe uma grande utilização destas enzimas em laboratórios de pesquisa para o desenvolvimento de biossensores. Tecidos e extratos de vegetais têm sido usados como catalisadores na construção destes bioeletrodos, em substituição às enzimas purificadas, apresentando resultados analíticos satisfatórios e reduzindo o custo de produção (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002).

1.2.2. Lacase

As lacases (LAC) pertencem à classe das oxirredutases, mais especificamente à família das oxidases “multicobre”, e são amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em plantas, bactérias, insetos e, principalmente, fungos (MAYER e STAPLES, 2002; GIARDINA *et al.*, 2010; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012). As LAC fúngicas apresentam massas molares que variam de 50 a 130 kDa, e estão envolvidas principalmente no processo de degradação da lignina (MOROZOVA *et al.*, 2007; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012). Em geral, as LAC são capazes de catalisar a oxidação de uma variedade de compostos, incluindo *orto*- e *para*-difenois, polifenóis, aminofenóis, poliaminas e alguns íons inorgânicos, com a redução simultânea de oxigênio molecular à água (RIVA, 2006; GIARDINA *et al.*, 2010; SANTHANAM *et al.*, 2011). Os substratos potencialmente oxidáveis pela LAC, bem como as propriedades termodinâmicas e cinéticas, variam em função da origem da enzima (RIVA, 2006; MADHAVI e LELE, 2009).

O sítio ativo típico das LAC contém 4 átomos de cobre, que desempenham um papel fundamental nos mecanismos catalíticos. Estes átomos são distribuídos em diferentes sítios de ligação e são classificados em três tipos, de acordo com características funcionais e espectroscópicas específicas (Figura 9). O cobre Tipo 1 (T1) ou azul (sítio mononuclear) está envolvido em captura e transferência de elétrons, portanto, é onde a oxidação do substrato acontece. Os cobres Tipo 2 e 3 (T2/T3 – sítio ou *cluster* trinuclear) estão envolvidos na ligação com o oxigênio, ou seja, são responsáveis pela redução do oxigênio molecular e liberação da água (RIVA, 2006; GIARDINA *et al.*, 2010; SANTHANAM *et al.*, 2011).

A figura 10 mostra uma representação esquemática do ciclo catalítico da LAC, onde uma molécula de oxigênio é reduzida diretamente à água, e 4 moléculas de substratos doadores de elétrons (Sub – compostos fenólicos, por exemplo) são oxidadas a sua forma radicalar (Sub•), em um processo que envolve quatro elétrons. Nessa proposta, inicialmente, a enzima completamente reduzida interage com O₂, formando o intermediário peróxido. Subsequentemente, a ligação peróxido (O—O) é quebrada para produzir o intermediário nativo (enzima totalmente oxidada). Então, o sítio T1 do intermediário nativo recebe elétrons dos substratos, transferindo-os para o *cluster* trinuclear T2/T3, onde o oxigênio molecular é reduzido à água (RIVA, 2006; SOLOMON *et al.*, 2008; JENSEN *et al.*, 2012).

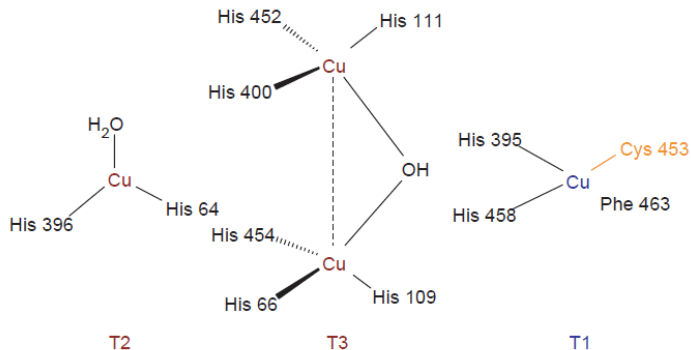


Figura 9. Representação estrutural do sítio ativo das lacases. Tipo 1 ou azul (T1); Tipo 2 (T2) e Tipo 3 (T3) (reproduzido de RIVA, 2006).

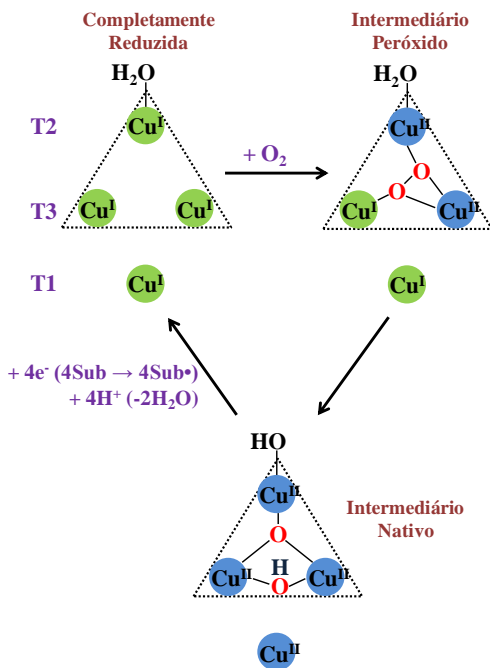


Figura 10. Representação esquemática do ciclo catalítico da lacase. Sub: substrato; Sub*: substrato oxidado radicalar (adaptado de JENSEN *et al.*, 2012).

O potencial padrão de redução (E^0) de cada um dos 3 sítios de cobre das LAC (T1, T2, T3) é uma característica importante dessas enzimas. As LAC podem ser classificadas em função do E^0 do sítio T1 como enzimas de baixo (≤ 500 mV vs. NHE (*normal hydrogen electrode*)) e alto (700-800 mV vs. NHE) potencial de redução. O E^0 do T1 determina a eficiência da atividade catalítica das LAC, ou seja, quanto maior é o potencial, melhor é o desempenho catalítico da enzima (XU *et al.*, 1996; FRASCONI *et al.*, 2010).

Resultados publicados recentemente mostraram uma rápida DET entre enzimas LAC e eletrodos modificados com materiais nanoestruturados, tais como nanopartículas (NP) de ouro (DAGYS *et al.*, 2010) e silício nanoestruturado (RESSINE *et al.*, 2010). No entanto, os mecanismos de transferência eletrônica intramolecular (*intramolecular electron transfer – IET*) e heterogênea (*heterogeneous electron transfer – HET*) entre enzima e eletrodo ainda não são bem compreendidos, e há diferentes propostas publicadas na literatura. Por exemplo, Shleev *et al.* (2005) propõem que a transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e o sítio T1 da enzima ocorra por tunelamento. Já a IET do sítio T1 até o *cluster* trinuclear T2/T3 ocorre através das cadeias peptídicas (cisteína e histidina), segundo proposto por Frasconi *et al.* (2010) (Figura 11). Em uma revisão sobre mecanismos de transferência de elétrons em biossensores, Habermüller *et al.* (2000) discutem que o tipo de mecanismo depende da forma que a enzima encontra-se imobilizada sobre o eletrodo (ex.: orientação, ligações), bem como o material/reagente usado para a “arquitetura” do biossensor.

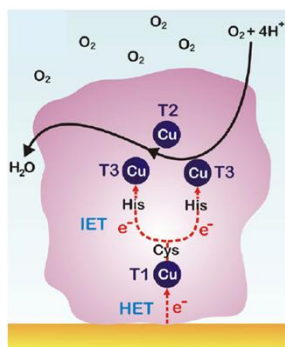


Figura 11. Representação de mecanismo hipotético para a transferência eletrônica intramolecular (IET) do sítio T1 para o sítio T2/T3 através das cadeias peptídicas (cisteína e histidina). HET: transferência eletrônica heterogênea (reproduzida de FRASCONI *et al.*, 2010).

As enzimas LAC são extensamente usadas nas indústrias de papel, tecidos, alimentos e cosméticos, bem como em áreas biotecnológicas, em especial, biorremediação de águas e solos contaminados (RIVA, 2006; MADHAVI e LELE, 2009; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012). Além destas aplicações, essas enzimas vêm sendo empregadas com sucesso na construção de biossensores para determinação de compostos fenólicos (SHIMOMURA *et al.*, 2011; MOCCELINI *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012; SHERVEDANI e AMINI, 2012; BRONDANI *et al.*, 2013).

1.3. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização de enzimas desempenha um papel fundamental na construção de biossensores enzimáticos, tendo em vista que as enzimas estão sujeitas à perda de sua atividade por fatores químicos, físicos e/ou biológicos, durante sua utilização ou até mesmo estocagem. Por essas razões, diferentes métodos de imobilização enzimática têm sido propostos com o objetivo de manter a atividade desses biocatalisadores durante os processos em que são empregados, possibilitando o desenvolvimento de biossensores com um tempo de vida útil satisfatório e elevada sensibilidade (MATEO *et al.*, 2007; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012; SASSOLAS *et al.*, 2012).

Conforme ilustrado na Figura 12, os principais métodos existentes para a imobilização de biocatalisadores são: o confinamento em matrizes e a ligação a um suporte (por adsorção ou ligação covalente) (CABRAL *et al.*, 2003; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012; SASSOLAS *et al.*, 2012). A escolha da metodologia mais apropriada depende da natureza da enzima, do transdutor e do modo de detecção empregado, sendo que cada método de imobilização apresenta vantagens e desvantagens (SASSOLAS *et al.*, 2012).

O confinamento é definido como a retenção física de enzimas em uma matriz sólida porosa, tal como poliacrilamida, colágeno, alginato, ou gelatina (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012). No caso da construção de biossensores, as enzimas podem ser imobilizadas em matrizes tridimensionais, tais como filmes eletropolimerizados, sílica sol-gel, polissacarídeos ou pasta de carbono. Esta imobilização é fácil de realizar, e não há alteração das biomoléculas, de modo que a atividade enzimática é geralmente preservada. Os biossensores baseados em enzimas fisicamente confinadas exibem frequentemente adequada estabilidade, contudo estão sujeitos à lixiviação das biomoléculas, bem

como as possíveis barreiras de difusão que podem prejudicar o desempenho do sistema (SASSOLAS *et al.*, 2012).

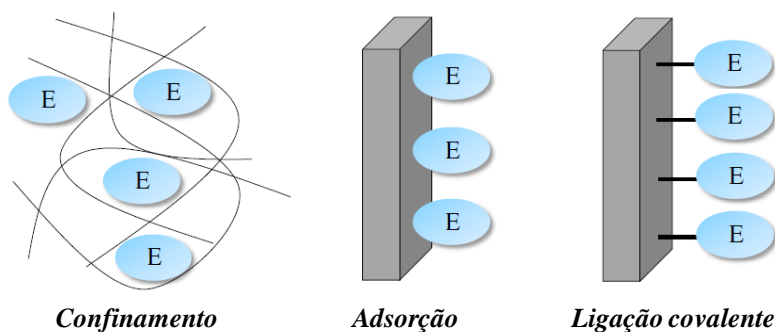


Figura 12. Principais métodos de imobilização de enzimas (adaptado de SASSOLAS *et al.*, 2012).

A imobilização por adsorção da enzima sobre um suporte insolúvel é um método amplamente empregado no desenvolvimento de biossensores, especialmente por ser simples, rápido e de baixo custo. Os mecanismos de adsorção são baseados em ligações fracas, tais como interações de van der Waals, interações eletrostáticas (ou iônicas) e ligações de hidrogênio. Vários materiais têm sido explorados para esse tipo de imobilização, tais como biopolímeros, sílica mesoporosa, NP metálicas e poliméricas, e argilominerais. Contudo, uma das principais desvantagens desse método é a possibilidade de dessorção da biomolécula, devido a sua fraca ligação com o suporte (SASSOLAS *et al.*, 2012; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012; ANSARI e HUSAIN, 2012).

No método de ligação covalente, os grupos funcionais disponíveis na superfície do suporte são ativados e reagem com grupos nucleofílicos da proteína, os quais são geralmente grupos aminos altamente reativos presentes na superfície da enzima e que não são essenciais para a sua atividade catalítica. A ativação da superfície do suporte é realizada geralmente com reagentes multifuncionais (ex.: glutaraldeído e carbodiimida). Diferentes materiais têm sido empregados nesse processo, incluindo biopolímeros, polímeros sintéticos, nanotubos de carbono, NP metálicas e poliméricas. Na imobilização por ligações covalentes, dificilmente a enzima irá desprender-se do suporte. Contudo, esse tipo de ligação pode afetar a estrutura nativa da enzima e causar diminuição ou perda total de sua

atividade (SASSOLAS *et al.*, 2012; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012; ANSARI e HUSAIN, 2012).

O resultado do processo de imobilização e estabilização de enzimas está diretamente relacionado às características estruturais da biomolécula, bem como dos materiais empregados para esta finalidade. Desta maneira, uma adequada seleção do material/suporte é essencial para que seja possível a obtenção de um biossensor estável e com o desempenho desejado. Nos últimos anos, novos materiais têm sido investigados para esse fim, em especial os nanomateriais. O emprego de enzimas imobilizadas em materiais nanoestruturados para a construção de biossensores tem resultado em grandes avanços em termos de estabilidade e sensibilidade dos dispositivos analíticos (ANSARI e HUSAIN, 2012; SASSOLAS *et al.*, 2012; DORIA *et al.*, 2012). Outro material que tem se destacado na modificação de eletrodos e que também tem contribuído na estabilização de enzimas é o líquido iônico, o qual vem sendo empregado com sucesso no desenvolvimento de biossensores (FRANZOI *et al.*, 2011). Tratam-se de materiais promissores e ainda pouco explorados, motivo pelo qual se optou em utilizar líquido iônico e nanomateriais (NP metálicas e nanoargilas) no desenvolvimento dos biossensores apresentados neste trabalho (Capítulos 3 e 4).

1.4. LÍQUIDOS IÔNICOS

Os líquidos iônicos (*ionic liquids* – IL) são sais com ponto de fusão abaixo de 100 °C (algumas vezes tão baixo como -96 °C), mantendo-se líquidos sob uma ampla faixa de temperatura, em alguns casos suportando temperaturas acima de 400 °C. Estes sais apresentam fracas interações interiônicas, baixa energia de retículo cristalino, densidades elevadas, baixa volatilidade (pressão de vapor desprezível), boa estabilidade química e térmica, habilidade catalítica, alta condutividade e ampla janela eletroquímica de potencial (>7,0 V, em alguns casos) (DUPONT, 2004; LIU *et al.*, 2005a; WEI e IVASKA, 2008; O'MAHONY *et al.*, 2008; SUN e ARMSTRONG, 2010; SHIDDIKY e TORRIERO, 2011).

Os IL são formados por cátions orgânicos e ânions orgânicos ou inorgânicos, sendo que esta combinação define as propriedades físico-químicas desses compostos. Na Figura 13 são mostrados alguns exemplos de estruturas químicas de cátions e ânions comumente empregados na síntese de IL (DUPONT, 2004; LIU *et al.*, 2005a; WEI e IVASKA, 2008; SUN e ARMSTRONG, 2010). A grande diferença no

tamanho dos íons que formam os IL (em geral, cátion volumoso e ânion pequeno) não permite a formação de um arranjo estrutural rígido (empacotado), como acontece com muitos sais inorgânicos (ex.: NaCl). Isso explica o fato de muitos IL apresentarem-se na forma líquida à temperatura ambiente (WEI e IVASKA, 2008).

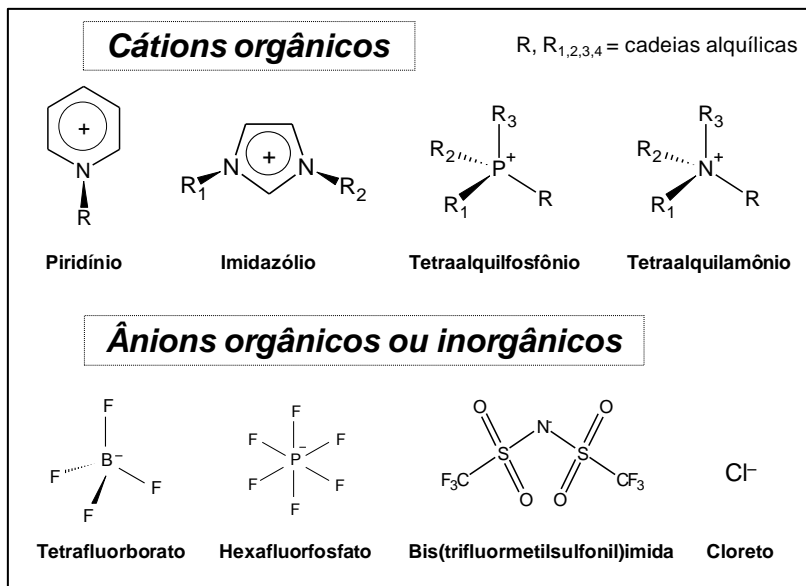


Figura 13. Estrutura química e nomenclatura de cátions e ânions comumente empregados na síntese de IL (adaptada de SUN e ARMSTRONG, 2010).

É importante destacar que os IL não são formados por espécies iônicas isoladas, mas sim por sequências dessas espécies organizadas por diferentes tipos de interações, dentre as quais predominam as forças de atração coulômbicas (interações eletrostáticas), ligações de hidrogênio entre cátion e ânion, interações do tipo empilhamento π entre os anéis aromáticos e interações do tipo van der Waals entre as cadeias alifáticas (CONSORTI *et al.*, 2001; DUPONT e SUAREZ, 2006). A Figura 14 ilustra como estariam organizados os cátions e ânions de um típico IL imidazólio.

A miscibilidade do IL em água é controlada principalmente pelo seu ânion, devido às fortes ligações de hidrogênio que são formadas com as moléculas de água. Deste modo, o ânion exerce um

efeito primário sobre essa propriedade e o cátion exerce um efeito secundário (WELTON, 2004). Por exemplo, IL constituídos pelos ânions cloreto (Cl^-), brometo (Br^-), iodeto (I^-), nitrato (NO_3^-), acetato (CH_3CO_2^-) e trifluoroacetato (CF_3CO_2^-) são miscíveis em água (hidrofílicos), por outro lado IL formados pelos ânions hexafluorofosfato (PF_6^-) e bis(trifluormetilsulfonyl)imida ($(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$) são imiscíveis em água (hidrofóbicos). Já a miscibilidade dos IL compostos pelos ânions tetrafluorborato (BF_4^-) e trifluormetilsulfonato (CF_3SO_3^-) é dependente da estrutura do cátion, ou seja, a miscibilidade diminui com o aumento do comprimento da cadeia alquílica do cátion (SEDDON *et al.*, 2000; WEI e IVASKA, 2008).

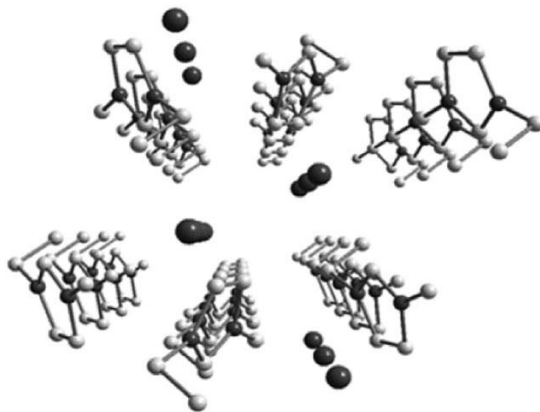


Figura 14. Esquema tridimensional dos arranjos dos cátions 1,3-dialquilimidazólio, mostrando os canais em que os ânions "esféricos" são acomodados (reproduzida de DUPONT e SUAREZ, 2006).

O efeito de impurezas e/ou aditivos (ex.: cloreto, água ou solventes orgânicos) sobre as propriedades dos IL tem sido investigado (SEDDON *et al.*, 2000; O'MAHONY *et al.*, 2008). A presença de água e solventes orgânicos causa uma diminuição da viscosidade dos IL hidrofóbicos, enquanto a presença de cloreto aumenta a viscosidade. Ressalta-se que dentre as impurezas, a água é considerada uma das mais significativas em IL, tendo em vista que até mesmo os IL hidrofóbicos absorvem um pouco de água da atmosfera, fato que causa muitas discrepâncias em medições experimentais de viscosidade. Além disso, presença de água causa um estreitamento na janela eletroquímica, devido provavelmente a eletrólise da água.

Estudos realizados com IL imidazólios mostraram que a estrutura do cátion influencia significativamente na viscosidade. Por exemplo, mantendo-se o mesmo ânion e variando-se apenas o substituinte alquila do cátion imidazólio, verificou-se um aumento na viscosidade, fato que está relacionado com o aumento das interações do tipo van der Waals entre as cadeias alquílicas. Por outro lado, os ânions também exercem certa influência sobre esta propriedade, por exemplo, considerando-se as viscosidades a 30 °C dos IL 1-butil-3-metilimidazólio (BMI.X), para X = BF₄ (2,33 P), PF₆ (3,12 P) e CF₃SO₃ (1,27 P), pode-se observar que os ânions fluoretados BF₄⁻ e PF₆⁻ são mais viscosos (forte interação H...F) do que aqueles formados pelo ânion triflato CF₃SO₃⁻ (presença de carga negativa deslocalizada no sulfonato). Portanto, quanto maior a intensidade das interações do tipo ligação de hidrogênio, as espécies estarão mais fortemente coordenadas, acarretando em uma maior dificuldade de difusão das espécies ao longo da rede cristalina, fazendo com que a viscosidade aumente (CONSORTI *et al.*, 2001; O'MAHONY *et al.*, 2008).

Em eletroquímica, a condutividade do eletrólito é de extrema importância. Neste caso, os IL apresentam vantagens sobre os solventes tradicionais, pois sua condutividade é intrínseca, podendo ser utilizados como eletrólito suporte. A condutividade de um IL puro depende da mobilidade dos seus íons, fato que é influenciado pelo tamanho e interações destes íons. A condutividade nos IL é prejudicada devido aos íons que os compõem serem grandes, fato que diminui a mobilidade dos íons e eleva a viscosidade. Esta diminuição da condutividade pode ser explicada pelo aumento nas interações do tipo van der Waals entre as cadeias alquílicas e ligações de hidrogênio entre as regiões polares dos IL (CONSORTI *et al.*, 2001; O'MAHONY *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, os IL têm ganhado notável espaço em eletroquímica e eletroanalítica, destacando-se a sua aplicação no desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos (WEI e IVASKA, 2008; FRANZOI *et al.*, 2011; OPALLO e LESNIEWSKI, 2011; SHIDDIKY e TORRIERO, 2011; SILVESTER, 2011). Diferentes sensores têm sido desenvolvidos utilizando o IL como material modificador, resultando em dispositivos com desempenho analítico superior aos eletrodos não modificados, especialmente em relação a ganho de sensibilidade, seletividade, tempo de resposta e estabilidade (WEI e IVASKA, 2008; FRANZOI *et al.*, 2011; OPALLO e LESNIEWSKI, 2011; SHIDDIKY e TORRIERO, 2011; SILVESTER, 2011).

1.4.1. Eletrodo de pasta de carbono modificado com IL

O eletrodo de pasta de carbono (*carbon paste electrode* – CPE), tradicionalmente formado pela mistura de pó de carbono (grafite) e um aglutinante não condutor (óleo mineral), é amplamente utilizado em eletroanalítica (ŠVANCARA *et al.*, 2009); e, recentemente, tem sido construído com a substituição (total ou parcial) do óleo mineral por um IL (em geral, hidrofóbico). O CPE modificado com IL (*carbon ionic liquid electrode* – CILE) tem apresentado propriedades melhoradas, incluindo aumento da reversibilidade das reações eletroquímicas e da sensibilidade analítica (WEI e IVASKA, 2008; FRANZOI *et al.*, 2011; OPALLO e LESNIEWSKI, 2011; SHIDDIKY e TORRIERO, 2011; SILVESTER, 2011).

