

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS - FACET
CURSO DE QUÍMICA

**ESTUDOS CINÉTICOS DA TRANSFERÊNCIA ELETRÔNICA DIRETA E
MEDIADA PELA ENZIMA HRP SOBRE MATERIAIS NANOESTRUTURADOS**

Delton Martins Pimentel

Diamantina

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS - FACET

**ESTUDOS CINÉTICOS DA TRANSFERÊNCIA ELETRÔNICA DIRETA E
MEDIADA PELA ENZIMA HRP SOBRE MATERIAIS NANOESTRUTURADOS**

Delton Martins Pimentel

Orientador: **Prof. Dr. Flávio Santos Damos**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Química
Licenciatura da Universidade Federal dos
Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como
parte dos requisitos exigidos para a
conclusão do curso.

Diamantina

2011

**ESTUDOS CINÉTICOS DA TRANSFERÊNCIA ELETRÔNICA DIRETA E
MEDIADA PELA ENZIMA HRP SOBRE MATERIAIS
NANOESTRUTURADOS**

Delton Martins Pimentel

Orientador:

Prof. Dr. Flávio Santos Damos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Química Licenciatura, como
parte dos requisitos exigidos para a
conclusão do curso.

APROVADO em __ / __ / 2011

Prof^a Dr^a Rita de Cássia Luz - UFVJM

Prof^a Dr^a Débora Vilela Franco - UFVJM

Prof. Dr. Flávio Santos Damos – UFVJM

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela oportunidade de aprendizagem e por chegar à conclusão de mais uma etapa em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Santos Damos pela orientação, compreensão e apoio durante toda a formulação e desenvolvimento deste projeto e outros no decorrer de dois anos de convívio.

Ao meu colega de laboratório Saimon pela ajuda no desenvolvimento deste projeto.

A todos os colegas do bloco de pesquisa pelo apoio e momentos de descontração.

Aos alunos do grupo PET – Química, pela receptividade.

À Profa. Dra. Roqueline Miranda pela autorização para desenvolvimento deste projeto paralelamente ao projeto PIBID – Química.

Aos meus pais, Nery e Zilda; e meus irmãos Dilton e Danúbia, pelo apoio e confiança.

A todos meus amigos, colegas de curso, que se tornaram também parte de minha família (Bel, Cátia, Alyson, Tatinha, Alemão, Alex Guará, Alex, Celina, Marcela, Isabela, Jussara e Laisão, dentre outros). Mesmo que após a formatura corramos o risco de não nos encontrarmos mais, quero que saibam que todos vocês tem um lugar especial nos meus pensamentos e em minha alma. Agradeço a Deus por ter colocado cada um de vocês em meu caminho.

A todos que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

Obrigado!

“Creio que a verdade é perfeita para a matemática, a química, a filosofia, mas não para a vida. Na vida contam mais a ilusão, a imaginação, o desejo, a esperança.”

Ernesto Sábato

RESUMO

Título: Estudos Cinéticos da transferência Eletrônica Direta e Mediada pela enzima HRP sobre Materiais Nanoestruturados

Autor: Delton Martins Pimentel

Orientador: Prof. Dr. Flávio Santos Damos

No presente trabalho realizou-se o estudo do percentual de TED e TEM da enzima HRP sobre Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas modificado com Azul de Meldola (MWCNT/MB), já que o mesmo tem sido amplamente usado como suporte para imobilização de enzimas. Então foram realizados estudos de eletrodo disco rotatório na presença e ausência de Dopamina em meio fosfato pH 7 contendo diferentes volumes de peróxido. Com o intuito de avaliar o percentual de transferência eletrônica direta e mediada da enzima sobre o substrato MWCNT/MB foi aplicada a Equação de Koutecky-Levich, bem como as expressões para TED e TEM, respectivamente. Com nas expressões para corrente cinética anteriores foram estimados os percentuais de TED e TEM para os materiais confeccionados sendo obtido respectivamente: 55% de TED e 45% de TEM/TEM para MWCNT/HRP. Tais resultados demonstram que os eletrodos modificados de tal forma apresentam-se como excelentes materiais para se explorar a TED para a enzima HRP mediante uma redução da TEM sobre materiais nanoestruturados.