Estudos voltamétricos realizados com os CILE têm demonstrado uma diminuição da separação entre os potenciais de pico catódico e anódico (ΔE_p), proporcionando um aumento na reversibilidade eletroquímica de reações envolvendo compostos redox (ex.: compostos fenólicos), bem como a elevação das densidades de correntes obtidas, contribuindo para a melhoria da sensibilidade analítica, em comparação ao CPE (SUN *et al.*, 2008; SHIDDIKY e TORRIERO, 2011). Além do aumento das correntes faradaicas, as respostas dos CILE também apresentaram uma maior corrente capacitiva em relação ao CPE (SUN *et al.*, 2008; FRANZOI *et al.*, 2011; SHIDDIKY e TORRIERO, 2011).

De acordo com Opallo e Lesniewski (2011), esse aumento nas correntes faradaica e capacitiva é causado pela condutividade iônica do IL, que fornece uma maior área eletroativa ao eletrodo, aumentando a taxa de transferência de elétrons. Isto porque, antes da transferência de elétrons ocorrer, algumas frações do analito polar podem difundir através da interface IL/eletrolito aquoso e, então, a reação com o eletrodo ocorre na interface carbono/IL dentro do CILE (representada como setas arqueadas na Figura 15-B), bem como na interface líquido/líquido (representada como setas retas na Figura 15-B). Isto não é possível no CPE com aglutinante apolar, onde a reação ocorre apenas sobre a superfície das partículas de carbono em contato direto com o eletrolito aquoso (representado como setas arqueadas na Figura 15-A). Este efeito de pré-concentração pode superar a difusão lenta do analito no IL (aglutinante), causada por sua alta viscosidade. Já a corrente capacitiva elevada nos CILE é causada pela eletroatividade da fração de partículas de carbono que estão em contato com IL. Fato que é diferente nos CPE à base de óleo mineral, onde a atividade eletroquímica é

limitada à superfície das partículas de carbono que fazem interface com o eletrólito aquoso, o que explica os baixos valores de corrente capacitiva obtidos com estes eletrodos.

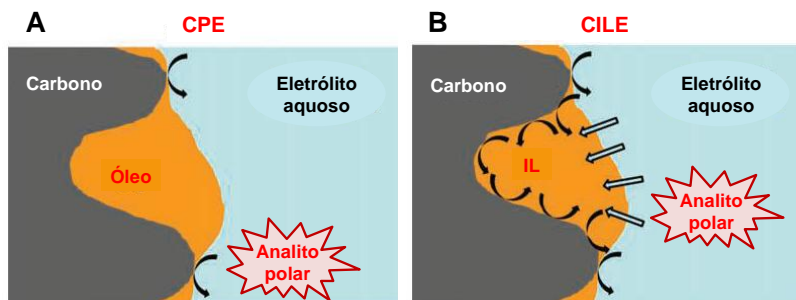


Figura 15. Representação dos possíveis processos de um analito polar na superfície de (A) CPE e (B) CILE. Setas arqueadas marcam a transferência de elétrons heterogênea, enquanto setas retas a transferência na interface líquido/líquido (adaptado de OPALLO e LESNIEWSKI, 2011).

Vários IL têm mostrado uma boa compatibilidade com biomoléculas, destacando-se as enzimas, podendo melhorar a atividade e estabilidade desses biocatalisadores em comparação aos solventes orgânicos convencionais ou soluções aquosas. Supõe-se que as interações entre enzima e IL, tais como ligação de hidrogênio e interação eletrostática, resultam em uma alta barreira cinética para o desenovelamento de enzimas. Desta forma, a estrutura da enzima pode ser protegida de riscos de desnaturação (MONIRUZZAMAN *et al.*, 2010; BIAN *et al.*, 2012; NAUSHAD *et al.*, 2012). Além de fornecer um microambiente adequado para as biomoléculas, muitos dos IL empregados na modificação de biossensores têm contribuído para facilitar a transferência de elétrons entre o centro ativo das enzimas e o eletrodo (SHIDDIKY e TORRIERO, 2011; RUAN *et al.*, 2012). Investigações de biossensores modificados com IL têm demonstrado a capacidade do aumento de estabilidade do material biológico na presença destes compostos e o significativo aumento de sensibilidade obtido devido à alta condutividade dos IL, tornando essa associação muito promissora do ponto de vista analítico (SHIDDIKY e TORRIERO, 2011; FRANZOI *et al.*, 2011; GALHARDO *et al.*, 2012). Além disso, recentemente, a utilização de IL em conjunto com nanomateriais, tais como nanotubos de carbono, grafeno, nanoargilas e NP metálicas, também tem sido alvo de estudos promissores para o

desenvolvimento de dispositivos analíticos cada vez mais seletivos e sensíveis (SHIDDIKY e TORRIERO, 2011; FRANZOI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012; RUAN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013).

1.5. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

As nanopartículas (NP) metálicas estão entre as nanoestruturas mais extensivamente estudadas e usadas na construção de biossensores, especialmente devido as suas características eletrônicas, magnéticas, ópticas e eletroquímicas únicas. As propriedades e aplicações das NP metálicas em eletroanálise têm sido discutidas intensivamente em diversas revisões publicadas nos últimos anos (KERMAN *et al.*, 2008; PINGARRÓN *et al.*, 2008; CAMPBELL e COMPTON, 2010; MERKOÇI, 2010; WILLNER *et al.*, 2011; TOKONAMI *et al.*, 2012; DORIA *et al.*, 2012). Nestas revisões são destacadas algumas das propriedades inigualáveis desses nanomateriais, principalmente a grande área superficial ativa e a extraordinária atividade catalítica associada com seu tamanho controlado e composição. As NP metálicas (especialmente de ouro) podem fornecer um microambiente biocompatível para imobilização de biomoléculas, mantendo sua atividade catalítica e aumentando significativamente a quantidade de biomoléculas imobilizadas sobre a superfície do eletrodo. Além destas vantagens, uma orientação favorável das enzimas sobre as NP metálicas pode facilitar DET entre enzima e eletrodo, especialmente por reduzir a distância entre o grupo prostético e a superfície eletródica e permitir o tunelamento eletrônico (GUO e WANG, 2007; ANSARI e HUSAIN, 2012; DORIA *et al.*, 2012).

Neste sentido, sensores e biossensores construídos com estes nanomateriais têm apresentado resultados promissores, como aumento na sensibilidade, estabilidade e velocidade de resposta, trazendo vantagens significativas para aplicação destes dispositivos em análises clínicas, monitoramento ambiental, segurança alimentar e controle de qualidade de produtos. Tais avanços representam o grande potencial destes dispositivos analíticos, que são uma alternativa interessante para análises rápidas, e de fácil utilização para aplicações em amostras reais (MERKOÇI, 2010; FRANZOI *et al.*, 2011; DORIA *et al.*, 2012; SAEI *et al.*, 2013).

Na síntese de NP metálicas, o controle do tamanho das partículas é um fator de grande importância, visando garantir as propriedades desejadas destes nanomateriais. Desta forma, a estabilização das NP de metais é imprescindível para evitar aglomeração

(coalescência) que leva a formação do metal “*bulk*” (macroscópico) e, portanto, perda das dimensões nanométricas. Diferentes agentes estabilizantes têm sido usados para evitar a aglomeração das NP metálicas, tais como polímeros e IL, os quais fornecem proteção estérica e/ou eletrônica (ROZENBERGA e TENNE, 2008; DUPONT e SCHOLTEN, 2010; HUANG *et al.*, 2012).

1.5.1. NP metálicas estabilizadas em polímeros

Um método geral para a preparação de NP metálicas envolve o tratamento de uma solução diluída do sal de metal (ex.: HAuCl_4 , AgNO_3) com um agente redutor químico (ex.: borohidreto, hidrazina, ascorbato), juntamente com um agente estabilizador para evitar a aglomeração das partículas nanométricas. Polímeros têm se mostrado uma matriz excelente para estabilização de NP metálicas, os quais podem combinar os efeitos de proteção estérica e eletrostática (NOTE *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2012; JIN *et al.*, 2013). Diferentes tipos de polímeros têm sido usados com essa finalidade, tais como polietilenoimina (PEI) (NOTE *et al.*, 2006; CEBRIÁN *et al.*, 2011), polivinilpirrolidona (PVP) (ZAKARINA e BEKTUROV, 2008) e polietilenoglicol (PEG) (SHAMELI *et al.*, 2012), além de polímeros naturais como a goma arábica (MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2009) e a quitosana (JIN *et al.*, 2013).

Alguns polímeros contendo grupos amino em sua cadeia, tais como PEI e quitosana, têm sido usados como matriz na síntese de NP metálicas não só como agentes estabilizadores, mas também como agentes redutores, dispensando a adição de um terceiro reagente (NOTE *et al.*, 2006; CEBRIÁN *et al.*, 2011; JIN *et al.*, 2013). Essas sínteses são realizadas em meio aquoso, e se encaixam na proposta da Química Verde, pois dispensam o uso de solventes orgânicos e reagentes tóxicos, resultando em materiais com excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (CEBRIÁN *et al.*, 2011; JIN *et al.*, 2013).

1.5.1.1. Polietilenoimina

A PEI é polímero catiônico amplamente empregado em diversas áreas, tais como em metodologias de imobilização de enzimas (ROCHEFORT *et al.*, 2008; ZHANG e ROCHEFORT, 2010; BRONDANI *et al.*, 2013), como agente de liberação (ex.: drogas e material genético) (RAJESH *et al.*, 2012), síntese e/ou estabilização de NP metálicas (NOTE *et al.*, 2006; CEBRIÁN *et al.*, 2011; BRONDANI

et al., 2013). Sua estrutura contém grupos aminos, e apresenta-se de duas formas: linear ou ramificada (Figura 16). A PEI linear é sólida à temperatura ambiente, enquanto a PEI ramificada é líquida em todas as massas molares (SEGUT *et al.*, 2010).

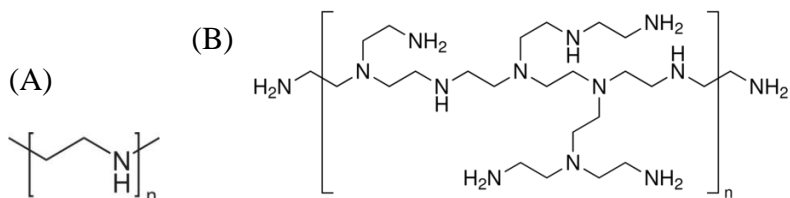


Figura 16. Estrutura química da polietilenoimina (A) linear e (B) ramificada (adaptado de INTRA e SALEM, 2008).

1.5.2. NP metálicas estabilizadas em IL

IL têm sido empregados com sucesso como solvente para a síntese e estabilização de diversas NP metálicas, em especial os IL derivados do 1-*n*-butil-3-metilimidazólio (MIGOWSKI e DUPONT, 2007; SCHEEREN *et al.*, 2008; DUPONT e SCHOLTEN, 2010). Estudos demonstraram que os IL apresentam estrutura polimérica de interações fracas, que são capazes de criar uma proteção estérica e eletrônica em torno da NP, evitando dessa forma a agregação (MIGOWSKI e DUPONT, 2007; DUPONT e SCHOLTEN, 2010). Outra vantagem da utilização dos IL é a possibilidade de empregar a solução iônica contendo as NP dispersas diretamente em reações orgânicas e na modificação de sensores e biossensores. Assim, a combinação do IL com as NP de metais normalmente exibe um efeito sinérgico excelente que aumenta atividade e robustez do catalisador (MIGOWSKI e DUPONT, 2007; DUPONT e SCHOLTEN, 2010).

1.6. NANOTUBOS DE HALOISITA

Haloisita (*halloysite*), um argilomineral do grupo da caulinita, é um nanomaterial economicamente viável, que ocorre amplamente em solos de regiões tropicais e subtropicais e rochas desgastadas, sendo formado pelo intemperismo de muitos tipos de rochas ígneas e não ígneas. As partículas de haloisita podem adotar uma variedade de morfologias (ex.: tubular, esférica, pseudo-esférica, prismática, etc.),

conforme as condições de cristalização e ocorrências geológicas, dentre as quais a forma tubular é a mais encontrada, sendo denominada de nanotubo de haloisita (*halloysite nanotube* – HNT). Predominantemente, a haloisita pode ser encontrada na forma hidratada, denominada de haloisita-10 Å ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; distância basal de 10 Å (1,0 nm)) ou na forma anidra, haloisita-7 Å ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$; distância basal de 7 Å (0,7 nm)), com composição idêntica à caulinita (JOUSSEIN *et al.*, 2005; NAKAGAKI e WYPYCH, 2007; LVOV *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009). Apenas se conhece a ocorrência natural dos HNT, sendo que este nanomaterial ainda não foi sintetizado em laboratório (WHITE *et al.*, 2012). Atualmente, o maior país exportador de HNT é a Nova Zelândia, mas existem depósitos expressivos também em outros países, como por exemplo: Austrália, França, Marrocos, Filipinas, Coreia do Sul, China, Japão, USA, Guiana, México e Brasil (JOUSSEIN *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2007).

A estrutura cristalina dos HNT é formada por camadas enroladas, as quais são compostas por folhas tetraédricas de SiO_4 e octaédricas de AlO_6 , constituindo um aluminossilicato em camadas do tipo 1:1 (Figura 17). Em cada nanotubo, a superfície externa é composta de grupos siloxanos (Si-O-Si), enquanto a superfície interna consiste de grupos hidroxilas (Al-OH). Predominantemente, os HNT são formados de multicamadas, apresentando mais de dez camadas. As dimensões deste material variam de 500-1000 nm de comprimento e de 15-100 nm de diâmetro interno, sendo estas características dependentes do depósito de origem (JOUSSEIN *et al.*, 2005; NAKAGAKI e WYPYCH, 2007; YUAN *et al.*, 2008; WHITE *et al.*, 2012).

Na Figura 18 (A e B) são apresentadas imagens de microscopia eletrônica de varredura (*scanning electron microscopy* – SEM) e microscopia eletrônica de transmissão (*transmission electron microscopy* – TEM) de amostras de HNT com diferentes ampliações. A imagem de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (*high-resolution transmission electron microscopy* – HRTEM) de um corte transversal de um nanotubo (Figura 18-C), em conjunto com a representação esquemática das paredes múltiplas de HNT típicos, auxiliam na compreensão da estrutura desses nanomateriais.

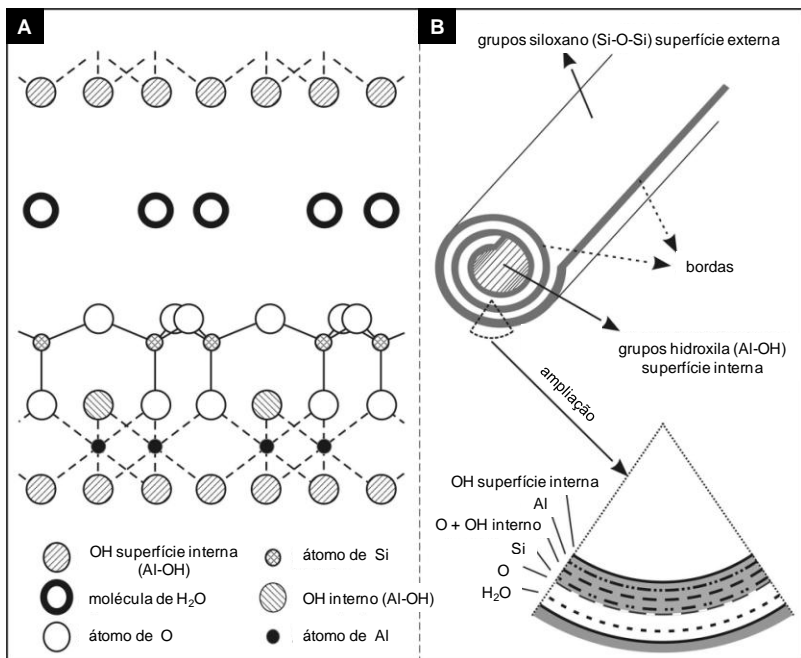


Figura 17. Representações esquemáticas da (A) estrutura cristalina da haloisita (10 Å) e da (B) estrutura de um HNT (reproduzido de YUAN *et al.*, 2008).

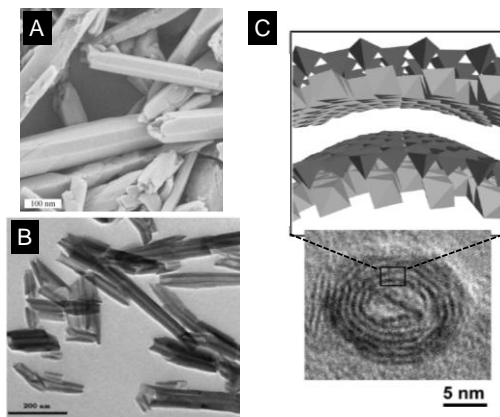


Figura 18. Imagens de (A) SEM (reproduzida de SHCHUKIN *et al.*, 2005) e (B) TEM (reproduzida de VERGARO *et al.*, 2010) de HNT. (C) Representação esquemática das paredes múltiplas dos HNT, juntamente com imagem de HRTEM de um corte transversal (reproduzida de WHITE *et al.*, 2012).

Em virtude do expressivo progresso alcançado através da nanotecnologia, os HNT, recentemente, têm recebido atenção de pesquisadores, sendo investigados como materiais promissores para aplicações em diversas áreas, tais como na formação de nanocompósitos com matrizes poliméricas (WAGNER *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2010), imobilização de enzimas (SHCHUKIN *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2012) e complexos metálicos (NAKAGAKI e WYPYCH, 2007; MACHADO *et al.*, 2008), liberação controlada de fármacos (LVOV *et al.*, 2008), remoção de metais (WANG *et al.*, 2010), suporte para nanopartículas metálicas (LIU e ZHAO, 2009; CAI *et al.*, 2011) e construção de sensores e biossensores (XING e YIN, 2009; SUN *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2012).

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo principal aplicar materiais nanoestruturados (NP metálicas e HNT) e IL na construção de biossensores eletroquímicos para determinação de compostos fenólicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Biossensor contendo NP de platina (PtNP) dispersas em IL e PO imobilizada em HNT

- Obter um extrato vegetal (broto de trevo) contendo a enzima PO e determinar a atividade enzimática por método espectrofotométrico;
- Imobilizar a PO através de adsorção física sobre os HNT;
- Construir um biossensor à base de pasta de carbono modificada com PtNP dispersas em IL e PO imobilizada nos HNT;
- Otimizar as quantidades dos modificadores (PO, HNT, IL e PtNP) utilizados na construção do biossensor;
- Otimizar os parâmetros experimentais (pH e natureza do eletrólito suporte, concentração de peróxido de hidrogênio) e os parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada (*square-wave voltammetry* – SWV) (frequência, amplitude e incremento);
- Investigar a contribuição de cada material modificador sobre o desempenho analítico do biossensor;
- Realizar estudos de repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade do biossensor;
- Construir curvas de calibração para os compostos fenólicos previamente selecionados (catecolaminas: dopamina, isoproterenol, dobutamina e epinefrina) usando o biossensor e determinar os limites de detecção (*limit of detection* – LOD) e quantificação (*limit of quantitation* – LOQ) do método proposto;
- Aplicar o biossensor desenvolvido na determinação de dopamina em amostras de solução injetável, bem como realizar estudos de recuperação, usando SWV;
- Comparar o teor de dopamina nas amostras determinado através do biossensor proposto em relação ao método oficial espectrofotométrico.

2.2.2. Biossensor à base de NP de ouro (AuNP) revestidas com PEI e decoradas com LAC

- Extrair a enzima LAC de microcápsulas comerciais e determinar a atividade enzimática do extrato por método espectrofotométrico;
- Imobilizar a LAC através de interações eletrostáticas sobre as AuNP revestidas com PEI;
- Construir um biossensor à base de um filme de AuNP revestidas com PEI e decoradas com LAC sobre um eletrodo de carbono vítreo (*glassy carbon electrode* – GCE);
- Realizar estudos eletroquímicos para caracterização do biossensor, utilizando voltametria cíclica (*cyclic voltammetry* – CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (*electrochemical impedance spectroscopy* – EIS);
- Otimizar as quantidades dos modificadores (LAC, AuNP, PEI) utilizados na construção do biossensor;
- Otimizar os parâmetros experimentais (pH e natureza do eletrólito suporte) e os parâmetros da técnica de SWV (frequência, amplitude e incremento);
- Investigar a contribuição de cada material modificador sobre o desempenho analítico do biossensor;
- Realizar estudos de repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade do biossensor;
- Construir curvas de calibração para os compostos fenólicos previamente selecionados (catecol, guaiacol, pirogalol e hidroquinona) usando o biossensor e determinar o LOD e o LOQ do método proposto;
- Aplicar o biossensor desenvolvido na determinação de catecol em amostras de águas fortificadas, bem como realizar estudos de recuperação, usando SWV.

CAPÍTULO 3 – BIOSSENSOR CONTENDO PtNP DISPERSAS EM IL E PO IMOBILIZADA EM HNT

Publicado em: Analyst, 137, 3732–3739, 2012.

3.1. INTRODUÇÃO

Catecolaminas, tais como a dopamina, isoproterenol (isoprenalina), dobutamina e epinefrina (adrenalina) (Figura 19), são fármacos amplamente utilizados em tratamentos de doenças do coração, asma brônquica, emergências alérgicas e também em cirurgia cardíaca e infarto do miocárdio (SOLICH *et al.*, 2000; CHEN e LIU, 2005; GOYAL e BISHNOI, 2011). As catecolaminas também são produzidas pelos humanos através da ativação do sistema nervoso simpático, e desempenham importante papel como hormônios e neurotransmissores, atuando, por exemplo, sobre a pressão arterial, a frequência cardíaca, a glicogenólise, a lipólise e a temperatura do corpo (SILVA *et al.*, 2009; GOYAL e BISHNOI, 2011). Dopamina, um dos mais importantes neurotransmissores, está envolvida no controle das funções motoras, endócrina, de recompensa e de cognição. Desordens no sistema dopaminérgico estão diretamente ligadas às doenças de Parkinson, de Alzheimer e esquizofrenia (OAK *et al.*, 2000).

Diferentes técnicas analíticas têm sido utilizadas no desenvolvimento de várias metodologias para a determinação de catecolaminas em produtos farmacêuticos e fluidos biológicos, incluindo espectrofotometria (SOLICH *et al.*, 2000), cromatografia (FERREIRA *et al.*, 2009), quimioluminescência (LIU *et al.*, 2005b), eletroforese capilar (WEI *et al.*, 2005) e voltametria (CHERNYSHOV *et al.*, 2008; IZAUMEN *et al.*, 2009; ENSAFI *et al.*, 2011; GOYAL e BISHNOI, 2011). No entanto, algumas dessas técnicas requerem longos períodos para a execução das análises, além de apresentarem elevados custos de instrumentação e reagentes. O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, especialmente aqueles que empregam técnicas voltamétricas, tem se destacado por ser uma alternativa eficiente para a determinação de compostos fenólicos em diversos tipos de amostras. Algumas vantagens das análises utilizando voltametria, em relação às técnicas cromatográficas, por exemplo, são a sua resposta

rápida, uma boa sensibilidade, baixo custo de equipamento e reagentes, e geralmente não há necessidade de pré-tratamento da amostra.