Palavras-chave: biossensor, compostos fenólicos, Horseradish Peroxidase, transferência eletrônica direta, transferência eletrônica mediada.

ABSTRACT

Title: Kinetic Studies of Electron Transfer Mediated and Direct by HRP on Nanostructured Materials

Author: Delton Martins Pimentel

Advisor: Prof. Dr. Flávio Santos Damos

In this study was carried out the investigation of the percentage of DET and MET of HRP on Carbon Nanotube Walls Multiple modified with Meldola Blue (MWCNT / MB), since it has been widely used as support for immobilization of enzymes. In this sense, were performed studies by using rotating disk electrode in the presence and absence of dopamine in phosphate buffer (pH 7) containing different amounts of peroxide. To evaluate the percentage of direct and mediated electron transfer from the enzyme on the substrate MWCNT / MB, was applied to the Koutecky-Levich equation, and the expressions for DET and MET, respectively. Based on these expressions for the mechanism of DET and DET / MET were estimated percentage as: 55% DET and 45% DET / MET for MWCNT / HRP. These results demonstrate that the modified electrode is an excellent material to explore the DET for the enzyme HRP through a reduction of MET on nanostructured materials.

Keywords: biosensor, phenolic compounds, Horseradish Peroxidase, direct electron transfer, electron transfer mediated.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1 A interface eletrodo-solução.....	2
2.2 Métodos eletroanalíticos	3
2.2.1 <i>Voltametria</i>	4
2.2.1.1 Voltamogramas.....	6
2.2.2 <i>Amperometria</i>	8
2.2.3 <i>Voltametria e Amperometria hidrodinâmicas</i>	9
2.3 Compostos fenólicos.....	11
2.4 Biossensores	12
2.5 Biossensores amperiométricos para fenóis	14
2.6 Imobilização de enzimas em biossensores	15
2.6.1 <i>Adsorção</i>	17
2.6.2 <i>Ligação covalente</i>	17
2.6.3 <i>Ligação covalente cruzada</i>	17
2.7 Biossensores a base de peroxidases e as vias de transferência eletrônica.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Equipamentos	21
3.2 Materiais e reagentes.....	21
3.3 Preparação do nanotubo de carbono modificado com azul de metileno.....	21
3.4 Estudos de imobilização da enzima em eletrodos de carbono vítreo	22
3.5 Estudos dos parâmetros cinéticos do eletrodo modificado com a enzima em presença de peróxido	22
3.6 Estudos dos parâmetros cinéticos do eletrodo modificado em presença de dopamina.....	22
3.7 Cálculos das porcentagens de TED e TEM.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
4.1. Redução de Peróxido de Hidrogênio sobre Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas e a Enzima HRP.....	23
5. CONCLUSÃO	35
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