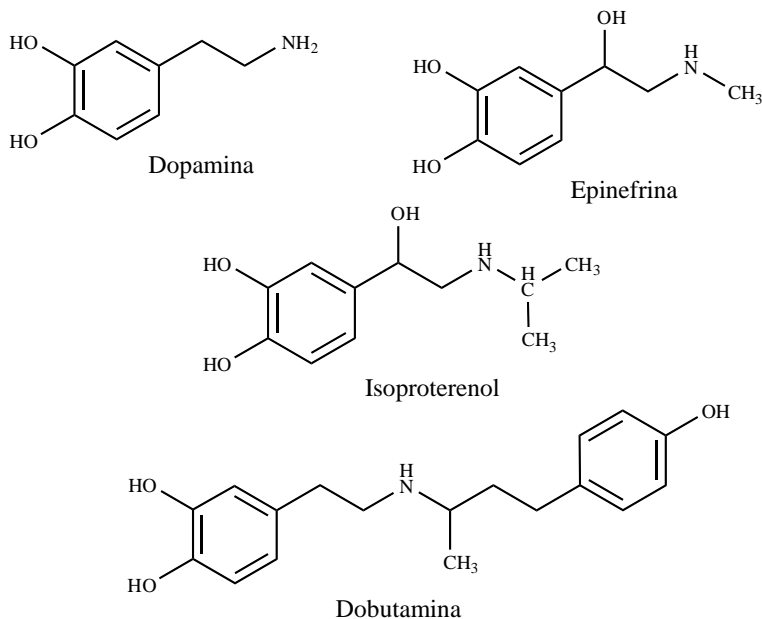


Figura 19. Estruturas químicas de algumas catecolaminas.

Neste contexto, a utilização de biossensores para determinação de compostos fenólicos baseados em enzimas oxirredutases, tais como tirosinase (APETREI *et al.*, 2011; JANEGITZ *et al.*, 2012), LAC (MOCCELINI *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012) e PO (SUN *et al.*, 2010; GRANERO *et al.*, 2010), vêm sendo amplamente explorada. PO são enzimas heme encontrados em várias plantas, microorganismos e animais, que exploram a redução do peróxido de hidrogênio para catalisar reações de oxidação de uma variedade de substratos, tais como os compostos fenólicos (BATTISTUZZI *et al.*, 2010; POULOS, 2010).

A imobilização de enzimas pode melhorar a estabilidade dessas biomoléculas, mantendo sua atividade catalítica durante um período de tempo maior, em comparação com enzimas livres (MATEO *et al.*, 2007). Entre os vários métodos disponíveis para a imobilização de biomoléculas, a adsorção se destaca pela sua simplicidade e baixo custo (SASSOLAS *et al.*, 2012). Vários materiais nanoestruturados, os quais dispõem de uma grande área superficial para interações enzima-suporte,

têm sido utilizados nesse processo, tais como nanotubos de carbono (FENG e JI, 2011), nanofibras e nanofios poliméricos (KIM *et al.*, 2006; XIA *et al.*, 2010), NP metálicas ou poliméricas (KIM *et al.*, 2006; ANSARI e HUSAIN, 2012), sílica mesoporosa (KIM *et al.*, 2006; ANSARI e HUSAIN, 2012) e nanoargilas (TZIALLA *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012).

Recentemente, IL têm sido utilizados na estabilização de enzimas, podendo inclusive contribuir para o aumento da atividade catalítica dessas proteínas (BIAN *et al.*, 2012; NAUSHAD *et al.*, 2012). Os IL também têm sido empregados na construção de biossensores eletroquímicos, possibilitando um aumento no desempenho analítico desses dispositivos (FRANZOI *et al.*, 2011; GALHARDO *et al.*, 2012). Além disso, os IL têm sido usados juntamente com nanomateriais (ex.: NP metálicas, nanotubos de carbono e grafeno) em sistemas de biossensoriamento, proporcionando um microambiente adequado para a atividade enzimática e transferência de elétrons entre o centro ativo da enzima e o eletrodo (SHIDDIKY e TORRIERO, 2011).

Neste estudo, HNT foram utilizados como suporte para a imobilização da enzima PO obtida a partir de uma nova fonte enzimática, brotos de trevo (*Trifolium*), e empregados em conjunto com NP de platina dispersas em IL hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (Pt-BMI.PF₆) no desenvolvimento de um biossensor para a determinação de catecolaminas por SWV.

3.2. PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1. Instrumentação

O extrato enzimático foi obtido utilizando-se um liquidificador Black & Decker modelo IB900 para homogeneização do material vegetal. Um espectrofotômetro Micronal modelo B572 e cubeta de quartzo (1,00 cm de caminho óptico) foram usados para a determinação da atividade do extrato enzimático.

Um banho ultrassônico Unique 1400A foi utilizado para auxiliar no preparo das soluções.

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT101 (Metrohm Autolab, Holanda) interfaceado a um microcomputador, sendo o processamento de dados feito através do *software* NOVA (versão 1.6.013). Para execução das análises, utilizou-se uma célula de vidro (capacidade máxima aproximada de 15 mL) sem compartimento divisório e com tampa de

resina de acetal provida de orifícios circulares para encaixe dos eletrodos e adição das soluções. Foi utilizado um sistema de três eletrodos: o biossensor desenvolvido no laboratório aplicado como eletrodo de trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência e uma placa de platina (aproximadamente 0,5 cm²) como eletrodo auxiliar.

As quantificações de dopamina pelo método comparativo espectrofotométrico foram realizadas em um espectrofotômetro UV-vis Hewlett-Packard (Boise, ID, USA), modelo 8452A, com cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico.

3.2.2. Reagentes, soluções e amostras

HNT (Al₂Si₂O₅(OH)₄.2H₂O) foram obtidos da Sigma-Aldrich, sendo que este material apresenta diâmetro médio do tubo de 50 nm (externo) e 15 nm (interno), com área superficial média de 65 m² g⁻¹ e volume do poro de ~1,25 mL g⁻¹.

Enzima PO foi obtida de brotos de trevo (*Trifolium*), os quais foram obtidos frescos em um supermercado local (Florianópolis – SC) e armazenados em refrigerador a 4 °C. Na determinação da atividade enzimática da PO do extrato vegetal foram utilizados guaiacol (Aldrich, 98%) e peróxido de hidrogênio (Vetec, 30%), sendo este último padronizado através de titulação permanganométrica.

O IL BMI.PF₆ e as PtNP dispersas em IL (Pt-BMI.PF₆) foram sintetizados e caracterizados conforme previamente descrito na literatura (SCHEEREN *et al.*, 2006 e 2008) pela Dr.^a Carla Weber Scheeren no Laboratório de Catálise Molecular (LAMOCA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, Porto Alegre – RS), coordenado pelo Prof. Dr. Jairton Dupont, e fornecidos para o presente trabalho. As NP metálicas caracterizadas por TEM e difração de raios-X (*X-ray diffraction* – XRD) apresentaram um tamanho médio de 2,3±0,4 nm.

Para construção dos biossensores à base de pasta de carbono foi usado pó de grafite (Acheson 38) da Fisher Scientific e Nujol (óleo mineral purificado) obtido da Aldrich.

Os reagentes de grau analítico de dopamina, isoproterenol, dobutamina, epinefrina, ácido ascórbico e ácido úrico foram obtidos da Sigma-Aldrich. Soluções tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹) de diferentes valores de pH (6,0–8,0) foram preparadas a partir de Na₂HPO₄ e NaH₂PO₄, ajustando o pH com H₃PO₄ ou NaOH quando necessário, e as soluções tampão acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 4,0–5,0) foram preparadas similarmente usando CH₃COOH e CH₃COONa (ajustando o pH com

CH₃COOH ou NaOH). Essas soluções tampão foram preparadas com reagentes obtidos da Vetec, e usadas como eletrólito suporte nos estudos de otimização do biossensor.

Amostras de soluções injetáveis de cloridrato de dopamina (5 mg mL⁻¹) de diferentes marcas (identificadas como A, B e C) foram fornecidas pelo Hospital da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis – SC), e foram analisadas empregando-se o biossensor proposto e o método comparativo espectrofotométrico.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, e todas as soluções foram preparadas com água deionizada.

3.2.3. Obtenção do extrato vegetal e determinação de atividade enzimática da PO

O extrato vegetal contendo PO foi obtido a partir da homogeneização de 25,0 g de brotos de trevo juntamente com 50 mL de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0), com auxílio de um liquidificador. O extrato bruto vegetal (homogenato) foi rapidamente filtrado em quatro camadas de gaze e, subsequentemente, passou por filtração em holder com membrana 0,45 µm (Millipore, Bedford, USA) para eliminação dos resíduos sólidos de tecido vegetal. O extrato enzimático filtrado foi armazenado em frascos âmbar, sob refrigeração (4 °C), e usado como fonte da enzima PO.

A atividade da PO no extrato de broto de trevo foi determinada medindo-se a variação de absorbância referente ao tetraguaiacol produzido durante a reação enzimática. Essa determinação foi realizada em triplicata, misturando-se 0,2 mL do extrato vegetal filtrado, 2,7 mL de uma solução 0,05 mol L⁻¹ de guaiacol e 0,1 mL de uma solução 9,8 mmol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio para cada análise. Após a homogeneização dessas soluções, foi acompanhada espectrofotometricamente a variação da absorbância em um comprimento de onda de 470 nm, durante cerca de 2 min, a temperatura ambiente (OLIVEIRA, 2007; FERNANDES *et al.*, 2007).

A atividade enzimática – unidade mL⁻¹ – definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto, sob as condições mencionadas, foi determinada pela Equação 5 (OLIVEIRA, 2007; FERNANDES *et al.*, 2007).

$$A = \frac{\Delta \text{Abs} \times 1000}{\Delta t \times V} \quad (\text{Eq. 5})$$

A = atividade da enzima (unidade mL⁻¹)

Δ Abs = variação da absorbância ($\lambda = 470$ nm)

V = volume do extrato enzimático (mL)

Δ t = variação do tempo (min)

3.2.4. Imobilização de PO sobre HNT

A enzima PO foi imobilizada sobre HNT por meio de adsorção física, utilizando a seguinte metodologia: uma alíquota de extrato vegetal contendo enzima PO (500–2000 unidades) foi adicionada sobre 20 mg de HNT. Uma pasta foi obtida após homogeneização com uma espátula (por cerca de 5 min), sendo essa mistura seca à temperatura ambiente. O material resultante contendo enzima adsorvida (PO-HNT) foi utilizado para a construção do biossensor.

3.2.5. Construção do biossensor

O procedimento usado para construir o biossensor seguiu a metodologia desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa (BRONDANI *et al.*, 2009). Primeiramente, 140 mg de pó de grafite (70%, em massa) e 20 mg de HNT contendo 1500 unidades de PO imobilizada (10%, em massa) foram homogeneizados durante 15 min, com o auxílio de um almofariz e um pistilo. Subsequentemente, 20 mg de Nujol (10%, em massa) e 20 mg de Pt-BMI.PF₆ (10%, em massa), foram adicionados à mistura, que foi então homogeneizada durante mais 15 min. Após a homogeneização completa, a pasta obtida foi compactada em ponta de uma seringa de plástico (capacidade: 1 mL; diâmetro interno: 1,0 mm). Finalmente, um fio de cobre (dimensões: 0,4 cm x 10,0 cm) foi inserido para obter o contato elétrico, e o biossensor foi então utilizado como o eletrodo de trabalho.

Para fins comparativos, sensores com ou sem PO contendo HNT, HNT-BMI.PF₆ e HNT-Pt-BMI.PF₆ foram preparados seguindo os mesmos procedimentos. Um CPE não modificado foi preparado de um modo semelhante através da mistura de apenas pó de grafite e Nujol.

3.2.6. Medidas eletroquímicas

Todas as medidas de SWV foram realizadas à temperatura ambiente numa célula eletroquímica contendo uma alíquota de 10,0 mL de eletrólito suporte e alíquotas conhecidas de uma solução padrão de

dopamina (ou de outras catecolaminas: dobutamina, epinefrina ou isoproterenol) ou uma amostra de formulação farmacêutica, transferidas com auxílio de um micropipetador automático. Para otimização do método proposto, os parâmetros de SWV foram investigados nas seguintes faixas: frequência de 10–100 Hz, amplitude de pulso de 10–100 mV e incremento de 1–10 mV. Os valores de potencial são reportados vs. Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl), e um tempo de agitação de 60 segundos foi usado para homogeneizar a solução entre as adições. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, e as barras de erro representam o desvio padrão da média aritmética de três repetições.

3.2.7. Preparação das amostras farmacêuticas e quantificação da dopamina

As amostras injetáveis de cloridrato de dopamina (A, B e C) foram adequadamente diluídas em solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0), e quantificadas usando o biossensor proposto através do método de adição de padrão. A quantificação foi realizada sob as condições otimizadas, em quintuplicata, da seguinte maneira: uma alíquota da amostra previamente diluída foi transferida para a célula eletroquímica contendo eletrólito suporte, sendo realizada a medida de SWV, na sequência, alíquotas de solução padrão de dopamina foram adicionadas, sendo realizadas as medidas voltamétricas após cada adição e homogeneização da solução.

Para verificar a exatidão da metodologia proposta, as amostras farmacêuticas também foram quantificadas através do método comparativo espectrofotométrico (FARMACOPÉIA AMERICANA, 1995).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Determinação da atividade enzimática da PO

O extrato vegetal enzimático foi obtido de brotos de trevo (*Trifolium*) e utilizado como fonte da enzima PO para a construção do biossensor. A atividade da PO foi investigada, em triplicata, por espectrofotometria em um comprimento de onda de 470 nm, acompanhando-se a absorbância do tetraguaiacol formado na reação enzimática (Figura 20), conforme descrito anteriormente (item 3.2.3).

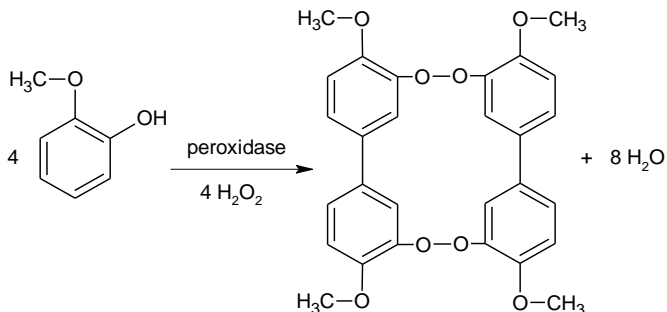


Figura 20. Reação de formação do tetraguaiacol a partir do guaiacol, catalisada pela enzima PO, na presença de peróxido de hidrogênio.

De acordo com o gráfico da variação da absorbância vs. tempo de reação (Figura 21), pode-se calcular a atividade da PO através da Equação 5 (item 3.2.3), utilizando a parte linear do gráfico, obtendo-se um valor médio de atividade enzimática igual a 52.000 unidades por mililitro do extrato vegetal.

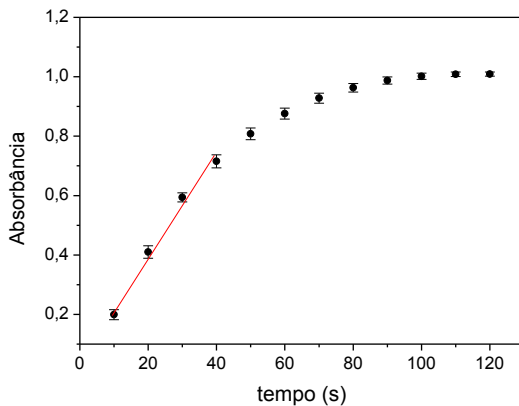


Figura 21. Variação da absorbância ($\lambda = 470 \text{ nm}$) do tetraguaiacol formado na reação com a enzima PO de brotos de trevo (*Trifolium*) em função do tempo.

O valor de atividade da enzima PO obtido para o extrato de brotos de trevo foi significativamente elevado, se comparado a outras fontes vegetais estudadas anteriormente, tais como: grãos de ervilha ($16.660 \text{ unidades mL}^{-1}$) (BRONDANI *et al.*, 2011), grãos de milho verde ($8.570 \text{ unidades mL}^{-1}$) (BRONDANI *et al.*, 2009), batata doce

(8.688 unidades mL^{-1}) e abobrinha (6.726 unidades mL^{-1}) (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002). Além disso, o extrato de brotos de trevo apresenta baixo custo, facilidade de obtenção, e ainda não tem sido explorado como fonte enzimática para construção de biossensores.

3.3.2. Imobilização de PO em HNT

Neste estudo, a imobilização da PO foi realizada por adsorção física utilizando os HNT como suporte sólido. O mecanismo proposto para a imobilização da enzima sobre os HNT é baseado em interações não covalentes, principalmente interações eletrostáticas e ligação de hidrogênio entre os aminoácidos da estrutura enzimática e a superfície da nanoargila. A imobilização foi eficiente, principalmente, devido às características do suporte escolhido, tais como biocompatibilidade e grande área superficial. Os resultados experimentais sugerem que a enzima manteve a sua atividade quando imobilizada e aplicada na construção do biossensor, como pode ser observado no estudo sobre a contribuição dos materiais modificadores sobre a resposta do biossensor proposto (item 3.3.4), que será apresentado a seguir. Além disso, a imobilização enzimática, em geral, contribui para o aumento da estabilidade do biossensor e, por conseguinte, permite a sua aplicação por um longo período de tempo.

3.3.3. Princípio de funcionamento do biossensor proposto

A Figura 22-A mostra os componentes usados na construção do biossensor, com destaque para as PtNP dispersas em IL e os HNT contendo PO imobilizada, sendo que a PO atua como catalisador na reação enzimática que ocorre na superfície do biossensor.

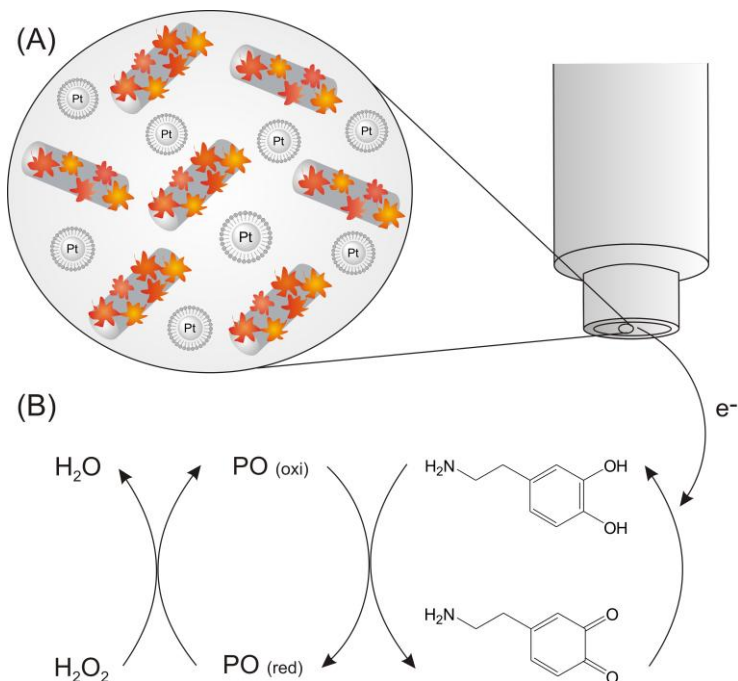


Figura 22. Representação esquemática de (A) pasta de carbono modificada com Pt-BMI.PF₆ e PO imobilizada em HNT, e (B) reação enzimática entre dopamina e PO, na presença de H₂O₂, com redução eletroquímica da *o*-quinona formada na superfície do biossensor.

Como pode ser observado na representação esquemática (Figura 22-B), o processo tem início com a oxidação da PO na presença de peróxido de hidrogênio, e subsequente redução das enzimas na presença de dopamina. Essa catecolamina é então convertida à *o*-quinona correspondente através da reação com a PO, sendo essa quinona reduzida eletroquimicamente sobre a superfície do biossensor a um potencial aproximado de 0,14 V vs. Ag/AgCl. A corrente resultante do processo de redução é proporcional à concentração de dopamina, sendo usada para a quantificação do analito. O mesmo processo pode ser estendido para as outras catecolaminas estudadas (dobutamina isoproterenol e epinefrina), mudando apenas o potencial de pico.

3.3.4. Estudo sobre a contribuição dos modificadores utilizados na construção do biossensor

Eletrodos com diferentes composições foram utilizados em um estudo realizado para avaliar a contribuição dos materiais modificadores (PO, HNT, IL e PtNP) sobre a resposta analítica do biossensor proposto. A Figura 23-A mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o (a) CPE não modificado e os CPE modificados: (b) CPE-PO, (c) CPE-HNT, (d) CPE-HNT-PO, (e) CPE-HNT-BMI.PF₆, (f) CPE-HNT-BMI.PF₆-PO, (g) CPE-HNT-Pt-BMI.PF₆ e (h) CPE-HNT-Pt-BMI.PF₆-PO. Todas as medidas de SWV foram realizadas em solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0) contendo 98,0 μmol L⁻¹ de H₂O₂ e 18,87 μmol L⁻¹ de dopamina com uma frequência de 50 Hz, amplitude de 100 mV e incremento de 5 mV. Na Figura 23-B são apresentados os valores médios de corrente obtidos com cada um dos diferentes eletrodos, sendo este estudo realizado em triplicata.

De acordo com os resultados obtidos, a adição sucessiva de materiais modificadores à pasta de carbono provocou alterações no desempenho dos eletrodos, conduzindo a um aumento da resposta analítica. A adição de PO ao eletrodo (biossensor "b") provocou um aumento significativo na corrente de pico para a dopamina, a qual foi de aproximadamente oito vezes maior do que a corrente obtida com o CPE não modificado (eletrodo "a"). Isto se deve à enzima estar atuando como um catalisador na oxidação desta catecolamina, na superfície do eletrodo. A adição de HNT no eletrodo (sensor "c") também proporcionou um aumento significativo na corrente da dopamina (cerca de seis vezes maior do que o CPE não modificado), sugerindo um possível aumento na área superficial ativa do sensor, tendo em vista a elevada porosidade deste nanomaterial, o que também favorece a "pré-concentração" de moléculas do analito sobre a superfície do eletrodo. O biossensor (d), construído com PO imobilizada na nanoargila, apresentou uma corrente de pico maior do que as obtidas com os eletrodos (b) ou (c), que contêm apenas a enzima ou HNT; e, adicionalmente, sugere-se que o processo de imobilização também contribui para aumentar a estabilidade da enzima.

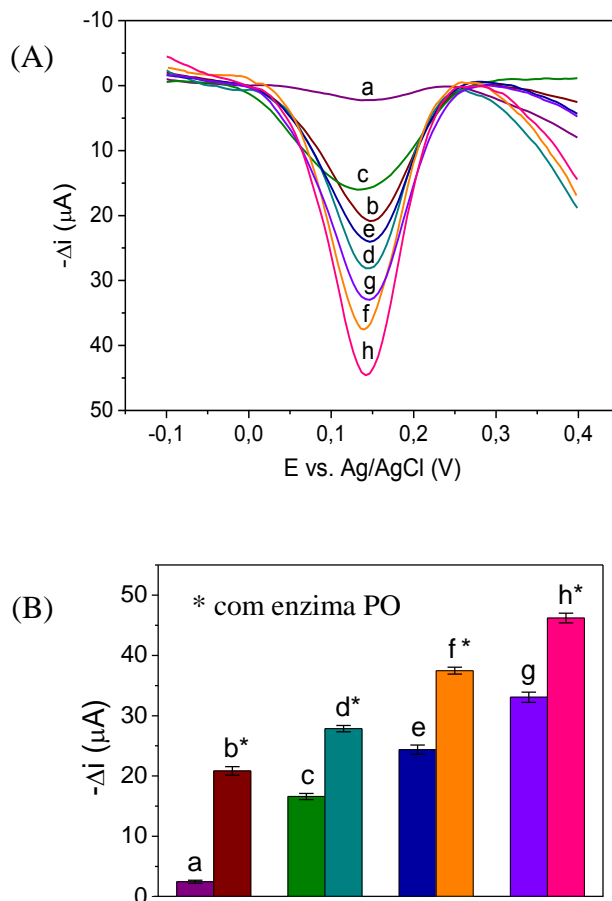


Figura 23. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando diferentes eletrodos: (a) CPE sem modificação, (b) CPE-PO, (c) CPE-HNT, (d) CPE-HNT-PO, (e) CPE-HNT-BMI.PF₆, (f) CPE-HNT-BMI.PF₆-PO, (g) CPE-HNT-Pt-BMI.PF₆, (h) CPE-HNT-Pt-BMI.PF₆-PO em solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0) contendo 98,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de H₂O₂ e 18,87 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina em frequência de 50 Hz, amplitude de 100 mV e incremento de 5 mV. (B) Valores médios de corrente obtidos com cada um dos diferentes eletrodos (n=3).