Lista de figuras

Figura 1 - Representação esquemática da dupla camada para um eletrodo carregado negativamente.	3
Figura 2 - Sinais de excitação de tensão versus tempos empregados na voltametria	5
Figura 3 - Voltamograma de varredura linear.....	6
Figura 4 - Voltamograma proveniente de voltametria cíclica; onde os índices pa representa pico anódico e pc, pico catódico	8
Figura 5 - Montagem para realização de voltametria hidrodinâmica	9
Figura 6 - Variação da corrente com a raiz da velocidade de rotação do eletrodo a potencial constante.....	10
Figura 7 - Representação esquemática de um biossensor	12
Figura 8 - Quadro comparativo da representação esquemática do mecanismo reacional de biossensores de diferentes gerações.	14
Figura 9 - Intervalo de potencial ótimo para a operação de biossensores amperiométricos e o intervalo de oxidação direta de compostos fenólicos.....	15
Figura 10 - Mecanismo geral do ciclo catalítico da HRP na presença de H ₂ O ₂	18
Figura 11 - Mecanismo de transferência de elétrons mediada por fenol em eletrodos modificados com peroxidase	19
Figura 12 - Voltamogramas de varredura linear para eletrodo de carbono vítreo modificado com NTCPM/HRP em 200 μmol L ⁻¹ H ₂ O ₂ em diferentes velocidades de rotação do eletrodo.....	23
Figura 13 - Medidas de Amperometria com eletrodo de disco rotatório modificado com NTCPM/HRP em 200 μmol L ⁻¹ H ₂ O ₂ em diferentes velocidades de rotação.	26
Figura 14 - (a) Gráfico de Levich referente aos dados da Figura 12, (b) Gráfico de Koutecky-Levich para redução de peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações e (c) Gráfico de Koutecky-Levich para redução de peróxido de hidrogênio na ausência e presença de dopamina.	27
Figura 15 - Gráfico de Koutecky-Levich para eletrodo modificado com NTCPM/HRP: 100 μmol L ⁻¹ ; 200 μmol L ⁻¹ ; 300 μmol L ⁻¹ ; 400 μmol L ⁻¹ e 500 μmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂	33
Figura 16 - Dependência dos interceptos dos gráficos de Koutecky-Levich com a concentração de peróxido na ausência e presença de dopamina 200 μmol L ⁻¹	33

Lista de siglas

- A - Área superficial do eletrodo
- A• - Radical
- Ag/AgCl - Eletrodo de referência prata-cloreto de prata
- AH - Substrato redutor
- AH₂ - Substancia doadora de elétrons
- CA - Concentração do analito
- C_I - Composto oxidado intermediário em estado de oxidação intermediário
- C_{II} - Composto oxidado intermediário em elevado estado de oxidação
- C_o* - Concentração da espécie eletroativa
- C_R* - Concentração da espécie eletroativa na forma reduzida
- DA - Dopamina
- DA* - Dopaminaquinona
- D_o - Coeficiente de difusão
- D_R - Coeficiente difusional da espécie eletroativa na forma reduzida
- E_{1/2} - Potencial de meia onda
- ECS - Eletrodo de calomelano saturado
- EDR - Eletrodo de disco rotatório
- F - Constante de Faraday
- f - Frequência de rotação do eletrodo
- HRP - Horseradish Peroxidase
- HRP-I- Enzima em elevado estado de oxidação
- HRP-II - Enzima em estado de oxidação intermediário
- i_k - Corrente cinética
- i_l - Corrente limite
- i_{l,a} - Corrente limite anódica
- i_{l,c} - Corrente limite catódica
- k₁, k₂, k₃ e k_s - Constantes de velocidade de reações
- NCTPM/HRP - Eletrodo modificado com a enzima e nanotubo de carbono modificado com azul de meldola
- NTC - Nanotubo de carbono

NTCPM - Nanotubo de Carbono de Paredes Múltiplas
NTCPM/MB - Nanotubo de carbono modificado com azul de metileno
P+ - Radical protoporfirina
pa - Pico anódico
pc - Pico catódico
PET - Programa de Educação Tutorial
P_{hox} - Forma oxidada do mediador
P_{hred} - Forma reduzida do mediador
PIBID - Programa Institucional de Incentivo à Docência
S – Substrato Enzimático
TED - Transferência Eletrônica Direta
TEM - Transferência Eletrônica Mediada
TEM/TED - Transferência Eletrônica Direta e Mediada acopladas
v - Viscosidade cinemática do meio
 $\Gamma_{HRP,TED}$ - Concentração de superfície da HRP apta para realizar TED
 $\Gamma_{HRP,TED/TEM}$ - Concentração de superfície da HRP apta para realizar TED/TEM
 $\Gamma_{HRP/TEM}$ - Concentração de superfície da HRP apta para realizar TEM
 ω - Velocidade angular

1. INTRODUÇÃO

A bioeletrocatalise é de fundamental importância do ponto de vista prático uma vez que o entendimento da reação biológica de transferência eletrônica é essencial para o desenvolvimento de biossensores.