Conforme esperado, os eletrodos (e) e (f) apresentaram uma melhoria significativa na resposta analítica, promovida provavelmente pela elevada condutividade do IL, o que diminui a resistência à transferência de carga. Um ganho importante na resposta foi obtido também com a adição de PtNP (sensor "g"), as quais contribuem para o aumento na taxa de transferência de elétrons, que surge a partir dos processos redox. Além disso, a utilização de enzima imobilizada (PO-HNT) para a construção do biossensor (h) causou um aumento expressivo na corrente de pico para a dopamina, devido à elevada atividade catalítica da PO, a qual foi preservada através da eficiente imobilização. Sun e coautores (2010) sugerem que a utilização de HNT na imobilização enzimática pode facilitar a HET entre a enzima e a superfície do eletrodo, devido ao microambiente biocompatível disponível e a uma possível orientação favorável das biomoléculas. Além disso, a combinação das NP metálicas com o IL pode também contribuir na estabilização de enzimas, prolongando a sua vida útil (FRANZOI *et al.*, 2011).

Para complementar esse estudo, uma investigação utilizando a técnica de CV também foi realizada para avaliar a resposta voltamétrica de diferentes composições eletródicas. Os eletrodos usados foram os seguintes: (a) CPE sem modificação, (b) CPE-HNT, (c) CPE-HNT-BMI.PF₆, (d) CPE-HNT-Pt-BMI.PF₆ e (e) CPE-HNT-Pt-BMI.PF₆-PO; e os voltamogramas cíclicos foram obtidos em solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0) contendo 98,0 μmol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio e 0,90 mmol L⁻¹ de dopamina. Através dos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 24, foi possível observar que as sucessivas adições de modificadores aos eletrodos causaram uma diminuição significativa da separação entre os potenciais de pico anódico e catódico ($\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}|$), especialmente em relação ao CPE não modificado, ao mesmo tempo em que as correntes de pico também sofreram um significativo aumento.

Portanto, com base nos resultados obtidos usando SWV e CV, o presente estudo confirma as vantagens da utilização dos materiais modificadores investigados para o desenvolvimento de biossensores com desempenho analítico melhorado, especialmente em termos de reversibilidade, sensibilidade e estabilidade.

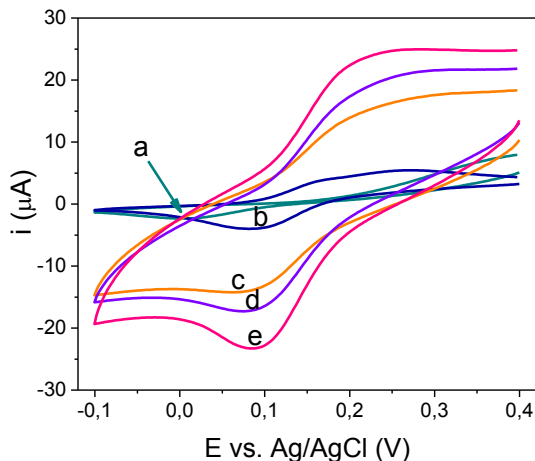


Figura 24. Voltamogramas cíclicos obtidos usando diferentes eletrodos: (a) CPE sem modificação, (b) CPE-HNT, (c) CPE-HNT-BMI.PF₆, (d) CPE-HNT-Pt-BMI.PF₆ e (e) CPE-HNT-Pt-BMI.PF₆-PO, em solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0) contendo 98,0 μmol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio e 0,90 mmol L⁻¹ de dopamina, com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

3.3.5. Efeito do pH sobre a resposta voltamétrica

O pH da solução do eletrólito suporte tem uma influência significativa sobre o comportamento eletroquímico da dopamina, podendo levar a variações de corrente de pico e de potencial de pico. Portanto, uma investigação sobre o efeito do pH da solução do eletrólito sobre a corrente e potencial de pico da dopamina foi realizada por SWV, em triplicata, utilizando o biossensor proposto em uma série de soluções tampão com diferentes valores de pH, variando de 4 a 8 (acetato pH 4–5 e fosfato pH 6–8), contendo 3,92 μmol L⁻¹ de dopamina e 98,0 μmol L⁻¹ de H₂O₂. De acordo com os resultados mostrados na Figura 25 (a), o potencial de pico para a dopamina apresentou uma variação linear com o pH, sendo observado um deslocamento do pico para potenciais mais negativos conforme elevou-se o pH. Existe uma relação linear entre o potencial de pico e o pH da solução com uma inclinação de aproximadamente -57,4 mV/pH ($r^2 = 0,9984$), que é muito próxima do valor esperado, conforme a equação de Nernst (59,2 mV/pH), para uma reação que envolva igual número de elétrons e prótons, o que sugere que a reação redox da dopamina é um processo desse tipo, tal como descrito

em vários estudos relatados na literatura (HOSSEINI *et al.*, 2010; MANJUNATHA *et al.*, 2010; MAHSHID *et al.*, 2011).

Além disso, este estudo foi utilizado para selecionar a melhor solução de eletrólito suporte para o método proposto. A corrente de pico obtida para diferentes valores de pH é mostrada na Figura 25 (b). A intensidade da corrente para a dopamina foi maior em pH 7, diminuindo gradualmente com o aumento ou diminuição do pH. Portanto, a solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0) foi selecionada como eletrólito suporte para este trabalho.

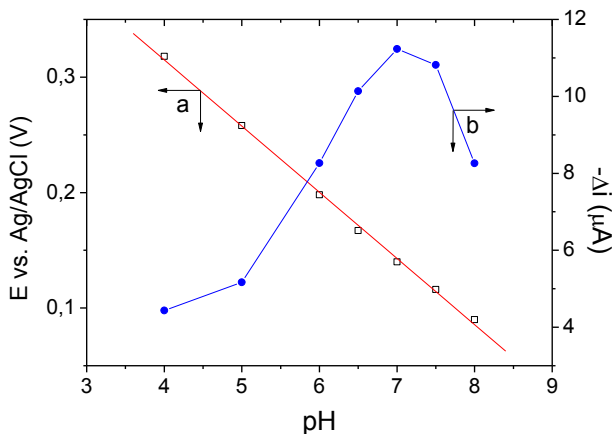


Figura 25. Influência do pH sobre o potencial de pico (a) e a corrente de pico resultante (b) do biossensor proposto em solução de eletrólito suporte (0,1 mol L⁻¹ solução tampão de acetato pH 4–5 e 0,1 mol L⁻¹ solução tampão fosfato pH 6–8) contendo 98,0 µmol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio e 3,92 µmol L⁻¹ de dopamina, investigada por SWV.

3.3.6. Otimização da construção do biossensor e das condições experimentais

A fim de otimizar a construção do biossensor e as condições experimentais do método proposto, vários parâmetros foram investigados utilizando SWV. Inicialmente, o efeito da concentração de enzima (2,5–10,0 unidades de PO por miligrama de pasta de carbono) foi estudada em eletrodos com uma composição de pó de grafite, aglutinante e PO imobilizada em HNT de 70:20:10% (em massa), respectivamente. As respostas analíticas do biossensor em solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0) contendo 3,92 µmol L⁻¹ de

dopamina e $98,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 aumentaram com concentrações de enzima até 5,0 unidades de PO por miligrama de pasta de carbono, sendo esta concentração selecionada (Figura 26).

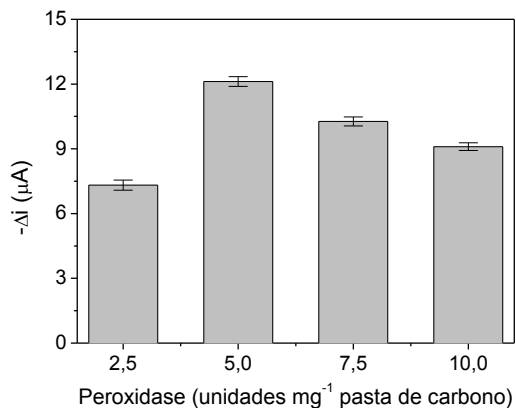


Figura 26. Estudo da concentração de enzima no biossensor proposto (em unidades por mg de pasta de carbono) realizado em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ solução tampão fosfato (pH 7,0) contendo $98,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio e $3,92 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina, utilizando SWV.

O uso de IL como aglutinante para substituir os óleos minerais (não condutores) na construção de eletrodos à base de pasta de carbono tem sido investigado em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo (FRANZOI *et al.*, 2009a; BRONDANI *et al.*, 2009). De acordo com as investigações, a proporção de Nujol:IL de 50:50% (em massa) tem resultado na melhor resposta analítica, e esta composição foi, portanto, utilizada para a construção do biossensor. De acordo com os relatos na literatura (FRANZOI *et al.*, 2009a e 2011; BRONDANI *et al.*, 2009; SHIDDIKY e TORRIERO, 2011), a adição de IL a um CPE modifica a microestrutura da pasta e aumenta a velocidade de transferência eletrônica, principalmente devido à elevada condutividade do IL em comparação com outros aglutinantes (ex.: Nujol e parafina). Além disso, a presença de NP metálicas dispersas em IL têm potencializado os efeitos de melhoria do desempenho analítico de biossensores eletroquímicos (FRANZOI *et al.*, 2009b e 2011; SHIDDIKY e TORRIERO, 2011; BRONDANI *et al.*, 2011).

A presença de peróxido de hidrogênio é essencial para a resposta do biossensor, pois é o substrato natural da enzima PO. No

entanto, concentrações elevadas de peróxido podem provocar a inativação da enzima e, conseqüentemente, diminuir a sensibilidade e tempo de vida do biossensor (CASTILHO *et al.*, 2005). Portanto, a influência da concentração de peróxido de hidrogênio (9,8–192,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a resposta do biossensor proposto foi investigada, e a concentração ótima foi encontrada como sendo 98,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 27).

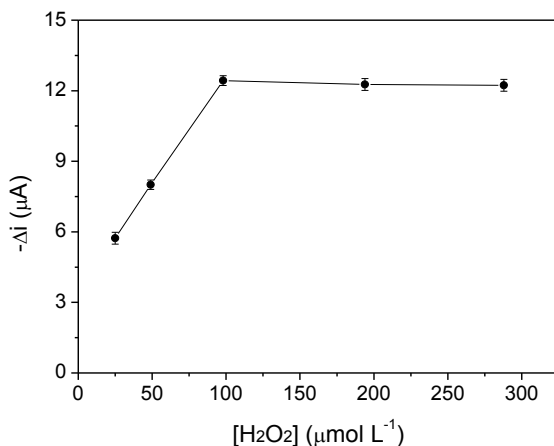


Figura 27. Estudo do efeito da concentração do peróxido de hidrogênio sobre a resposta do biossensor, realizado em solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} ; pH 7,0) contendo 3,92 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina, utilizando SWV.

Os parâmetros de SWV também foram investigados na busca de uma melhor definição de pico e sensibilidade na determinação da dopamina. Os parâmetros e faixas investigados foram: frequência (10–100 Hz), amplitude de pulso (10–100 mV) e incremento (1–10 mV). Este estudo foi realizado em solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} ; pH 7,0) contendo 15,24 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina e 98,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio, e a melhor resposta analítica foi obtida utilizando uma frequência de 50 Hz, amplitude de pulso de 100 mV e incremento de 5 mV, conforme mostrado na Figura 28. Assim, estas condições instrumentais foram selecionadas para todas as determinações de dopamina e outras catecolaminas.

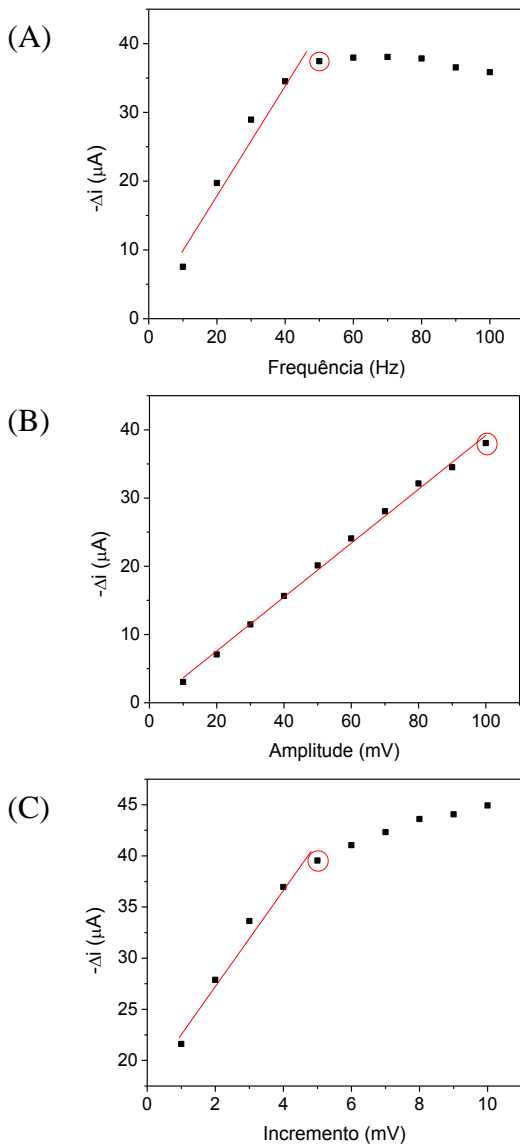


Figura 28. Investigação dos parâmetros de SWV sobre a resposta analítica do biossensor proposto em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato (pH 7,0) contendo $98,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio e $15,24 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina. (A) Estudo da frequência; (B) Estudo da amplitude; (C) Estudo do incremento.

3.3.7. Desempenho analítico do biossensor

Sob as condições anteriormente otimizadas, usando SWV, o biossensor proposto mostrou uma resposta linear de 0,40 a 18,87 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina, a qual pode ser expressa de acordo com a seguinte equação de regressão: $-\Delta i = 0,93 (\pm 0,04) + 2,44 (\pm 0,02) [\text{dopamina}]$, com um coeficiente de correlação (r^2) de 0,9990 para $n = 3$, onde Δi é a corrente resultante (μA) e $[\text{dopamina}]$ é a concentração de dopamina ($\mu\text{mol L}^{-1}$). O LOD (3 x desvio padrão do intercepto / inclinação) e o LOQ (10 x desvio padrão do intercepto / inclinação) foram calculados como 0,05 e 0,18 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A Figura 29 mostra os voltamogramas de onda quadrada e a curva analítica para a dopamina. A redução eletroquímica da dopamina foi obtida a um potencial de aproximadamente 0,14 V vs. Ag/AgCl.

Um estudo de repetibilidade foi realizado através de 10 medidas sucessivas por SWV, utilizando o biossensor proposto em solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} ; pH 7,0) contendo 18,87 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina e 98,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. Um desvio padrão relativo (*relative standard deviation* – RSD) de 3,9% foi obtido neste estudo, mostrando uma boa precisão entre as medidas. A reprodutibilidade entre biossensores também foi investigada considerando 6 biossensores preparados de forma independente. Uma boa reprodutibilidade foi obtida, com valores de RSD de 5,5% entre os biossensores analisados.

A estabilidade do biossensor também é um parâmetro importante na determinação analítica. Por isso, o biossensor foi testado para determinação de dopamina durante um período de cerca de 180 dias (mais de 600 medidas por biossensor), sendo armazenados à temperatura ambiente. Estas análises foram realizadas em triplicata, e os resultados obtidos são mostrados na Figura 30. Como pode ser observada, uma resposta relativa de mais de 95% foi obtido para os primeiros 60 dias de avaliação, em relação à obtida no dia da construção. Ao atingir 180 dias, o biossensor exibiu uma resposta relativa de mais de 80%. Esse resultado é considerado satisfatório, e pode ser atribuído à conservação da atividade enzimática, devido à imobilização eficaz da PO sobre HNT, juntamente com a "esfera de proteção" formada pelo IL. O microambiente favorável formado em torno da enzima torna este método de imobilização eficiente para a manutenção da estabilidade do biossensor (FRANZOI *et al.*, 2011).

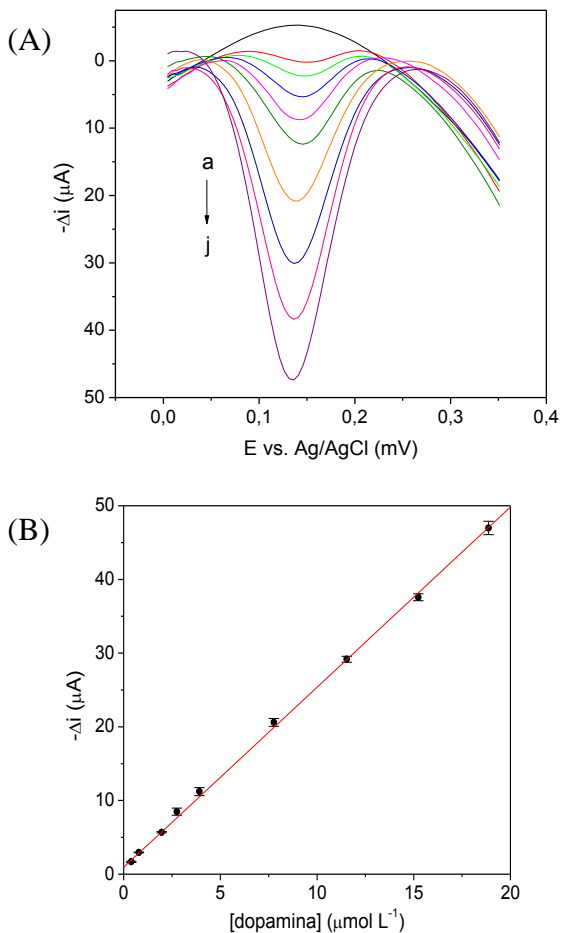


Figura 29. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto em (a) solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) contendo $98,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio (branco) e diferentes concentrações de dopamina: (b) 0,40, (c) 0,79, (d) 1,97, (e) 2,75, (f) 3,92, (g) 7,77, (h) 11,54, (i) 15,24, (j) $18,87 \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva analítica para dopamina.

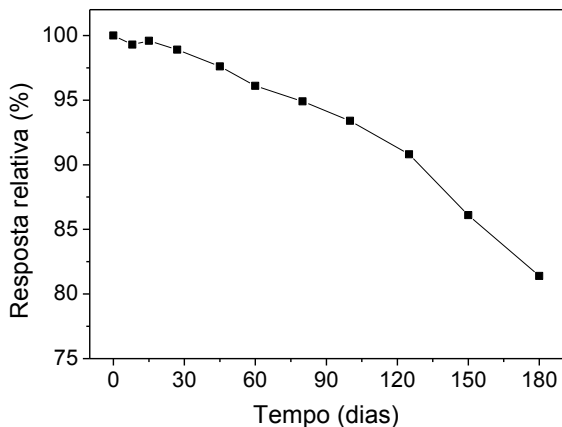


Figura 30. Estudo da estabilidade do biossensor proposto por SWV em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) contendo $98,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio e $18,87 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina.

A influência das espécies potencialmente interferentes sobre a resposta do biossensor é outro parâmetro importante que foi estudado em relação à possibilidade de aplicação do biossensor em amostras biológicas. Dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico coexistem em fluidos extracelulares do sistema nervoso central, sendo que os níveis de concentração dos ácidos ascórbico e úrico são muito mais elevados do que os de dopamina. Nesses fluidos biológicos, o nível de concentração de dopamina é muito baixo ($0,01\text{--}1,00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), enquanto que o ácido ascórbico, por exemplo, está presente em concentrações relativamente elevadas (cerca de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$), e é oxidado a um potencial similar ao da dopamina (ATTA e EL-KADY, 2010). Assim, o efeito da interferência dos ácidos ascórbico e úrico sobre a resposta analítica da dopamina foi investigado, uma vez que estas espécies podem ser diretamente oxidadas na superfície biossensor ou mesmo reagir com o peróxido de hidrogênio necessário para o processo enzimático, diminuindo a resposta do biossensor. Os resultados obtidos demonstraram que os ácidos ascórbico e úrico não apresentaram interferência significativa na determinação de dopamina numa razão molar de 1:100 (dopamina:composto interferente), conduzindo a alterações no sinal analítico para a dopamina inferiores a $\pm 7\%$. Portanto, este biossensor pode ser utilizado para a determinação da dopamina na presença destes compostos potencialmente interferentes com seletividade adequada.

3.3.8. Resposta do biossensor para outras catecolaminas

O uso de enzimas oxirredutases como catalisadores na construção de biossensores com o objetivo de determinar compostos fenólicos tem sido amplamente descrito na literatura (FRANZOI *et al.*, 2009a e 2009b; BRONDANI *et al.*, 2009 e 2011; GRANERO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012; JANEGITZ *et al.*, 2012). A PO catalisa a oxidação de mono e difenóis às suas correspondentes quinonas, na presença de peróxido de hidrogênio (BATTISTUZZI *et al.*, 2010; POULOS, 2010). A este respeito, embora a resposta do biossensor tenha sido otimizada em função da dopamina, espera-se que o biossensor proposto possa detectar outras catecolaminas, como mencionado anteriormente. Portanto, o comportamento analítico do biossensor na determinação de outras catecolaminas (além da dopamina), tais como a dobutamina, o isoproterenol e a epinefrina, foi estudado em detalhes. A Tabela 2 mostra os parâmetros analíticos para as catecolaminas estudadas, incluindo a dopamina. As respostas em termos de detectabilidade (LOD) seguiram a seguinte ordem: dopamina > isoproterenol > dobutamina > epinefrina. Como se pode observar, os níveis de sensibilidade das calibrações (inclinação da curva analítica) obtidas para as catecolaminas analisados foram semelhantes, uma vez que as suas estruturas químicas são muito semelhantes.

Tabela 2. Parâmetros analíticos do método proposto para determinação de catecolaminas

Catecolamina	E ^a	Intercepto ^b	Inclinação ^c	r ²	Faixa linear ^d	LOD ^d
Dopamina	+0,14	0,93±0,04	2,44±0,02	0,9990	0,40–18,87	0,05
Isoproterenol	-0,23	-0,12±0,04	2,12±0,01	0,9995	0,79–17,42	0,06
Dobutamina	-0,29	1,75±0,05	2,19±0,01	0,9990	0,28–25,93	0,07
Epinefrina	-0,24	1,68±0,08	1,97±0,01	0,9992	0,79–17,06	0,12

^a Potencial de pico em V vs. Ag/AgCl;

^b Intercepto em μA ;

^c Inclinação em $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{L}$;

^d Faixa linear e LOD em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

3.3.9. Estudo de recuperação e aplicação analítica

O estudo de recuperação e a determinação de dopamina foram realizados com o método de adição de padrão, em triplicata, usando-se três amostras farmacêuticas (A, B e C = cloridrato de dopamina injetável). Medidas de recuperação foram obtidas por adição de diferentes concentrações de padrão de dopamina (5,61, 7,34 e 9,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$) para cada amostra farmacêutica. Os valores percentuais de recuperação foram calculados pela comparação das concentrações detectadas nas amostras com e sem a adição de concentrações conhecidas de solução padrão de dopamina. As recuperações de 97,5 a 101,4% obtidas para essas amostras demonstram a exatidão satisfatória do biossensor proposto (Tabela 3).

Tabela 3. Recuperação de dopamina em amostras de fármacos usando o biossensor proposto

Amostra ^a	Dopamina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		Recuperação (%) ^c
	Adicionado	Encontrado ^b	
A	5,61	5,47±0,04	97,5
	7,34	7,34±0,07	100,0
	9,01	9,09±0,08	100,9
B	5,61	5,58±0,04	99,5
	7,34	7,25±0,08	98,8
	9,01	9,10±0,06	101,0
C	5,61	5,52±0,08	98,4
	7,34	7,44±0,05	101,4
	9,01	8,99±0,06	99,8

^a Solução injetável de cloridrato de dopamina (A, B e C). ^b Média \pm desvio padrão; n=3.

^c Recuperação = (valor médio encontrado / valor adicionado) x 100%.

Além disso, a fim de avaliar a eficiência do método desenvolvido, essas amostras farmacêuticas também foram utilizadas na quantificação de dopamina. As concentrações de dopamina em três amostras de formulações injetáveis foram determinadas, em quintuplicata, usando o biossensor proposto e o método comparativo

espectrofotométrico (FARMACOPÉIA AMERICANA, 1995). Os resultados das quantificações utilizando o biossensor e o método comparativo, bem como os valores rotulados, são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Determinação de dopamina em amostras farmacêuticas usando um método comparativo espectrofotométrico (FARMACOPÉIA AMERICANA, 1995) e o biossensor proposto

Amostra ^a	Dopamina (mg mL ⁻¹)			Erro relativo (%) ^c	
	Rótulo	Método comparativo ^b	Biossensor ^b	ER ₁	ER ₂
A	5,0	4,94±0,12	4,91±0,08 $t_c = 0,42$ $F_c = 2,31$	-1,8	-0,6
B	5,0	5,15±0,03	5,16±0,05 $t_c = 0,38$ $F_c = 3,26$	+3,2	+0,2
C	5,0	4,98±0,06	5,03±0,06 $t_c = 1,25$ $F_c = 0,93$	+0,6	+1,0

^a Cloridrato de dopamina injetável (A, B e C).

^b Média ± desvio padrão; n=5.

t_c = valor de t calculado e t_T = valor teórico (2,31), nível de confiança de 95%;

F_c = valor de F calculado e F_T = valor teórico (6,39), nível de confiança de 95%.

^c ER₁ = Biossensor vs. rótulo; ER₂ = Biossensor vs. método comparativo.

Os resultados obtidos com o biossensor proposto foram comparados aos obtidos com o método comparativo aplicando-se os testes t e F (SKOOG *et al.*, 2008). Os valores de F calculado (F_c) foram menores que o F teórico (F_T) (6,39), demonstrando que o biossensor

fornece precisão equivalente ao método comparativo, em um nível de confiança de 95%. Os valores de t calculado (t_c) também foram inferiores ao valor teórico (t_T) (2,31), em um nível de confiança de 95%, indicando que estatisticamente não há diferença significativa entre os teores de dopamina determinados pelo biossensor proposto e o método comparativo para a mesma amostra analisada. Além disso, os teores de dopamina determinados utilizando o biossensor são consistentes com o teor indicado no rótulo das amostras farmacêuticas, com um erro relativo inferior a $\pm 3,3\%$, e em relação ao método comparativo apresentou um erro relativo máximo de $\pm 1,0\%$. Desta forma, pode-se concluir que o método proposto é adequado para a determinação de dopamina em produtos farmacêuticos, e também pode ser avaliado para a quantificação de outras catecolaminas (dobutamina, epinefrina e isoproterenol).

CAPÍTULO 4 – BIOSSENSOR CONTENDO AuNP REVESTIDAS COM PEI E DECORADAS COM LAC

Publicado em: Biosens. Bioelectron., 42, 242–247, 2013.

4.1. INTRODUÇÃO

Recentes avanços em nanotecnologia têm fornecido uma ampla gama de novos materiais com potencial para aplicação na imobilização e estabilização de biomoléculas (ANSARI e HUSAIN, 2012). Entre os nanomateriais mais explorados, as AuNP se destacam por suas propriedades intrínsecas que incluem biocompatibilidade, baixa citotoxicidade e imunogenicidade, boa condutividade eletrônica e estabilidade química. Além dessas características atraentes, sua elevada área superficial faz desse nanomaterial um excelente suporte para a imobilização de biomoléculas como DNA (CASTAÑEDA *et al.*, 2007), anticorpos (REZAEI *et al.*, 2009) e enzimas (ANSARI e HUSAIN, 2012), especialmente para aplicação no desenvolvimento de biossensores. Além disso, a síntese e funcionalização superficial das AuNP envolvem processos relativamente simples e fáceis de executar (CEBRIÁN *et al.*, 2011; ANSARI e HUSAIN, 2012). A modificação química da superfície de AuNP fornece uma plataforma eficiente para imobilização de biomoléculas. Por exemplo, AuNP modificadas com cistamina e glutaraldeído têm sido usadas para a imobilização de tirosinase (JANEGITZ *et al.*, 2012), e AuNP sintetizadas utilizando PEI em IL têm sido aplicadas na imobilização de sulfito oxidase, favorecendo a DET entre essas enzimas e a superfície do eletrodo modificado (FRASCA *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, AuNP têm sido amplamente utilizadas como eficientes promotores de DET entre centros eletroativas de proteínas e eletrodos. Isto é importante em bioeletrocatalise, que é frequentemente explorada como um princípio básico na construção de biossensores, células de biocombustível e outros dispositivos baseados em biomoléculas (HU *et al.*, 2008; DAGYS *et al.*, 2010). Superfícies de eletrodos modificados com AuNP podem proporcionar um microambiente semelhante ao das enzimas em sistemas nativos, permitindo mais liberdade na orientação das moléculas, diminuindo o efeito de isolamento causado pela “esfera” de proteína em torno do

centro ativo, e facilitando assim a DET (GUO e WANG, 2007). Dagsy e coautores (2010) publicaram recentemente um estudo que demonstra a DET relativamente rápida entre lacase de *Trametes hirsuta* e eletrodos modificados com AuNP, permitindo uma eficiente redução do oxigênio.

Biossensores vêm ganhando importância no campo do desenvolvimento de sistemas para monitoramento de poluentes, tais como os fenóis e seus derivados, que são compostos potencialmente perigosos, e estão frequentemente presentes em resíduos de processos industriais (SHIMOMURA *et al.*, 2011). A determinação destes compostos poluentes é necessária por causa da sua toxicidade, mesmo em baixas concentrações (MICHAŁOWICZ e DUDA, 2007). Por esta razão, os biossensores apresentam-se como importantes dispositivos analíticos, especialmente por serem rápidos, baratos, precisos, sensíveis e seletivos para a detecção de compostos fenólicos tóxicos e/ou potencialmente poluentes, tais como catecol, guaiacol, pirogalol e hidroquinona (Figura 31).

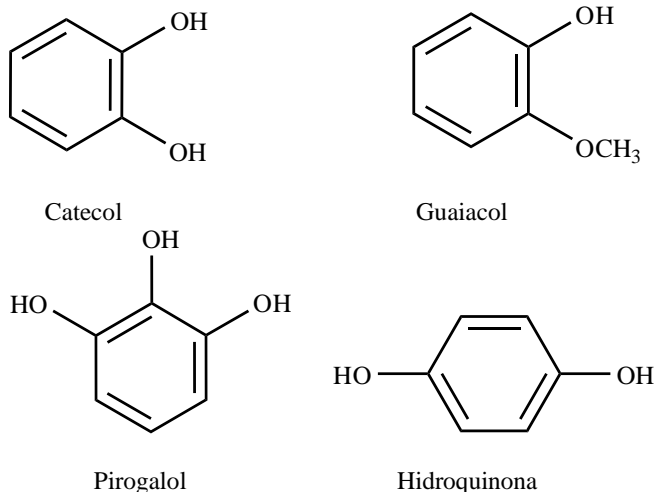


Figura 31. Estruturas químicas de alguns compostos fenólicos tóxicos e/ou potencialmente poluentes.

Neste trabalho, AuNP revestidas com PEI foram usadas na imobilização de moléculas de LAC de *Aspergillus oryzae*, sendo obtido um novo material denominado de AuNP decoradas com enzima (PEI-

AuNP-LAC). Esse material foi aplicado na construção de um biossensor baseado em um GCE revestido com um filme bio-nanoestruturado, resultando em uma nova plataforma para a eletroquímica direta de enzimas oxirredutases. Vários estudos de caracterização foram realizados, bem como as condições experimentais foram investigadas para obter o melhor desempenho do método proposto para a determinação dos compostos fenólicos. O biossensor otimizado foi aplicado na quantificação de catecol em amostras de água fortificadas, utilizando SWV.

4.2. PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1. Instrumentação e eletrodos

As medidas de CV e SWV foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT101 (Metrohm Autolab, Holanda), e os dados foram processados no *software* NOVA (versão 1.6.013). As medidas de EIS foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT128N (Metrohm Autolab, Holanda), com módulo FRA2. Para execução das análises, utilizou-se um sistema de três eletrodos, conforme detalhado no capítulo anterior. Empregou-se um GCE (diâmetro da área ativa geométrica: 2 mm) produzido pela Metrohm Autolab para a construção do biossensor.

4.2.2. Materiais, reagentes e soluções

Microcápsulas contendo LAC (Denilite® II Base) foram fornecidas pela Novozymes (Dinamarca), sendo essa enzima produzida por microorganismos geneticamente modificados (*Aspergillus oryzae*). A enzima foi extraída das microcápsulas e o extrato obtido foi armazenado em refrigerador a 4 °C para ser usado como fonte enzimática. Para determinar a atividade da LAC no extrato enzimático foi utilizado ABTS [sal de amônio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] adquirido da Sigma. Na determinação da concentração de proteína total no extrato utilizou-se albumina de soro bovino (BSA) (Aldrich) e o reagente de biureto. Esse reagente foi preparado da seguinte maneira: 1,50 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Vetec) e 6,00 g de tartarato de sódio e potássio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Vetec) foram dissolvidos em 500 mL de água deionizada. Sob agitação constante, adicionou-se 300 mL de solução de

NaOH (Nuclear) 10% (m/v), e completou-se o volume para 1 L com água deionizada.

As AuNP revestidas com PEI e decoradas com LAC (PEI-AuNP-LAC) foram sintetizadas e caracterizadas no Laboratório de Química Bioinorgânica e Cristalografia pelo doutorando Bernardo de Souza, com a contribuição do Dr. Bruno Silveira de Souza (na parte de caracterização microscópica realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC)), e fornecidas para o presente trabalho. AuNP revestidas com PEI foram sintetizadas conforme metodologia adaptada de Sun *et al.* (2005), utilizando uma solução de ácido cloroáurico (HAuCl_4) e PEI ramificada (massa molar de 25 kDa) (BRONDANI *et al.*, 2013). PEI-AuNP foram empregadas na imobilização de LAC, conforme descrito detalhadamente por Brondani e colaboradores (2013). As PEI-AuNP-LAC caracterizadas por TEM apresentaram um tamanho médio de $8,5 \pm 2,3$ nm.

Os padrões analíticos de catecol, guaiacol, pirogalol e hidroquinona, ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio foram obtidos da Sigma-Aldrich. Soluções tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,0–7,0) e acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 3,0–5,0) foram preparadas conforme descrito no capítulo anterior, e usadas como eletrólito suporte nos estudos de otimização do biossensor.

Todos os reagentes eram de grau analítico e foram utilizados sem purificação adicional. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada.

4.2.3. Extração da LAC e determinação de atividade enzimática e proteína total

Uma massa de 5,0 g de microcápsulas contendo a enzima LAC foi macerada por 20 min em almofariz. O pó obtido foi transferido para um béquer, juntamente com 50 mL de água deionizada, e a mistura foi agitada por 30 min, sendo posteriormente filtrada para eliminar as partículas sólidas (adaptado de FERNANDES *et al.*, 2008). A solução obtida contendo a enzima LAC foi armazenada em frasco âmbar, sob refrigeração, e usada como fonte enzimática.

A atividade da enzima foi determinada por espectrofotometria, acompanhando-se a reação de oxidação do ABTS (coloração em solução: levemente verde) pela LAC, com formação do cátion radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (coloração azul-esverdeado intensa), medindo-se o aumento da absorbância no comprimento de onda de 420 nm ($\epsilon = 36.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (BOURBONNAIS *et al.*, 1998). Para isso, inicialmente, realizou-

se uma diluição da solução enzimática (120 vezes), em tampão acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 5,0). Logo após a diluição, a atividade enzimática da LAC foi determinada, em triplicata, medindo-se a absorbância em 420 nm do produto formado a partir da reação entre 2,8 mL de uma solução 0,5 mmol L⁻¹ de ABTS e 0,2 mL da solução de LAC previamente diluída, durante cerca de 3 minutos, à temperatura ambiente.

A atividade enzimática (unidades mL⁻¹) da LAC, definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto (BOURBONNAIS *et al.*, 1998), foi calculada através da Equação 6.

$$\text{Atividade} = \frac{\Delta \text{Abs } t^{-1}}{\varepsilon \cdot b} \times V_T \times \frac{1}{V_E} \times 1000 \times \text{FD} \quad (\text{Eq. 6})$$

Atividade = atividade enzimática (unidade mL⁻¹)

$\Delta \text{Abs } t^{-1}$ = variação da absorbância com o tempo (min⁻¹)

$\varepsilon_{420\text{nm}}$ = absortividade molar (36.000 L mol⁻¹ cm⁻¹)

b = caminho óptico (1 cm)

V_T = volume total utilizado no ensaio (mL)

V_E = volume da solução enzimática (mL)

FD = fator de diluição (diluição da solução de LAC)

O teor de proteína total do extrato enzimático foi determinado de acordo com Gornall *et al.* (1949), empregando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A curva de calibração externa foi construída a partir de 8,0 mL do reagente de biureto, variando volumes de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,6; e 2,0 mL de solução padrão de BSA (10 mg mL⁻¹) e completando o volume para 10,0 mL com água deionizada. Utilizando 1,0 mL do extrato enzimático e 4,0 mL do reagente de biureto, após homogeneização dessas soluções e repouso durante 30 minutos, as leituras foram feitas em 546 nm. O aparecimento de coloração violeta indica que os íons Cu²⁺ (provenientes do reagente de biureto) formaram um complexo com as ligações peptídicas das moléculas de LAC, indicando a presença de proteína.

O teor de proteína total (mg mL⁻¹) foi calculado por interpolação na curva de calibração obtida com BSA. A atividade específica (unidades mg⁻¹ de proteína) foi calculada pela razão da atividade da enzima (unidades mL⁻¹) e o teor de proteína total.

4.2.4. Preparação do biossensor

Antes da preparação do biossensor, um GCE foi mecanicamente polido com uma suspensão aquosa de alumina (granulometria 0,05 μm) sobre feltro branco, fazendo movimentos em forma de “oito” para a limpeza do eletrodo. Para remoção da alumina residual, o eletrodo foi lavado com água deionizada e, subseqüentemente, sonicado em mistura de etanol:água deionizada (1:1) durante 10 minutos. Sobre a superfície ativa do eletrodo limpo foi gotejada uma alíquota (2 μL) da solução de PEI-AuNP-LAC, o qual foi mantido em dessecador sob vácuo até secagem do filme (cerca de 1–2 h). Eletrodos contendo apenas PEI-AuNP, PEI e LAC foram construídos de maneira similar, com o objetivo de investigar a contribuição individual dos materiais modificadores sobre a resposta do biossensor. Os eletrodos modificados foram armazenados secos e à temperatura ambiente (cerca de 25 $^{\circ}\text{C}$), quando não estavam sendo usados.

4.2.5. Medidas eletroquímicas

Todas as medidas de SWV foram realizadas à temperatura ambiente numa célula eletroquímica contendo uma alíquota de 10,0 mL de eletrólito suporte e alíquotas conhecidas de uma solução padrão de catecol (ou de outros compostos fenólicos: guaiacol, pirogalol ou hidroquinona) ou uma amostra de água fortificada, transferidas com auxílio de um micropipetador automático. Para otimização do método proposto, os parâmetros de SWV foram investigados nas seguintes faixas: frequência de 10–100 Hz, amplitude de pulso de 10–100 mV e incremento de 1–10 mV. Os valores de potencial são reportados *vs.* Ag/AgCl (3,0 mol L^{-1} KCl), e um tempo de agitação de 60 segundos foi usado para homogeneizar a solução entre as adições. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, e as barras de erro representam o desvio padrão da média aritmética de três repetições.

4.2.6. Preparação de amostras de águas fortificadas

Amostras de água de diferentes origens – torneira LaBios (DQ-UFSC), mineral e de drenagem urbana (córrego DQ-UFSC) – foram previamente analisadas usando o biossensor proposto, e não indicaram contaminação pelos compostos fenólicos estudados. Então, estas amostras foram transferidas para balões volumétricos (25,0 mL) e fortificadas (enriquecidas) com 0,5 mL de uma solução de 40,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ catecol.

Subseqüentemente, esses frascos foram agitados vigorosamente a fim de homogeneizar as amostras, resultando em soluções com uma concentração de $0,80 \mu\text{mol L}^{-1}$ catecol. Essas soluções foram preparadas pouco tempo antes da realização das medidas e analisadas sem qualquer tratamento adicional.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Determinação de atividade da LAC e concentração de proteína total no extrato enzimático

A atividade da LAC foi determinada por espectrofotometria, em triplicata, acompanhando-se a reação de oxidação do ABTS pela LAC, com formação do cátion radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Figura 32), medindo-se a variação da absorbância no comprimento de onda de 420 nm, conforme descrito anteriormente (item 4.2.3).

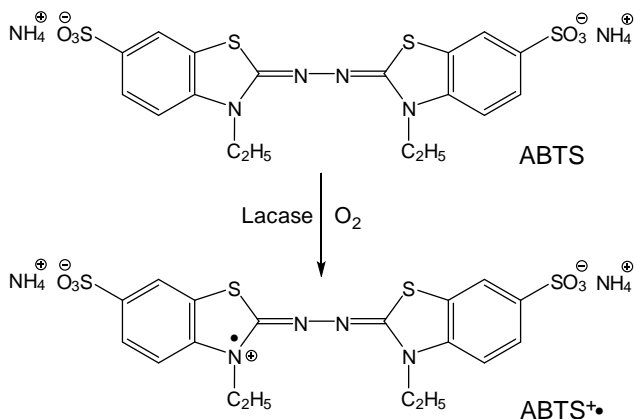


Figura 32. Reação de oxidação do ABTS pela enzima LAC, com a formação do cátion radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (adaptado de CHILDS e BARDSLEY, 1975).

De acordo com o gráfico da variação da absorbância vs. tempo de reação (Figura 33), pode-se calcular a atividade da LAC através da Equação 6 (item 4.2.3), utilizando a inclinação da reta obtida, obtendo-se um valor médio de atividade enzimática igual a 17,1 unidades por mililitro do extrato.

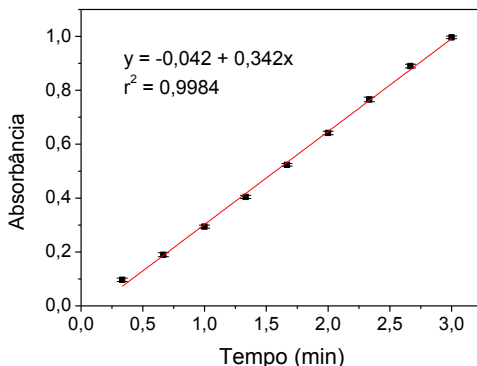


Figura 33. Variação da absorvância ($\lambda = 420 \text{ nm}$) do cátion radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ formado na reação com a enzima LAC (*Aspergillus oryzae*) em função do tempo.

Através do método do biureto descrito na parte experimental, obteve-se um teor de proteína total de 1,42 mg por mililitro do extrato enzimático. E a atividade específica da LAC foi calculada pela razão da atividade da enzima (unidades mL^{-1}) e o teor de proteína total (mg mL^{-1}) como sendo de 12,0 unidades mg^{-1} de proteína. Considerando a massa molar da enzima como 85 kDa, essa solução apresenta uma concentração de 16,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LAC.

4.3.2. Imobilização de LAC sobre PEI-AuNP

Neste estudo, propõe-se que a imobilização enzimática ocorreu através de interações eletrostáticas entre o polímero PEI ($\text{pK}_a \sim 9$) carregado positivamente, o qual reveste a superfície das AuNP, e a LAC ($\text{pI} < 4$) na sua forma aniônica (HUBLIK e SCHINNER, 2000), tendo em vista que as condições do meio reacional utilizado estavam próximas da neutralidade ($\text{pH} 6\text{--}8$). Os resultados experimentais que serão apresentados a seguir sugerem que a enzima manteve parte de sua atividade quando imobilizada e aplicada na construção do biossensor, possibilitando a reutilização desse sensor por um bom período de tempo.

4.3.3. Caracterização do filme PEI-AuNP-LAC por EIS

EIS é uma importante ferramenta para estudar as propriedades da interface de eletrodos de superfície modificada, e foi empregada para investigar as alterações de impedância causadas pelo filme PEI-AuNP-

LAC formado sobre um GCE. A Figura 34 apresenta os espectros de impedância eletroquímica (diagramas de Nyquist) de diferentes eletrodos: (a) GCE não modificado, (b) GCE-PEI-AuNP e (c) GCE-PEI-AuNP-LAC, obtidos em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de nitrato de potássio contendo $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1:1), em uma faixa de frequência de $0,1 \text{ Hz}$ a 100 kHz e amplitude de 10 mV , usando potencial de circuito aberto. Nos diagramas de Nyquist, a parte semicircular (em frequências mais elevadas) corresponde ao processo de transferência eletrônica, e a porção linear (em frequências mais baixas) corresponde ao processo de difusão. A resistência à transferência de carga (R_{ct}), calculada a partir do diâmetro do semicírculo, controla a cinética de transferência de elétrons na interface do biossensor (FENG *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2008).

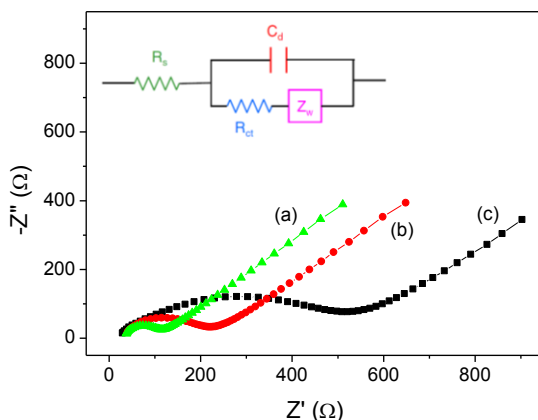


Figura 34. Espectros de impedância eletroquímica de diferentes eletrodos: (a) GCE não modificado, (b) GCE-PEI-AuNP e (c) GCE-PEI-AuNP-LAC, obtidos em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de nitrato de potássio contendo $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1:1), em uma faixa de frequência de $0,1 \text{ Hz}$ a 100 kHz e amplitude de 10 mV , usando potencial de circuito aberto. Inserido (parte superior): Representação do circuito equivalente de Randles, onde R_{ct} : resistência à transferência de carga, C_d : capacitância da dupla camada elétrica, R_s : resistência da solução eletrolítica e Z_w : impedância de Warburg.