A enzima mais empregada no desenvolvimento de biossensores é a Horseradish Peroxidase (HRP) e estudos do mecanismo de ação desta enzima indicam que, sobre eletrodo de grafite pirolítico, apenas 42% das enzimas imobilizadas atuam mediante Transferência Eletrônica Direta (TED) e o percentual restante por Transferência Eletrônica Mediada (TEM). Recentemente, o interesse no emprego de materiais nanoestruturados como suporte para TED de enzimas tem sido crescente e muitos materiais têm sido apresentados como excelentes suportes para transferência eletrônica em biossensores enzimáticos, embora nenhuma informação sobre o percentual de transferência eletrônica direta ou mediada seja investigado.

Através deste trabalho, busca-se explorar os diferentes parâmetros que ocasionam variações nas percentagens de TED e TEM/TED de um biossensor contendo HRP como material biológico, bem como efetuar os cálculos das mesmas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A interface eletrodo-solução

Ao investigar processos eletroquímicos interfaciais, essencialmente dois tipos de processos se destacam: (a) os processos capacitivos e (b) os processos faradáicos. De forma geral, o entendimento pormenorizado destes é fundamental para que os mesmos possam ser explorados adequadamente conforme desejado em uma aplicação específica.

Os processos capacitivos têm sido amplamente estudados mediante o desenvolvimento de modelos de interface eletrodo-solução para compreender os processos capacitivos que ocorrem quando as técnicas voltamétricas e amperométricas são empregadas. Na ausência de processos Faradáicos, a proporcionalidade entre o potencial aplicado e a carga elétrica desenvolvida devido à orientação de espécies na região interfacial é a capacitância desta camada.

Seguindo este preceito, o primeiro modelo para descrever o comportamento na interface eletrodo-solução foi sugerido por Helmholtz. Nele as cargas positivas e negativas estavam ordenadas de um modo rígido nos dois lados da interface, o que deu origem à designação de camada compacta. Este modelo também foi desenvolvido paralelamente por Perrin, e sua análise é análoga ao funcionamento de um capacitor de placas paralelas.

No entanto, este modelo não levava em consideração, as interações que ocorriam além da primeira camada de íons adsorvidos e não previa a variação da capacitância diferencial com o potencial, nem a dependência do potencial com a concentração.

Entre 1910 e 1913, Gouy e Chapman desenvolveram independentemente, um modelo de dupla camada onde considerava que o potencial e a concentração influenciavam a capacitância da dupla camada, assim, esta não seria compacta como na descrição de Helmholtz-Perrin, mas de espessura variável, estando os íons livres para se movimentarem. Este modelo, denominado de modelo de camada-difusa, apesar de não explicar integralmente os dados experimentais, foi a primeira contribuição na qual aspectos essenciais da interface eletrodo-solução foram considerados.

Em 1924, Stern combinou o modelo proposto por Helmholtz-Perrin, de camada compacta de íons com o de Gouy-Chapman, onde os íons estão dispersos na solução como uma nuvem em desordem térmica (Figura 1).^[1,2]