Conforme mostrado na Figura 34, a resistência à transferência de carga (*charge-transfer resistance* – R_{ct}) avaliada para o GCE não modificado é muito baixa ($\sim 80 \text{ }\Omega$), sendo este valor aumentado em pouco mais de $2x$ com a modificação do eletrodo com filme de PEI-

AuNP ($\sim 190 \Omega$), pois apesar das AuNP apresentarem elevada condutividade estão recobertas por um polímero não condutor, o que pode dificultar um pouco esse processo de transferência de elétrons. Conforme esperado, o GCE coberto pelo filme de PEI-AuNP-LAC apresentou um valor de R_{ct} maior que os demais ($\sim 470 \Omega$), comprovando a efetiva imobilização da proteína sobre a superfície do eletrodo.

4.3.4. Eletroquímica direta da LAC imobilizada em GCE-PEI-AuNP

A Figura 35 mostra os voltamogramas cíclicos para diferentes eletrodos em solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0), obtidos em uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Nenhum pico redox foi observado para (a) GCE não modificado, (b) GCE-PEI e (c) GCE-PEI-AuNP, indicando que PEI e AuNP não são eletroativos dentro da janela de potencial estudada. O voltamograma do GCE-PEI-LAC (e) mostra picos mal definidos, enquanto que o voltamograma obtido com o GCE-PEI-AuNP-LAC (d) apresenta um par de picos redox bem definido e estável, que é atribuído à DET entre o centro eletroativo da LAC imobilizada e superfície do eletrodo. A esse respeito, outro estudo relatou a utilização de PEI para imobilizar LAC em GCE, no entanto, os autores tiveram de utilizar um mediador redox para obter uma eficiente transferência de elétrons (ROCHEFORT *et al.*, 2008). Em vista disso, a DET obtida no eletrodo (d) foi atribuída à presença de AuNP, que desempenham um papel importante como um eficiente “túnel” de condução de elétrons (ZHANG *et al.*, 2005). Como pode ser analisado na Figura 35 (d), trata-se de um processo eletroquímico quase-reversível. Os potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) dos picos estão localizados a $0,276 \text{ V}$ e $0,176 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, respectivamente. O potencial formal (E^0) obtido para a LAC imobilizada (*Aspergillus oryzae*) foi calculado a partir do valor médio dos potenciais de pico, como sendo de $0,226 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, em $3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ (correspondente a $0,436 \text{ V vs. NHE}$). Esse valor é bastante próximo dos valores de E^0 para o cobre T1 das LAC provenientes de *Melanocarpus albomyces* e *Rhus vernicifera* obtidos em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,5), utilizando CV, relatados por Frasconi *et al.* (2010), que foram $0,449 \text{ V}$ e $0,422 \text{ V vs. NHE}$, respectivamente. Assim, essas enzimas podem ser classificadas como LAC de baixo potencial de redução ($\leq 500 \text{ mV}$) (FRASCONI *et al.*, 2010). Valores de potencial de redução para a LAC da mesma origem que a utilizada no presente estudo não foram

encontrados na literatura para comparação com o encontrado neste trabalho.

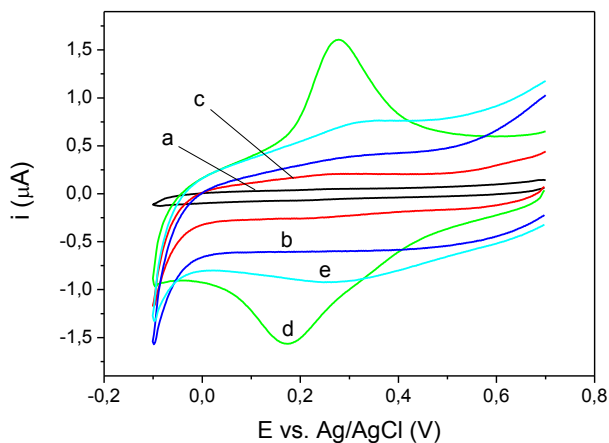


Figura 35. Voltamogramas cíclicos obtidos usando diferentes eletrodos: (a) GCE não modificado, (b) GCE-PEI, (c) GCE-PEI-AuNP, (d) GCE-PEI-AuNP-LAC e (e) GCE-PEI-LAC em solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0), com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

O efeito da velocidade de varredura sobre a resposta eletroquímica da LAC imobilizada no biossensor GCE-PEI-AuNP-LAC é mostrado na Figura 36-A. Com um aumento na velocidade de varredura, o E_{pa} da LAC deslocou-se para valores mais positivos e o E_{pc} deslocou-se na direção mais negativa. As correntes de pico anódica (i_{pa}) e catódica (i_{pc}) aumentaram linearmente com o aumento da velocidade de varredura (ν) de 20 a 300 mV s^{-1} (Figura 36-B), mas não com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($\nu^{1/2}$) (Figura 36-C). Isso indica que o processo é controlado por transferência de carga entre as espécies eletroativas imobilizadas e o eletrodo (BARD e FAULKNER, 2001).

A Figura 37 mostra que E_{pa} e E_{pc} são linearmente dependentes em função do logaritmo da velocidade de varredura ($\log \nu$) (para $\nu > 60 \text{ mV s}^{-1}$), o que está de acordo com a teoria de Laviron para o caso de espécies eletroativas imobilizadas sobre uma superfície (LAVIRON, 1979a). De acordo com esta teoria, o coeficiente de transferência de carga (α) e a constante aparente de velocidade de transferência de elétrons (k_s) podem ser calculados usando as Equações 7 e 8:

$$\frac{\alpha}{1 - \alpha} = \frac{v_a}{v_c} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$k_s = \frac{\alpha n F v_c}{RT} = \frac{(1 - \alpha) n F v_a}{RT} \quad (\text{Eq. 8})$$

onde R é a constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), F é a constante de Faraday ($96.485 \text{ C mol}^{-1}$), T é a temperatura (298 K), n é o número de elétrons transferidos na reação redox, e v_a e v_c são as velocidades de varredura no ponto de interceptação das linhas traçadas sobre os dados de E_{pa} e E_{pc} , respectivamente (Figura 37).

Baseado nos dados mostrados na Figura 37, os valores de α e k_s foram estimados como sendo $0,5$ e $0,4 \text{ s}^{-1}$, respectivamente, considerando $v_a = v_c = 20 \text{ mV s}^{-1}$ e $n = 1$. O valor obtido para k_s foi bem próximo ao $0,5 \text{ s}^{-1}$ obtido em um estudo reportado por Dagys *et al.* (2010) para a DET entre LAC de *Trametes hirsuta* e a superfície de um GCE modificado com AuNP e menor que o valor de $1,94 \text{ s}^{-1}$ obtido para a LAC de *Rhus vernicifera* imobilizada em uma resina sobre um GCE (WANG *et al.*, 2012).

Para um processo controlado por transferência de carga, uma estimativa aproximada do recobrimento da superfície do eletrodo pode ser calculada de acordo com a seguinte equação (LAVIRON, 1979b; BARD e FAULKNER, 2001):

$$i_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma v}{4RT} \quad (\text{Eq. 9})$$

onde i_p é a corrente de pico (A), A é a área superficial do eletrodo (cm^2), Γ é a concentração de espécies eletroativas na superfície do eletrodo (mol cm^{-2}), v é a velocidade de varredura (V s^{-1}).

A área superficial eletroativa do biossensor (GCE-PEI-AuNP-LAC) foi calculada através do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, de acordo com a equação de Randles-Sevcik (BARD e FAULKNER, 2001), como sendo $0,03 \text{ cm}^2$. A partir da Figura 36-A e 36-B, Γ pode ser calculada como $3,45 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$, usando a média das correntes de pico (i_{pa} e i_{pc}) para a velocidade de varredura de $0,02 \text{ V s}^{-1}$. Esse valor está próximo do valor $2,1 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ previamente reportado por Zhang *et al.* (2005) para hemoglobina imobilizada sobre AuNP depositada sobre um GCE.

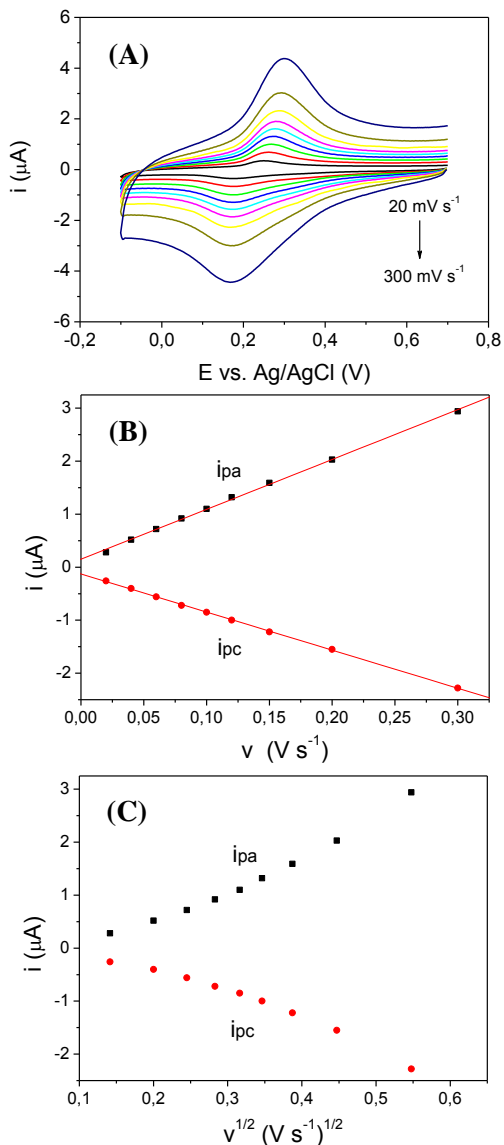


Figura 36. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos usando o biossensor proposto (GCE-PEI-AuNP-LAC) em solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) em diferentes velocidades de varredura ($20\text{--}300 \text{ mV s}^{-1}$). (B) Corrente de pico anódico (i_{pa}) e catódico (i_{pc}) vs. velocidade de varredura (v). (C) i_{pa} e i_{pc} vs. $v^{1/2}$.

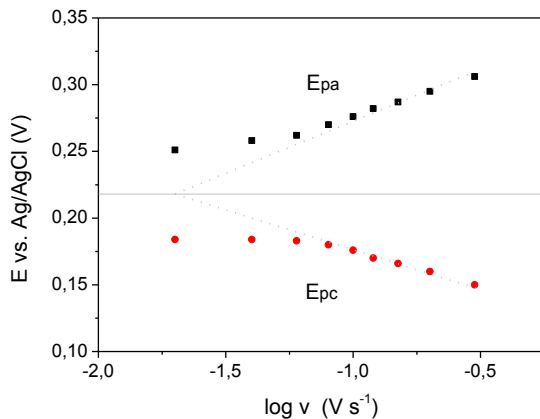


Figura 37. Gráfico de E_{pa} e E_{pc} vs. logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$) referente aos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 36.

O efeito do pH no processo eletroquímico que ocorre na superfície do biossensor GCE-PEI-AuNP-LAC também foi estudado. Voltamogramas cíclicos do biossensor proposto foram obtidos em diferentes valores de pH (pH 3,0–5,0: solução tampão acetato; pH 6,0–7,0: solução tampão fosfato) em uma velocidade de varredura de $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figura 38-A).

Como se pode observar na Figura 38-B, os valores de $E^{0'}$, E_{pa} e E_{pc} deslocaram-se negativamente e linearmente com o aumento do pH da solução, o que indica que o processo eletroquímico envolve a transferência de próton. Os gráficos de $E^{0'}$, E_{pa} e E_{pc} vs. pH (de 3,0 até 7,0) apresentaram uma relação linear com inclinações de $-49,4 \text{ mV pH}^{-1}$ ($r = 0,9991$), $-46,6 \text{ mV pH}^{-1}$ ($r = 0,9992$) e $-52,1 \text{ mV pH}^{-1}$ ($r = 0,9986$), respectivamente, os quais estão próximos ao valor esperado de $-59,2 \text{ mV pH}^{-1}$ (a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) para um processo eletroquímico reversível envolvendo igual número de prótons e elétrons (BARD e FAULKNER, 2001). Supõe-se que um próton e um elétron participam na DET da LAC imobilizada no GCE-PEI-AuNP. Isso está de acordo com resultados obtidos por Wang *et al.* (2012), em estudos usando LAC (*Rhus vernicifera*) imobilizada em uma resina sobre um GCE.

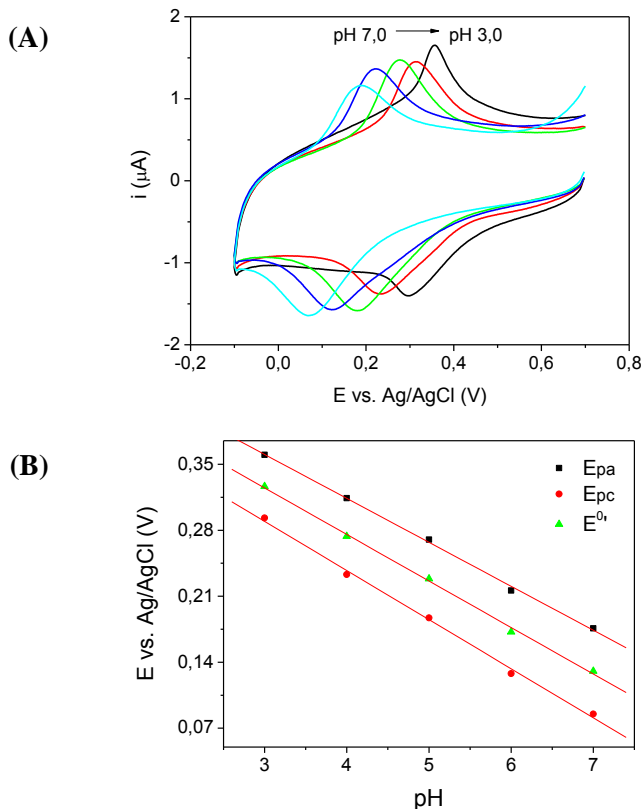


Figura 38. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o biossensor proposto (GCE-PEI-AuNP-LAC) em diferentes valores de pH (pH 3,0–5,0: solução tampão acetato; pH 6,0–7,0: solução tampão fosfato) sob velocidade de varredura de $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. (B) Gráficos de E_{pa} , E_{pc} e $E^{0'}$ vs. pH.

4.3.5. Princípio de funcionamento do biossensor proposto

A Figura 39-A mostra os componentes utilizados para a formação do filme bio-nanoestruturado na superfície do GCE, que incluem a LAC e as AuNP revestida com PEI. Este filme proporciona um ambiente apropriado para a imobilização da LAC, sem a desnaturação dessa biomolécula. Além disso, a imobilização enzimática através de interação eletrostática entre a PEI carregada positivamente na superfície das NP e a LAC aniônica e, principalmente, a presença de

AuNP no filme podem estar contribuindo para melhorar a transferência de elétrons entre o centro eletroativo da LAC e a superfície do eletrodo.

A Figura 39-B mostra um esquema da reação envolvida na oxidação do catecol catalisada pela LAC sobre a superfície do eletrodo. Inicialmente, o catecol em contato com a LAC, na presença de oxigênio molecular, é oxidado para a correspondente *o*-quinona. Subsequentemente, a quinona produzida é reduzida eletroquimicamente na superfície do biossensor com um potencial de +0,25 V vs. Ag/AgCl. A corrente resultante obtida na redução eletroquímica da quinona é proporcional à concentração de catecol, e foi utilizada para a quantificação do analito. O mesmo processo pode ser estendido a muitos outros compostos fenólicos (por exemplo, guaiacol, pirogalol, hidroquinona), diferindo apenas em relação ao potencial de pico, em alguns casos.

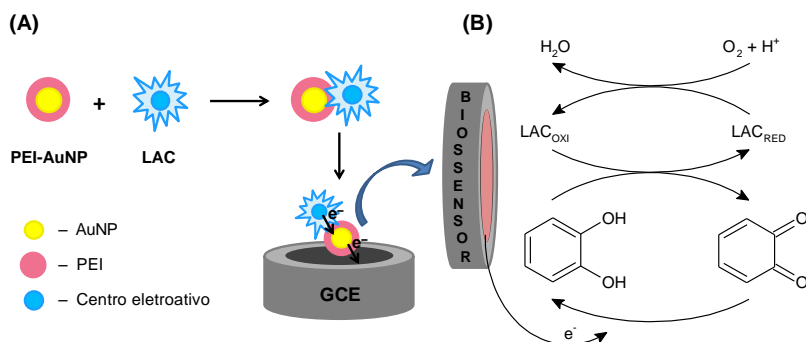


Figura 39. Representação esquemática dos (A) componentes usados na construção do GCE revestido com filme bio-nanoestruturado e (B) oxidação do catecol catalisada pela enzima com subsequente redução eletroquímica da quinona formada sobre a superfície do biossensor.

4.3.6. Estudo sobre a contribuição dos modificadores usados na construção do biossensor

Um estudo utilizando diferentes eletrodos foi realizado para avaliar a contribuição de cada material modificador empregado na construção do biossensor sobre a resposta analítica desses sensores. A Figura 40 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando GCE não modificado (a), GCE-PEI (b), GCE-PEI-AuNP (c) e GCE-PEI-AuNP-LAC (d – biossensor) em solução tampão acetato (0,1 mol L⁻¹;

pH 5,0) contendo $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol. Como pode ser observado, o uso de um filme de PEI sobre o GCE (sensor "b") não alterou de forma significativa a resposta do eletrodo, mas a presença de PEI-AuNP no filme (sensor "c") praticamente dobrou a resposta eletroquímica em relação ao GCE limpo (a); fato que pode ser atribuído às características intrínsecas das NP de metal nobre, tais como elevada condutividade e capacidade catalítica. Um ganho importante na resposta foi obtido com a utilização de enzima imobilizada (PEI-AuNP-LAC) na construção do eletrodo "d" (biossensor), o qual apresentou um aumento de aproximadamente 5 vezes no pico de corrente de catecol em comparação com o eletrodo sem modificação. Atribuiu-se esse bom resultado à elevada atividade catalítica da LAC para a oxidação desse composto fenólico, bem como à facilitação de transferência de carga entre a enzima e o eletrodo proporcionada pela presença de AuNP no filme. Assim, este estudo confirma as vantagens da utilização de materiais modificadores, tais como PEI-AuNP e LAC, no desenvolvimento de biossensores com desempenho analítico melhorado.

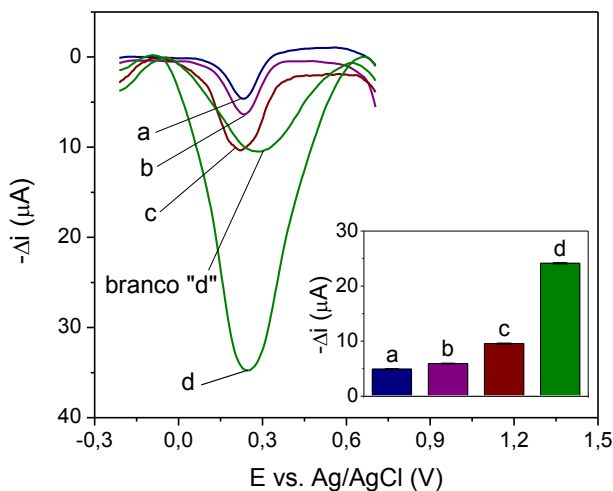


Figura 40. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando diferentes eletrodos: (a) GCE não modificado, (b) GCE-PEI, (c) GCE-PEI-AuNP e (d) GCE-PEI-AuNP-LAC (biossensor) em solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) contendo $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol em frequência de 60 Hz, amplitude de pulso de 100 mV e incremento de 5 mV. Branco "d" foi obtido em solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) sem catecol. Inserido: Valores médios de corrente para catecol (subtraindo as correntes do branco) obtidos usando cada um dos eletrodos estudados.

4.3.7. Otimização da construção do biossensor e condições experimentais

A fim de otimizar a construção do biossensor e as condições experimentais do método proposto, alguns parâmetros foram investigados utilizando SWV. Inicialmente, o efeito da quantidade de solução de PEI-AuNP-LAC utilizada para a formação do filme, na faixa de 1 a 6 μL , foi estudado (Figura 41). A melhor resposta analítica do biossensor em solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) contendo $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol foi obtida utilizando 2 μL de solução de PEI-AuNP-LAC para a formação do filme sobre a superfície do GCE. Esse volume foi, portanto, utilizado para a construção do biossensor.

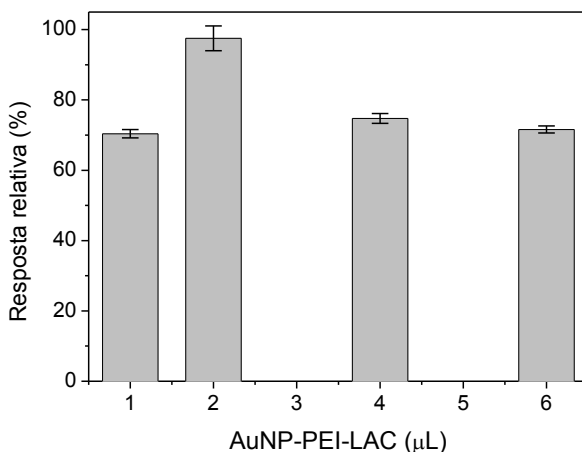


Figura 41. Influência da quantidade de solução de AuNP-PEI-LAC gotejada na superfície do GCE para a formação do filme sobre a resposta analítica do biossensor em solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) contendo $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol, investigada por SWV.

Após a otimização da construção do biossensor, os efeitos de eletrólitos suporte de diferentes naturezas e valores de pH, incluindo a solução tampão acetato (pH 3,0–5,0) e solução tampão fosfato (pH 6,0–7,0), sobre a resposta analítica do biossensor foram investigados por SWV (Figura 42). A melhor resposta para o catecol foi obtida em solução tampão de acetato pH 5,0.

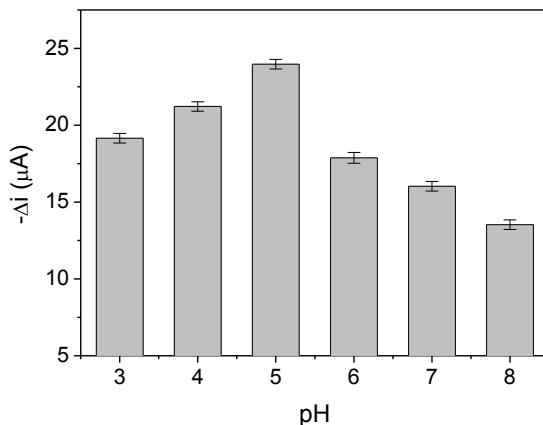


Figura 42. Influência do pH sobre a resposta analítica do biossensor proposto em solução de eletrólito suporte ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ solução tampão de acetato pH 3–5 e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ solução tampão fosfato pH 6–8) contendo $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol, investigada por SWV.