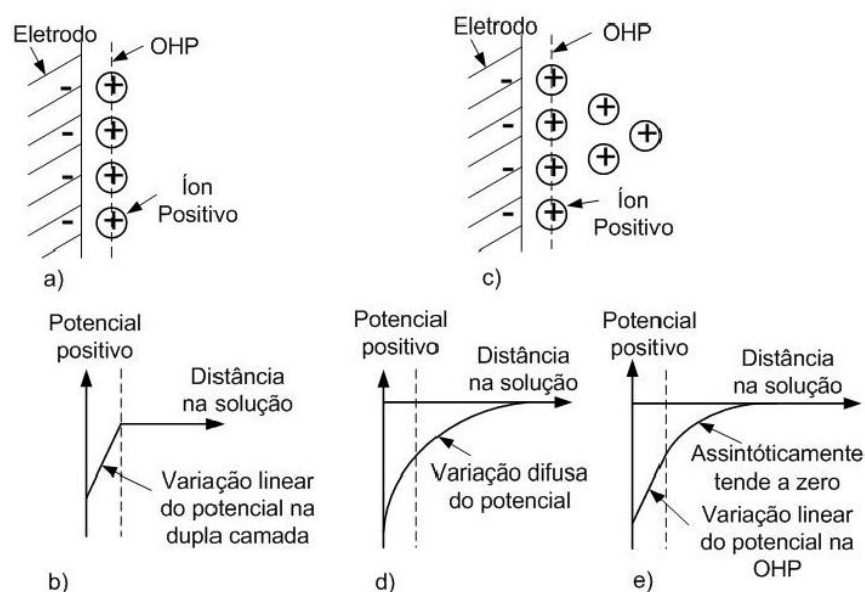


Figura 1 - Representação esquemática da dupla camada para um eletrodo carregado negativamente: **a)** e **b)** potencial elétrico desenvolvido segundo Helmholtz; **c)** e **d)** segundo Gouy-Chapman e **c)** e **e)** segundo Stern. ^[3]

Conforme pode ser observado na Figura 1, a reorganização de moléculas na interface eletrodo-solução induz o desenvolvimento de um potencial elétrico na interface, o que naturalmente induz também o desenvolvimento de uma corrente capacitiva no sistema.

Por outro lado, a necessidade atual de desenvolvimento de novas metodologias eletroanalíticas de detecção e quantificação de espécies em baixos níveis de concentração bem como o estudo de processos que ocorrem com desenvolvimento de pequena corrente elétrica tem exigido nas últimas décadas um tratamento específico na eliminação e/ou minimização dos efeitos indesejáveis da corrente capacitiva desenvolvida na interface eletrodo-solução.

2.2 Métodos eletroanalíticos

Os métodos eletroanalíticos fazem uso das propriedades elétricas mensuráveis, tais como corrente elétrica e cargas elétricas produzidas por uma espécie quando este é submetido a uma diferença de potencial entre eletrodos em uma cela eletroquímica. ^[4]

Essas propriedades elétricas podem então ser relacionadas com algum parâmetro químico intrínseco do analito, como por exemplo, sua concentração. Existe uma enorme

variedade de técnicas eletroanalíticas que têm sido utilizadas para várias aplicações, entre elas o monitoramento ambiental, o controle de qualidade de produtos e processos industriais e as análises biomédicas.

Os métodos eletroanalíticos oferecem uma série de vantagens tais como:

(i) seletividade e especificidade da determinação resultante da oxirredução das espécies analíticas de interesse em um potencial aplicado específico;

(ii) seletividade decorrente dos processos de oxirredução do analito em eletrodo de trabalho feito com material específico;

(iii) grande sensibilidade e baixos limites de detecção resultante das técnicas de pré-concentração e modos de aquisição de sinal que proporcionam ambiente com baixo sinal de fundo.

Todas estas vantagens são de extrema importância na confecção de biossensores e na formulação de diferentes métodos analíticos, uma vez que possibilitam tanto a diferenciação de espécies eletroativas, quanto a minimização de interferências durante as medidas.

2.2.1 Voltametria

A voltametria baseia-se na medida da corrente em uma célula eletroquímica composta por três eletrodos (um de trabalho, um de referência e um contra - eletrodo), condição na qual a velocidade de oxidação ou redução do analito é limitada pela velocidade de transferência de massa do analito para a superfície do eletrodo.^[5] Esta técnica tem sido amplamente empregada por químicos analíticos, inorgânicos, físico-químicos e bioquímicos para estudos fundamentais de processos de oxidação e redução em vários meios, processos de adsorção às superfícies e mecanismos de transferência de elétrons em superfícies modificadas de eletrodos.