Em seguida, os parâmetros de SWV foram otimizados com o intuito de obter o melhor desempenho do biossensor, sob as condições descritas nos demais estudos de otimização (Figura 43). A frequência (10–100 Hz), a amplitude de pulso (10–100 mV) e o incremento (1–10 mV) foram investigados para a determinação de catecol, e os parâmetros otimizados foram os seguintes: 60 Hz de frequência, 100 mV de amplitude e 5 mV de incremento. Assim, essas condições instrumentais foram selecionadas para todas as determinações de catecol e outros compostos fenólicos.

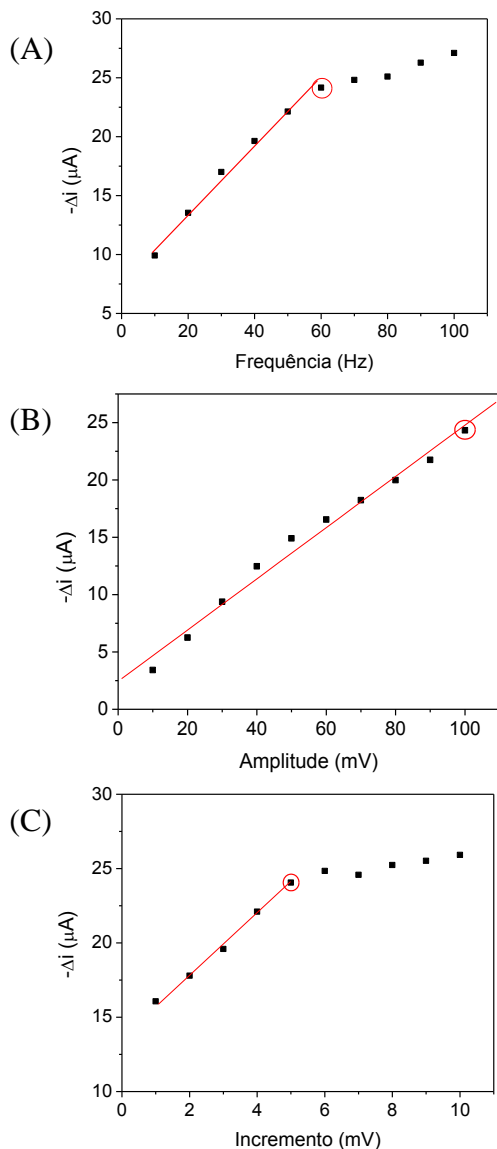


Figura 43. Investigação dos parâmetros de SWV sobre a resposta analítica do biossensor proposto em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ solução tampão acetato (pH 5,0) contendo $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol. (A) Estudo da frequência; (B) Estudo da amplitude; (C) Estudo do incremento.

4.3.8. Desempenho analítico do biossensor

Catecol, guaiacol, pirogalol e hidroquinona foram os compostos fenólicos selecionados para este estudo, particularmente devido a elevada toxicidade desses compostos sobre o meio ambiente. Esses compostos são contaminantes importantes nas águas superficiais e subterrâneas, e estão comumente presentes nos efluentes industriais. Assim, o monitoramento desses poluentes é uma questão de considerável importância.

Sob as condições anteriormente otimizadas, usando SWV, o biossensor proposto mostrou uma resposta linear de 0,36 a 11,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina, a qual pode ser expressa de acordo com a seguinte equação de regressão: $-\Delta i = 1,41 (\pm 0,04) + 4,41 (\pm 0,01) [\text{catecol}]$, com um coeficiente de correlação (r^2) de 0,9994 para $n = 3$, onde Δi é a corrente resultante expressa em μA (subtraindo a corrente do branco) e [catecol] é a concentração de catecol ($\mu\text{mol L}^{-1}$). O LOD e o LOQ foram calculados como 0,03 e 0,09 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A Figura 44 mostra os voltamogramas de onda quadrada e a curva analítica para o catecol. A redução eletroquímica do catecol foi obtida a um potencial de aproximadamente +0,25 V vs. Ag/AgCl.

O desempenho do biossensor proposto também foi avaliado na determinação de outros compostos fenólicos, incluindo guaiacol, pirogalol e hidroquinona. A Tabela 5 mostra os parâmetros analíticos para os compostos estudados, incluindo o catecol. As respostas em termos de detectabilidade (LOD) seguiram a seguinte ordem: catecol = guaiacol > pirogalol > hidroquinona. Como podem ser observados, os níveis de sensibilidade das calibrações (inclinação da curva analítica) obtidos para os compostos fenólicos analisados e os valores de potencial de pico foram semelhantes, uma vez que as suas estruturas químicas são muito semelhantes. Assim, para uma mistura desses 4 compostos fenólicos, a corrente de pico representaria o valor total para todos esses compostos, e somente a corrente de pico da hidroquinona aparece a um potencial suficientemente diferente para ser determinado separadamente dos outros compostos em estudo.

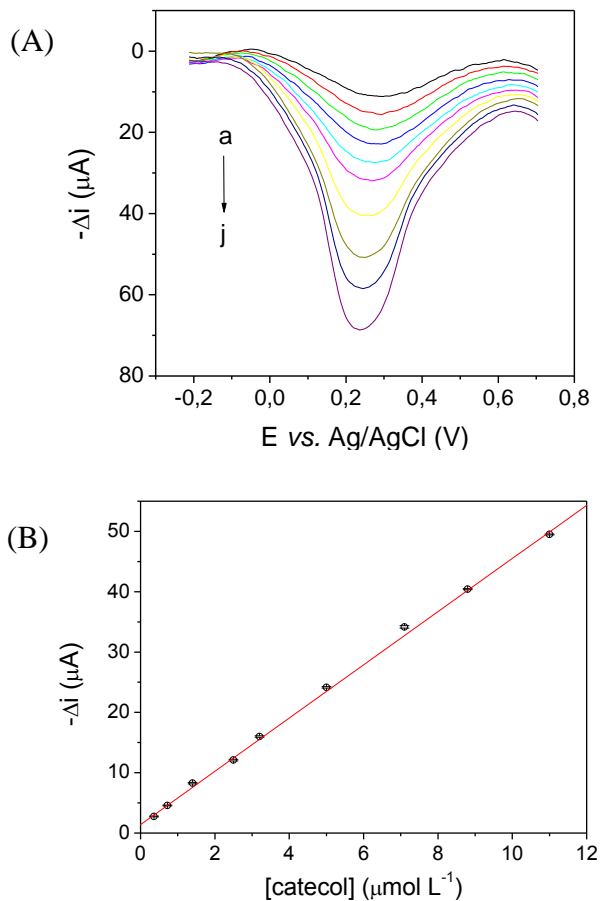


Figura 44. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto em (a) solução tampão acetato (0,1 mol L⁻¹, pH 5,0) (branco) contendo diferentes concentrações de catecol: (b) 0,36, (c) 0,72, (d) 1,40, (e) 2,50, (f) 3,20, (g) 5,00, (h) 7,10, (i) 8,80, (j) 11,00 μmol L⁻¹. (B) Curva analítica para catecol (subtraindo a corrente do branco).

Tabela 5. Parâmetros analíticos obtidos com o biossensor proposto na determinação de compostos fenólicos

Composto fenólico	E^a	Intercepto (μA)	Inclinação ($\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{L}$)	r^2	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Catecol	0,25	1,41 \pm 0,04	4,41 \pm 0,01	0,9994	0,36–11,00	0,03
Guaiacol	0,25	0,26 \pm 0,03	2,23 \pm 0,01	0,9998	0,79–17,42	0,03
Pirogalol	0,18	1,45 \pm 0,06	1,22 \pm 0,01	0,9996	1,74–19,60	0,14
Hidroquinona	0,12	1,83 \pm 0,08	1,12 \pm 0,01	0,9990	2,90–22,00	0,21

^a Potencial de pico vs. Ag/AgCl (V).

A estabilidade do biossensor foi investigada através da realização de medidas de SWV em $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol em diferentes intervalos de tempo ao longo de um período de 90 dias (mais de 150 medidas para cada filme formado sobre o GCE), sendo armazenado seco e à temperatura ambiente quando não estava em uso. Uma resposta relativa de aproximadamente 80% foi obtida aos 90 dias de avaliação, em relação à obtida no dia da construção. Esses resultados foram considerados satisfatórios, indicando que a enzima foi imobilizada em um ambiente biocompatível. Portanto, este método permite uma estabilização adequada da biomolécula, resultando no prolongamento da vida útil do biossensor.

Um estudo de repetibilidade foi realizado através de 10 medidas sucessivas por SWV, utilizando o mesmo biossensor em solução tampão de acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) contendo $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol. Um RSD de 3,2% foi obtido neste estudo, mostrando uma boa precisão entre as medidas. A reprodutibilidade entre biossensores foi também investigada considerando 5 biossensores preparados independentemente. Uma boa reprodutibilidade foi obtida, com valores de RSD de 6,5% entre os biossensores analisados.

A influência de compostos potencialmente interferentes sobre a resposta do biossensor é outro fator importante a ser investigado em relação à aplicação deste dispositivo em amostras ambientais e de sistemas de tratamento de efluentes. Em virtude disso, foram selecionados para esta investigação os seguintes compostos: fenol, 4-aminofenol, 4-bromofenol, 4-nitrofenol, 4-terc-butilfenol, ácido ascórbico, ácido úrico, ácido cítrico, glucose, frutose, nitrato e carbonato. O efeito de interferência desses compostos sobre a resposta analítica do catecol foi investigado utilizando soluções contendo $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol e adicionando diferentes concentrações do potencial interferente (1:1, 1:5 e 1:10 catecol: interferente). A variação da corrente

devido à presença do composto potencialmente interferente foi calculada por comparação das medidas de corrente do biossensor em solução contendo catecol na presença e na ausência de interferente. Os estudos demonstraram que os compostos investigados não apresentaram interferência significativa na determinação de catecol numa razão molar de 1:10 (catecol: interferente), conduzindo a alterações no sinal analítico inferiores a $\pm 7,5\%$. Portanto, o biossensor proposto pode ser utilizado para a determinação de catecol na presença desses compostos com seletividade adequada.

4.3.9. Estudo de recuperação e aplicação analítica

O biossensor proposto foi aplicado em um estudo de recuperação e quantificação de catecol em três amostras de água (de torneira, mineral e de drenagem urbana) usando o método de adição de padrão. As amostras de água foram fortificadas conforme descrito na parte experimental (item 4.2.6), com uma quantidade conhecida de catecol ($0,80 \mu\text{mol L}^{-1}$), e as medidas de SWV foram realizadas em triplicata para cada amostra. Medidas de recuperação foram obtidas por adição de diferentes concentrações de catecol para os três tipos diferentes de amostras de água fortificadas. As recuperações de 97,4–101,7% obtidas para as amostras analisadas demonstram a exatidão satisfatória do método proposto (Tabela 6).

Tabela 6. Estudo de recuperação e quantificação de catecol em amostras de água fortificadas usando o biossensor proposto

Amostra ^a	Catecol ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
	Concentração de padrão adicionado	% Recuperação ^b	Quantificado ^c
Água de torneira	1,54	101,3	0,82 \pm 0,01
	1,90	101,6	
	2,62	98,8	
Água mineral	1,54	100,7	0,78 \pm 0,02
	1,90	100,5	
	2,62	99,2	
Água de drenagem urbana	1,17	101,7	0,76 \pm 0,04
	1,90	97,4	
	2,62	100,8	

^a Amostras de água fortificadas = $0,80 \mu\text{mol L}^{-1}$ catecol.

^b Recuperação = (valor médio encontrado / valor adicionado) x 100%.

^c Média \pm desvio padrão; n=3.

Além disso, as concentrações de catecol determinada nas amostras de torneira, água mineral e drenagem urbana foram $0,82 \pm 0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,78 \pm 0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,76 \pm 0,04 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente (Tabela 6). Os resultados obtidos a partir destas amostras mostrou um erro relativo máximo $\pm 5,0\%$ em comparação com o teor conhecido das amostras fortificadas. Por conseguinte, o método desenvolvido é apresentado como uma alternativa adequada para a determinação de catecol em amostras de água com boa precisão e exatidão.

CONCLUSÕES

No presente trabalho apresentou-se o desenvolvimento de dois novos biossensores contendo materiais nanoestruturados (NP metálicas e HNT) e IL, os quais foram avaliados e aplicados na determinação de compostos fenólicos.

O primeiro biossensor apresentado foi construído à base de enzima PO obtida de brotos de trevo imobilizada em HNT, juntamente com PtNP dispersas em IL (Pt-BMI.PF₆). Este biossensor mostrou boa estabilidade, adequada reprodutibilidade e um baixo LOD para a determinação de dopamina e outras catecolaminas. A utilização da enzima obtida a partir de uma fonte vegetal como um biocatalisador forneceu alta eficiência, baixo custo e seletividade adequada para a construção de um biossensor para a determinação de catecolaminas. Sugere-se que o excelente desempenho analítico do método proposto é devido à imobilização eficaz da PO sobre a nanoargila, e a facilitação da transferência de elétrons entre a proteína e a superfície do eletrodo, devido à presença do PtNP e IL. Os resultados obtidos mostram que o método apresentou precisão e exatidão adequadas para a determinação de dopamina em formulações farmacêuticas, podendo ser avaliado também para a quantificação de outras catecolaminas em diferentes amostras de fármacos e/ou biológicas.

O segundo biossensor apresentado foi construído à base de LAC de *Aspergillus oryzae* imobilizada sobre AuNP revestidas com PEI. Sugere-se que a presença de AuNP no filme nanoestruturado formado sobre um GCE contribua na DET entre o centro eletroativo da LAC e a superfície do eletrodo. O biossensor otimizado mostrou boa estabilidade, adequada repetibilidade e reprodutibilidade, e baixo LOD para a determinação de catecol e outros compostos fenólicos. Este biossensor foi aplicado com sucesso na quantificação de catecol em amostras de águas fortificadas, e pode ser avaliado para a determinação de compostos fenólicos em amostras ambientais e de sistemas de tratamento de efluentes. Além disso, este método mostrou-se uma plataforma adequada para a imobilização de enzimas e DET, e também mostrou um grande potencial de aplicação para o desenvolvimento de novos dispositivos de biossensoriamento.

REFERÊNCIAS

- ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnol. Adv.**, 30, 512–523, 2012.
- APETREI, C.; RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, M. L.; DE SAJA, J. A. Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized phosphate-doped polypyrrole film as an immobilization support. Application for detection of phenolic compounds. **Electrochim. Acta**, 56, 8919–8925, 2011.
- ATTA, N. F.; EL-KADY, M. F. Novel poly(3-methylthiophene)/Pd, Pt nanoparticle sensor: Synthesis, characterization and its application to the simultaneous analysis of dopamine and ascorbic acid in biological fluids. **Sens. Actuators B**, 145, 299–310, 2010.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamental and applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 833 p., 2001.
- BATTISTUZZI, G.; BELLEI, M.; BORTOLOTTI, C. A.; SOLA, M. Redox properties of heme peroxidases. **Arch. Biochem. Biophys.**, 500, 21–36, 2010.
- BERGLUND, G. I.; CARLSSON, G. H.; SMITH, A. T.; SZÖKE, H.; HENRIKSEN, A.; HAJDU, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. **Nature**, 417, 463–468, 2002.
- BIAN, W.; YAN, B.; SHI, N.; QIU, F.; LOU, L.-L.; QI, B.; LIU, S. Room temperature ionic liquid (RTIL)-decorated mesoporous silica SBA-15 for papain immobilization: RTIL increased the amount and activity of immobilized enzyme. **Mater. Sci. Eng. C**, 32, 364–368, 2012.
- BRONDANI, D.; DUPONT, J.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Development of biosensor based on ionic liquid and corn peroxidase immobilized on chemically crosslinked chitin. **Sens. Actuators B**, 138, 236–243, 2009.

BRONDANI, D.; ZAPP, E.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W. Gold nanoparticles in an ionic liquid phase supported in a biopolymeric matrix applied in the development of a rosmarinic acid biosensor. **Analyst**, 136, 2495–2505, 2011.

BRONDANI, D.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Halloysite clay nanotubes and platinum nanoparticles dispersed in ionic liquid applied in the development of a catecholamine biosensor. **Analyst**, 137, 3732–3739, 2012.

BRONDANI, D.; SOUZA, B.; SOUZA, B. S.; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. PEI-coated gold nanoparticles decorated with laccase: A new platform for direct electrochemistry of enzymes and biosensing applications. **Biosens. Bioelectron.**, 42, 242–247, 2013.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. **Engenharia enzimática**. 1. ed. Lisboa: Lidel, 250 p., 2003.

CAI, Z.-Y.; ZHU, M.-Q.; DAI, H.; LIU, Y.; MAO, J.-X.; CHEN, X.-Z.; HE, C.-H. Halloysite nanotubes supported gold catalyst for cyclohexene oxidation with molecular oxygen. **Adv. Chem. Eng. Sci.**, 1, 15–19, 2011.

CAMPÀS M.; CARPENTIER, R.; ROUILLON, R. Plant tissue-and photosynthesis-based biosensors. **Biotechnol. Adv.**, 26, 370–378, 2008.

CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. **Anal. Bioanal. Chem.**, 396, 241–259, 2010.

CASTAÑEDA, M. T.; ALEGRET, S.; MERKOÇI, A. Electrochemical sensing of DNA using gold nanoparticles. **Electroanalysis**, 19, 743–753, 2007.

CASTILHO, T. J.; SOTOMAYOR, M. P. T.; KUBOTA, L. T. Amperometric biosensor based on HRP for biogenic amine determinations in biological samples. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 37, 785–791, 2005.

CEBRIÁN, V.; MARTÍN-SAAVEDRA, F.; YAGÜE, C.; ARRUEBO, M.; SANTAMARÍA, J.; VILABOIA, N. Size-dependent transfection efficiency of PEI-coated gold nanoparticles. **Acta Biomater.**, 7, 3645–3655, 2011.

CLARK JR., L.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 102, 29–45, 1962.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 446 p., 1996.

CHEN, S.-M.; LIU, M.-I. Electrochemical self-assembly of nordihydroguaiaretic acid/Nafion modified electrodes and their electrocatalytic properties for catecholamines and ascorbic acid. **J. Electroanal. Chem.**, 579, 153–162, 2005.

CHERNYSHOV, D. V.; SHVEDENE, N. V.; ANTIPOVA, E. R.; PLETNEV, I. V. Ionic liquid-based miniature electrochemical sensors for the voltammetric determination of catecholamines. **Anal. Chim. Acta**, 621, 178–184, 2008.

CHILDS, R. E.; BARDSLEY, W. G. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. **Biochem. J.**, 145, 93–103, 1975.

COELHO, A. C. V.; SANTOS, P. S.; SANTOS, H. S. Argilas especiais: o que são, caracterização e propriedades. **Quim. Nova**, 30, 146–152, 2007.

CONSORTI, C. S.; SOUZA, R. F.; DUPONT, J.; SUAREZ, P. A. Z. Líquidos iônicos contendo o cátion dialquilimidazólio: estrutura, propriedades físico-químicas e comportamento em solução. **Quim. Nova**, 24, 830–837, 2001.

DAGYS, M.; HABERSKA, K.; SHLEEV, S.; ARNEBRANT, T.; KULYS, J.; RUZGAS, T. Laccase-gold nanoparticle assisted bioelectrocatalytic reduction of oxygen. **Electrochem. Commun.**, 12, 933–935, 2010.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1186 p., 2007.

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clin. Chim. Acta**, 334, 41–69, 2003.

DORIA, G.; CONDE, J.; VEIGAS, B.; GIESTAS, L.; ALMEIDA, C.; ASSUNÇÃO, M.; ROSA, J.; BAPTISTA, P. V. Noble metal nanoparticles for biosensing applications. **Sensors**, 12, 1657–1687, 2012.

DUPONT, J. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. **J. Braz. Chem. Soc.**, 15, 341–350, 2004.

DUPONT, J.; SUAREZ, P. A. Z. Physico-chemical processes in imidazolium ionic liquids. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, 8, 2441–2452, 2006.

DUPONT, J.; SCHOLTEN, J. D. On the structural and surface properties of transition-metal nanoparticles in ionic liquids. **Chem. Soc. Rev.**, 39, 1780–1804, 2010.

ENSAFI, A. A.; DADKHAH, M.; KARIMI-MALEH, H. Determination of isoproterenol and uric acid by voltammetric method using carbon nanotubes paste electrode and p-chloranil. **Colloids Surf. B**, 84, 148–154, 2011.

FARMACOPÉIA AMERICANA. **United States Pharmacopeia National Formulary XXIII**, US Pharmacopeia Convention, US Pharmacopeia Convention, Rockville, MD, 1995. Dopamine hydrochloride; p. 473.

FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Quim. Nova**, 15, 28–39, 1992.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Quim. Nova**, 25, 455–464, 2002.

FENG, J.-J.; ZHAO, G.; XU, J.-J.; CHEN, H.-Y. Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme proteins immobilized on gold nanoparticles stabilized by chitosan. **Anal. Biochem.**, 342, 280–286, 2005.

FENG, W.; JI, P. Enzymes immobilized on carbon nanotubes. **Biotechnol. Adv.**, 29, 889–895, 2011.

FERAPONTOVA, E. E.; GRIGORENKO, V. G.; EGOROV, A. M. P-chip and P-chip bienzyme electrodes based on recombinant forms of horseradish peroxidase immobilized on gold electrodes. **Biochemistry**, 66, 832–839, 2001.

FERNANDES, S. C.; OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. A green bean homogenate immobilized on chemically crosslinked chitin for determination of caffeic acid in white wine. **Enzyme Microb. Technol.**, 40, 661–668, 2007.

FERNANDES, S. C.; OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FATIBELLO-FILHO, O.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on laccase immobilized on microspheres of chitosan crosslinked with tripolyphosphate. **Sens. Actuators, B**, 133, 202–207, 2008.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. A.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnol. Adv.** (2012), doi:10.1016/j.biotechadv.2012.02.013.

FERREIRA, F. D. P.; SILVA, L. I. B.; FREITAS, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. High performance liquid chromatography coupled to an optical fiber detector coated with laccase for screening catecholamines in plasma and urine. **J. Chromatogr. A**, 1216, 7049–7054, 2009.

FRANZOI, A. C.; DUPONT, J.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on laccase and an ionic liquid for determination of rosmarinic acid in plant extracts. **Talanta**, 77, 1322–1327, 2009a.

FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W.; DE OLIVEIRA, L. F. Biosensor for luteolin based on silver or gold nanoparticles in ionic liquid and laccase immobilized in chitosan modified with cyanuric chloride. **Analyst**, 134, 2320–2328, 2009b.

FRANZOI, A. C.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; MOCCELINI, S. K.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J. Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. **Quim. Nova**, 34, 1042–1050, 2011.

FRASCA, S.; ROJAS, O.; SALEWSKI, J.; NEUMANN, B.; STIBA, K.; WEIDINGER, I. M.; TIERSCH, B.; LEIMKÜHLER, S.; KOETZ, J.; WOLLENBERGER, U. Human sulfite oxidase electrochemistry on gold nanoparticles modified electrode. **Bioelectrochemistry**, 87, 33–41, 2012.

FRASCONI, M.; BOER, H.; KOIVULA, A.; MAZZEI, F. Electrochemical evaluation of electron transfer kinetics of high and low redox potential laccases on gold electrode surface. **Electrochim. Acta**, 56, 817–827, 2010.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **J. Braz. Chem. Soc.**, 14, 230–243, 2003.

GALHARDO, K. S.; TORRESI, R. M.; TORRESI, S. I. C. Improving the performance of a glucose biosensor using an ionic liquid for enzyme immobilization. On the chemical interaction between the biomolecule, the ionic liquid and the cross-linking agent. **Electrochim. Acta**, 73, 123–128, 2012.

GALLI, A. **Desenvolvimento e caracterização de um biossensor bienzimático imobilizado sobre monocamadas auto-organizadas para determinação de açúcares em alimentos**. 2009. 143 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2009.

GIARDINA, P.; FARACO, V.; PEZZELLA, C.; PISCITELLI, A.; VANHULLE, S.; SANNIA, G. Laccases: a never-ending story. **Cell. Mol. Life Sci.**, 67, 369–385, 2010.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quim. Nova**, 30, 136–145, 2007.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M.; Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, 177, 751–766, 1949.

GOYAL, R. N.; BISHNOI, S. Simultaneous determination of epinephrine and norepinephrine in human blood plasma and urine samples using nanotubes modified edge plane pyrolytic graphite electrode. **Talanta**, 84, 78–83, 2011.

GRANERO, A. M.; FERNÁNDEZ, H.; AGOSTINI, E.; ZÓN, M. A. An amperometric biosensor based on peroxidases from *Brassica napus* for the determination of the total polyphenolic content in wine and tea samples. **Talanta**, 83, 249–255, 2010.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖROS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors – sensor principles and architecture. **Sensors**, 8, 1400–1458, 2008.

GUO, S.; WANG, E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. **Anal. Chim. Acta**, 598, 181–192, 2007.

HABERMÜLLER, K.; MOSBACH, K.; SCHUHMANN, W. Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. **Fresenius J. Anal. Chem.**, 366, 560–568, 2000.

HAMID, M.; KHALIL-UR-REHMAN. Potential applications of peroxidases. **Food Chem.**, 115, 1177–1186, 2009.

HOSSEINI, M.; MOMENI, M. M.; FARAJI, M. An innovative approach to electro-oxidation of dopamine on titanium dioxide nanotubes electrode modified by gold particles. **J. Appl. Electrochem.**, 40, 1421–1427, 2010.

HU, S.; LU, Q.; XU, Y. Biosensors based on direct electron transfer of protein (Chapter 17). In: ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. (Eds.), **Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications**. Academic Press Inc., USA, 2008. p. 531–581.

HUANG, X.; XIAO, Y.; ZHANG, W.; LANG, M. In-situ formation of silver nanoparticles stabilized by amphiphilic star-shaped copolymer and their catalytic application. **Appl. Surf. Sci.**, 258, 2655–2660, 2012.

HUBLIK, G.; SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enz. Microb. Technol.**, 27, 330–336, 2000.

INTRA, J.; SALEM, A. K. Characterization of the transgene expression generated by branched and linear polyethylenimine-plasmid DNA nanoparticles in vitro and after intraperitoneal injection in vivo. **J. Controlled Release**, 130, 129–138, 2008.

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry. **Compendium of Chemical Terminology – Gold Book**. Version 2.3, 2011-10-11. Disponível em: < <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>>. Acessado em: dezembro de 2012.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization – Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochem.**, 43, 1019–1032, 2008.

IZAOUEN, N.; CUBILLANA-AGUILERA, L. M.; NARANJO-RODRÍGUEZ, I.; CISNEROS, J. L. H.-H.; BOUCHTA, D.; TEMSAMANI, K. R.; PALACIOS-SANTANDER, J. M. β -Sonogel-carbon electrodes: A new alternative for the electrochemical determination of catecholamines. **Talanta**, 78, 370–376, 2009.

JANEGITZ, B. C.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Direct electrochemistry of tyrosinase and biosensing for phenol based on gold nanoparticles electrodeposited on a boron-doped diamond electrode. **Diam. Relat. Mater.**, 25, 128–133, 2012.

JENSEN, U. B.; VAGIN, M.; KOROLEVA, O.; SUTHERLAND, D. S.; BESENBACHER, F.; FERAPONTOVA E. E. Activation of laccase bioelectrocatalysis of O_2 reduction to H_2O by carbon nanoparticles. **J. Electroanal. Chem.**, 667, 11–18, 2012.

JIN, Y.; LI, Z.; HU, L.; SHI, X.; GUAN, W.; DU, Y. Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles by atmospheric plasma. **Carbohydr. Polym.**, 91, 152–156, 2013.

JOUSSEIN, E.; PETIT, S.; CHURCHMAN, J.; THENG, B.; RIGHI, D.; DELVAUX, B. Halloysite clay minerals – a review. **Clay Miner.**, 40, 383–426, 2005.

KERMAN, K.; SAITO, M.; YAMAMURA, S.; TAKAMURA, Y.; TAMIYA, E. Nanomaterial-based electrochemical biosensors for medical applications. **Trends Anal. Chem.**, 27, 585–592, 2008.

KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chem. Eng. Sci.**, 61, 1017–1026, 2006.

LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **J. Electroanal. Chem.**, 101, 19–28, 1979a.

LAVIRON, E. The use of linear potential sweep voltammetry and of a.c. voltammetry for the study of the surface electrochemical reaction of strongly adsorbed systems and of redox modified electrodes. **J. Electroanal. Chem.**, 100, 263–270, 1979b.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1202 p., 2006.

LIU, J.; JÖNSSON, J. Å.; JIANG, G. Application of ionic liquids in analytical chemistry. **Trends Anal. Chem.**, 24, 20–27, 2005a.

LIU, H.; ZHANG, L.; ZHOU, J.; HAO, Y.; HE, P.; FANG, Y. Flow injection chemiluminescence determination of dobutamine hydrochloride injection using luminol–ferricyanide/ferrocyanide system. **Anal. Chim. Acta**, 541, 125–129, 2005b.

LIU, P.; ZHAO, M. Silver nanoparticle supported on halloysite nanotubes catalyzed reduction of 4-nitrophenol (4-NP). **Appl. Surf. Sci.**, 255, 3989–3993, 2009.

LVOV, Y. M.; SHCHUKIN, D. G.; MÖHWALD, H.; PRICE, R. R. Halloysite clay nanotubes for controlled release of protective agents. **ACS Nano**, 2, 814–820, 2008.

MACHADO, G. S.; CASTRO, K. A. D. F.; WYPYCH, F.; NAKAGAKI, S. Immobilization of metalloporphyrins into nanotubes of natural halloysite toward selective catalysts for oxidation reactions. **J. Mol. Catal. A**, 283, 99–107, 2008.

MADHAVI, V.; LELE, S. S. Laccase: properties and applications. **BioResour.**, 4, 1694–1717, 2009.

MAHSHID, S.; LI, C.; MAHSHID, S. S.; ASKARI, M.; DOLATI, A.; YANG, L.; LUO, S.; CAI, Q. Sensitive determination of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid using TiO₂ nanotubes modified with Pd, Pt and Au nanoparticles. **Analyst**, 136, 2322–2329, 2011.

MANJUNATHA, R.; SURESH, G. S.; MELO, J. S.; D'SOUZA, S. F.; VENKATESHA, T. V. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using polystyrene sulfonate wrapped multiwalled carbon nanotubes bound to graphite electrode through layerbylayer technique. **Sens. Actuators B**, 145, 643–650, 2010.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb. Technol.**, 40, 1451–1463, 2007.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, 60, 551–565, 2002.

MEDINA-RAMIREZ, I.; BASHIR, S.; LUO, Z.; LIU, J. L. Green synthesis and characterization of polymer-stabilized silver nanoparticles. **Colloids Surf. B**, 73, 185–191, 2009.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. **Anal. Sci.**, 20, 1113–1126, 2004.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chem.**, 77, 237–256, 2002.

MERKOÇI, A. Nanoparticles-based strategies for DNA, protein and cell sensors. **Biosens. Bioelectron.**, 26, 1164–1177, 2010.

MICHAŁOWICZ, J.; DUDA, W. Phenols – Sources and toxicity. **Pol. J. Environ. Stud.**, 16, 347–362, 2007.

MIGOWSKI, P.; DUPONT, J. Catalytic applications of metal nanoparticles in imidazolium ionic liquids. **Chem. Eur. J.**, 13, 32–39, 2007.

MOCCELINI, S. K.; FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W. A novel support for laccase immobilization: Cellulose acetate modified with ionic liquid and application in biosensor for methyl dopa detection. **Biosens. Bioelectron.**, 26, 3549–3554, 2011.

MONIRUZZAMAN, M.; NAKASHIMA, K.; KAMIYA, N.; GOTO, M. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. **Biochem. Eng. J.**, 48, 295–314, 2010.

MOROZOVA, O. V.; SHUMAKOVICH, G. P.; GORBACHEVA, M. A.; SHLEEV, S. V.; YAROPOLOV, A. I. “Blue” Laccases. **Biochemistry**, 72, 1136–1150, 2007.

NAKAGAKI, S.; WYPYCH, F. Nanofibrous and nanotubular supports for the immobilization of metalloporphyrins as oxidation catalysts. **J. Coll. Interf. Sci.**, 315, 142–157, 2007.

NAUSHAD, M.; ALOTHMAN, Z. A.; KHAN, A. B.; ALI, M. Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: A review. **Int. J. Biol. Macromol.**, 51, 555– 560, 2012.

NC-IUBMB, Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. **Enzyme nomenclature**. San Diego: Academic Press, 862 p., 1992.

NOTE, C.; KOSMELLA, S.; KOETZ, J. Poly(ethyleneimine) as reducing and stabilizing agent for the formation of gold nanoparticles in w/o microemulsions. **Colloids Surf. A**, 290, 150–156, 2006.

OAK, J. N.; OLDENHOF, J.; VAN TOL, H. H. M. The dopamine D₄ receptor: one decade of research. **Eur. J. Pharmacol.**, 405, 303–327, 2000.

OLIVEIRA, I. R. W. Z. **Desenvolvimento de biossensores e sensores biomiméticos para determinação de compostos fenólicos**. 2007. 148 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2007.

OLIVEIRA, G. C.; MOCCELINI, S. K.; CASTILHO, M.; TEREZO, A. J.; POSSAVATZ, J.; MAGALHÃES, M. R. L.; DORES, E. F. G. C. Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. **Talanta**, 98, 130–136, 2012.

O'MAHONY, A. M.; SILVESTER, D. S.; ALDOUS, L.; HARDACRE, C.; COMPTON, R. G. Effect of water on the electrochemical window and potential limits of room-temperature ionic liquids. **J. Chem. Eng. Data**, 53, 2884–2891, 2008.

OPALLO, M.; LESNIEWSKI, A. A review on electrodes modified with ionic liquids. **J. Electroanal. Chem.**, 656, 2–16, 2011.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Quim. Nova**, 25, 1012–1021, 2002.

PINGARRÓN, J. M.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Electrochim. Acta**, 53, 5848–5866, 2008.

POULOS, T. L. Thirty years of heme peroxidase structural biology. **Arch. Biochem. Biophys.**, 500, 3–12, 2010.

RAJESH, R.; REKHA, M. R.; SHARMA, C. P. Evaluation of lauryl chitosan graft polyethyleneimine as a potential carrier of genes and anticancer drugs. **Process Biochem.**, 47, 1079–1088, 2012.

REGALADO, C.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E.; DUARTE-VÁZQUEZ, M. A. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochem. Rev.**, 3, 243–256, 2004.

RESSINE, A.; VAZ-DOMINGUEZ, C.; FERNANDEZ, V. M.; LACEY, A. L.; LAURELL, T.; RUZGAS, T.; SHLIEV, S. Bioelectrochemical studies of azurin and laccase confined in three-dimensional chips based on gold-modified nano-/microstructured silicon. **Biosens. Bioelectron.**, 25, 1001–1007, 2010.

REZAEI, B.; KHAYAMIAN, T.; MAJIDI, N.; RAHMANI, H. Immobilization of specific monoclonal antibody on Au nanoparticles for hGH detection by electrochemical impedance spectroscopy. **Biosens. Bioelectron.**, 25, 395–399, 2009.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends Biotechnol.**, 24, 219–226, 2006.

ROCHEFORT, D.; KOUISNI, L.; GENDRON, K. Physical immobilization of laccase on an electrode by means of poly(ethyleneimine) microcapsules. **J. Electroanal. Chem.**, 617, 53–63, 2008.

ROZENBERGA, B. A.; TENNE, R. Polymer-assisted fabrication of nanoparticles and nanocomposites. **Prog. Polym. Sci.**, 33, 40–112, 2008.

RUAN, C.; LI, T.; NIU, Q.; LU, M.; LOU, J.; GAO, W.; SUN, W. Electrochemical myoglobin biosensor based on grapheme-ionic liquid-chitosan bionanocomposites: Direct electrochemistry and electrocatalysis. **Electrochim. Acta**, 64, 183–189, 2012.

SAEI, A. A.; NAJAFI-MARANDI, P.; ABHARI, A.; GUARDIA, M.; DOLATABADI, J. E. N. Electrochemical biosensors for glucose based on metal nanoparticles. **Trends Anal. Chem.**, 42, 216 – 227, 2013.

SANTHANAM, N.; VIVANCO, J. M.; DECKER, S. R.; REARDON, K. F. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. **Trends Biotechnol.**, 29, 480–489, 2011.

SANTOS, P. S.; TOLEDO, S. P.; SANTOS, H. S. Caulins haloisfíticos das regiões sudeste e sul do Brasil. **Cerâmica Industrial**, 14, 14–20, 2009.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnol. Adv.**, 30, 489–511, 2012.

SCHEEREN, C. W.; MACHADO, G.; TEIXEIRA, S. R.; MORAIS, J.; DOMINGOS, J. B.; DUPONT, J. Synthesis and characterization of Pt(0) nanoparticles in imidazolium ionic liquids. **J. Phys. Chem. B**, 110, 13011–13020, 2006.

SCHEEREN, C. W.; DOMINGOS, J. B.; MACHADO, G.; DUPONT, J. Hydrogen reduction of Adams' catalyst in ionic liquids: formation and stabilization of Pt(0) nanoparticles. **J. Phys. Chem. C**, 112, 16463–16469, 2008.

SEDDON, K. R.; STARK, A.; TORRES, M. J. Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids. **Pure Appl. Chem.**, 72, 2275–2287, 2000.

SEGUT, O.; HERLEM, G.; LAKARD, B.; BLONDEAU-PATISSIER, V.; NARDIN, M.; GREE, S.; RAUCH, J.-Y. Electrochemically deposited polyethyleneimine films and their characterization. **Synthetic Metals**, 160, 1359–1364, 2010.

SHAMELI, K.; AHMAD, M. B.; JAZAYERI, S. D.; SEDAGHAT, S.; SHABANZADEH, P.; JAHANGIRIAN, H.; MAHDAVI, M.; ABDOLLAHI, Y. Synthesis and characterization of polyethylene glycol mediated silver nanoparticles by the green method. **Int. J. Mol. Sci.**, 13, 6639–6650, 2012.

SHCHUKIN, D. G.; SUKHORUKOV, G. B.; PRICE, R. R.; LVOV, Y. M. Halloysite nanotubes as biomimetic nanoreactors. **Small**, 1, 510–513, 2005.

SHERVEDANI, R. K.; AMINI, A. Direct electrochemistry of dopamine on gold–*Agaricus bisporus* laccase enzyme electrode: Characterization and quantitative detection. **Bioelectrochem.**, 84, 25–31, 2012.

SHIDDIKY, M. J. A.; TORRIERO, A. A. J. Application of ionic liquids in electrochemical sensing systems. **Biosens. Bioelectron.**, 26, 1775–1787, 2011.

SHIMOMURA, T.; ITOH, T.; SUMIYA, T.; HANAOKA, T.; MIZUKAMI, F.; ONO, M. Amperometric detection of phenolic compounds with enzyme immobilized in mesoporous silica prepared by electrophoretic deposition. **Sens. Actuators B**, 153, 361–368, 2011.

SHLEEV, S.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; KHALUNINA, A.; MOROZOVA, O.; YAROPOLOV, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, 67, 115–124, 2005.

SILVA, L. I. B.; FERREIRA, F. D. P.; FREITAS, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Optical fiber biosensor coupled to chromatographic separation for screening of dopamine, norepinephrine and epinephrine in human urine and plasma. **Talanta**, 80, 853–857, 2009.

SILVESTER, D. S. Recent advances in the use of ionic liquids for electrochemical sensing. **Analyst**, 136, 4871–4882, 2011.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R., **Fundamentos de Química Analítica**. 8.ed., São Paulo: Cengage Learning, 999 p., 2008.

SOLANKI, P. R.; KAUSHIK, A.; AGRAWAL, V. V.; MALHOTRA, B. D. Nanostructured metal oxide-based biosensors. **NPG Asia Mater.**, 3, 17–24, 2011.

SOLICH, P.; POLYDOROU, C. K.; KOUPPARIS, M. A.; EFSTATHIOU, C. E. Automated flow-injection spectrophotometric determination of catecholamines (epinephrine and isoproterenol) in pharmaceutical formulations based on ferrous complex formation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 22, 781–789, 2000.

SOLOMON, E. I.; AUGUSTINE, A. J.; YOON, J. O₂ Reduction to H₂O by the multicopper oxidases. **Dalton Trans.**, 30, 3921–3932, 2008.

SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Quim. Nova**, 25, 123–128, 2002.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1000 p., 1996.

SU, L.; JIA, W.; HOU, C.; LEI, Y. Microbial biosensors: A review. **Biosens. Bioelectron.**, 26, 1788–1799, 2011.

SUN, X.; DONG, S.; WANG, E. One-step preparation of highly concentrated well-stable gold colloids by direct mix of polyelectrolyte and HAuCl₄ aqueous solutions at room temperature. **J. Colloid Interface Sci.**, 288, 301–303, 2005.

SUN, W.; JIANG, Q.; YANG, M.; JIAO, K. Electrochemical behaviors of hydroquinone on a carbon paste electrode with ionic liquid as binder. **Bull. Korean Chem. Soc.**, 29, 915–920, 2008.

SUN, P.; ARMSTRONG, D. W. Ionic liquids in analytical chemistry. **Anal. Chim. Acta**, 661, 1–16, 2010.

SUN, X.; ZHANG, Y.; SHEN, H.; JIA, N. Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase based on halloysite nanotubes/chitosan nanocomposite film. **Electrochim. Acta**, 56, 700–705, 2010.

ŠVANCARA, I.; VYTRÁS, K.; KALCHER, K.; WALCARIUS, A.; WANG, J. Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: a review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. **Electroanalysis**, 21, 7–28, 2009.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications. **Biosens. Bioelectron.**, 16, 121–31, 2001.

TOKONAMI, S.; YAMAMOTO, Y.; SHIIGI, H.; NAGAOKA, T. Synthesis and bioanalytical applications of specific-shaped metallic nanostructures: a review. **Anal. Chim. Acta**, 716, 76–91, 2012.

TZIALLA, A. A.; PAVLIDIS, I. V.; FELICISSIMO, M. P.; RUDOLF, P.; GOURNIS, D.; STAMATIS, H. Lipase immobilization on smectite nanoclays: Characterization and application to the epoxidation of α -pinene. **Bioresour. Technol.**, 101, 1587–1594, 2010.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, 65, 249–259, 2004.

VELASCO-GARCIA, M. N. Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. **Semin. Cell Dev. Biol.**, 20, 27–33, 2009.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2. ed., New York: J. Wiley, 1360 p., 1995.

WAGNER, A. L.; COOPER, S.; RIEDLINGER, M. Natural nanotubes enhance biodegradable and biocompatible nanocomposites. **Ind. Biotechnol.**, 1, 190–193, 2005.

WANG, J. H.; ZHANG, X.; ZHANG, B.; ZHAO, Y. F.; ZHAI, R.; LIU, J. D.; CHEN, R. F. Rapid adsorption of Cr(VI) on modified halloysite nanotubes. **Desalination**, 259, 22–28, 2010.

WANG, K.; TANG, J.; ZHANG, Z.; GAO, Y.; CHEN, G. Laccase on Black Pearl 2000 modified glassy carbon electrode: Characterization of direct electron transfer and biological sensing properties for pyrocatechol. **Electrochim. Acta**, 70, 112–117, 2012.

WANG, L.; WEN, W.; XIONG, H.; ZHANG, X.; GU, H.; WANG, S. A novel amperometric biosensor for superoxide anion based on superoxide dismutase immobilized on gold nanoparticle-chitosan-ionic liquid biocomposite film. **Anal. Chim. Acta**, 758, 66–71, 2013.

WEI, S.; SONG, G.; LIN, J.-M. Separation and determination of norepinephrine, epinephrine and isoprenaline enantiomers by capillary electrophoresis in pharmaceutical formulation and human serum. **J. Chromatogr. A**, 1098, 166–171, 2005.

WEI, D.; IVASKA, A. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors. **Anal. Chim. Acta**, 607, 126–135, 2008.

WELTON, T. Ionic liquids in catalysis. **Coord. Chem. Rev.**, 248, 2459–2477, 2004.

WHITE, R. D.; BAVYKIN D. V.; WALSH, F. C. The stability of halloysite nanotubes in acidic and alkaline aqueous suspensions. **Nanotechnology**, 23, 065705 (1–10), 2012.

WILLNER, I.; WILLNER, B.; TEL-VERED, R. Electroanalytical applications of metallic nanoparticles and supramolecular nanostructures. **Electroanalysis**, 23, 13–28, 2011.

XIA, L.; WEI, Z.; WAN, M. Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. **J. Colloid Interface Sci.**, 341, 1–11, 2010.

XING, B.; YIN, X.-B. Novel poly-dopamine adhesive for a halloysite nanotube-Ru(bpy)₃²⁺ electrochemiluminescent sensor. **PLoS One**, 4, e6451 (1–8), 2009.

XU, F.; SHIN, W.; BROWN, S. H.; WAHLEITHNER, J. A.; SUNDARAM, U. M.; SOLOMON, E. I. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. **Biochim. Biophys. Acta**, 1292, 303–311, 1996.

XU, Z.; CHEN, X.; DONG, S. Electrochemical biosensors based on advanced bioimmobilization matrices. **Trends Anal. Chem.**, 25, 899–908, 2006.

YANG, C.; LIU, P.; ZHAO, Y. Preparation and characterization of coaxial halloysite/polypyrrole tubular nanocomposites for electrochemical energy storage. **Electrochim. Acta**, 55, 6857–6864, 2010.

YOO, E.-H.; LEE, S.-Y. Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. **Sensors**, 10, 4558–4576, 2010.

YUAN, P.; SOUTHON, P.D.; LIU, Z.; GREEN, M.E.R.; HOOK, J.M.; ANTILL, S.J.; KEPERT, C.J. Functionalization of halloysite clay nanotubes by grafting with γ -aminopropyltriethoxysilane. **J. Phys. Chem. C**, 112, 15742–15751, 2008.

ZAKARINA, N.; BEKTUROV, E. Platinum nanoparticles stabilized by polyvinylpyrrolidone for hydrogenation. **Chin. J. Catal.**, 29, 1165–1168, 2008.

ZHANG, L.; JIANG, X.; WANG, E.; DONG, S. Attachment of gold nanoparticles to glassy carbon electrode and its application for the direct electrochemistry and electrocatalytic behavior of hemoglobin. **Biosens. Bioelectron.**, 21, 337–345, 2005.

ZHANG, Y.; ROCHEFORT, D. Comparison of emulsion and vibration nozzle methods for microencapsulation of laccase and glucose oxidase by interfacial reticulation of poly(ethyleneimine). **J. Microencapsul.**, 27, 703–13, 2010.

ZHANG, Y.; CAO, H.; FEI, W.; CUI, D.; JIA, N. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin immobilized into halloysite nanotubes/room temperature ionic liquid composite film. **Sens. Actuators B**, 162, 143–148, 2012.

ZHAO, X.; MAI, Z.; KANG, X.; ZOU, X. Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase based on clay–chitosan-gold nanoparticle nanocomposite. **Biosens. Bioelectron.**, 23, 1032–1038, 2008.