O eletrodo de trabalho é onde ocorre a reação de interesse e pode ser composto de diferentes materiais, tais como carbono, ouro, prata, cobre, platina, níquel, paládio, etc. O eletrodo de referência permite o monitoramento do potencial do eletrodo de trabalho, sendo os mais utilizados o eletrodo saturado de calomelano e o Ag/AgCl. O eletrodo auxiliar atua no controle da corrente necessária para sustentar a eletrólise que ocorre no eletrodo de trabalho. Nesta situação, a corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, evitando que ocorram distúrbios (como eletrólise, por exemplo) no

eletrodo de referência. Neste dispositivo, o eletrodo de referência realizará o seu papel sem interferências, que é o de manter o seu potencial constante durante as medidas. Por isto pode-se usar além do eletrodo de trabalho e do auxiliar, um eletrodo de referência de dimensões pequenas, o que facilita o uso de recipientes voltamétricos de tamanho reduzido.

Na voltametria, a voltagem no eletrodo de trabalho varia sistematicamente enquanto a resposta de corrente é medida. Várias funções voltagem-tempo, chamadas sinais de excitação, podem ser aplicadas ao eletrodo. A mais simples delas é a varredura linear, na qual o potencial no eletrodo de trabalho muda linearmente com o tempo. Tipicamente, o potencial no eletrodo de trabalho varia em uma faixa de 1 ou 2 V. Outras formas de onda que podem ser aplicadas são as ondas pulsadas e triangulares.

As formas de onda dos quatro sinais de excitação mais comuns empregados na voltametria são mostradas na Figura 2. O sinal de excitação voltamétrico clássico corresponde à varredura linear, exposta na Figura 2-a, na qual uma tensão aplicada à célula aumenta linearmente em função do tempo. Então, a corrente que se desenvolve na célula é medida em função da voltagem aplicada.

Dois sinais de excitação do tipo pulso são apresentados na Figura 2b e 2c. As correntes são medidas em vários instantes durante o tempo de vida dos pulsos. Com a função de onda triangular mostrada na Figura 2d, o potencial varia linearmente entre um valor máximo e um valor mínimo. Esse processo pode ser repetido diversas vezes enquanto a corrente é registrada em função do potencial.

A voltametria cíclica tem encontrado aplicação considerável como uma ferramenta de diagnóstico que fornece informações acerca de mecanismos de reações redox realizadas sob várias condições.

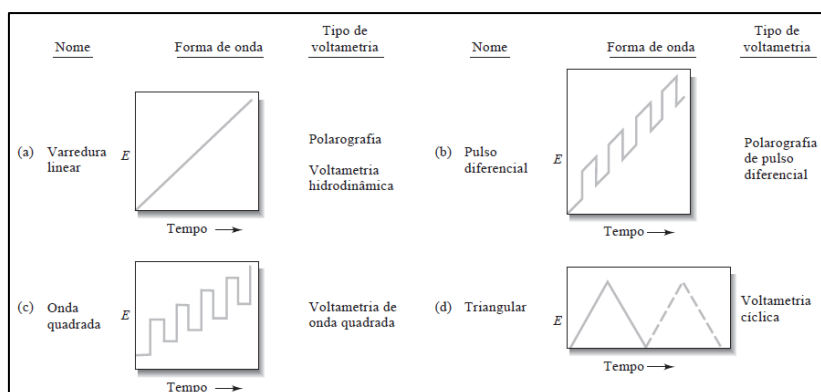


Figura 2 - Sinais de excitação de tensão versus tempos empregados na voltametria. [6]

2.2.1.1 Voltamogramas

A Figura 3 mostra um voltamograma de varredura linear típico para uma eletrólise envolvendo a redução de um analito A para formar o produto P em um eletrodo de filme de mercúrio.

Os voltamogramas de varredura linear obtidos sob condições de baixa velocidade de varredura (de poucos milivolts por segundo) geralmente têm a forma de uma curva sigmoidal chamada de onda voltamétrica.

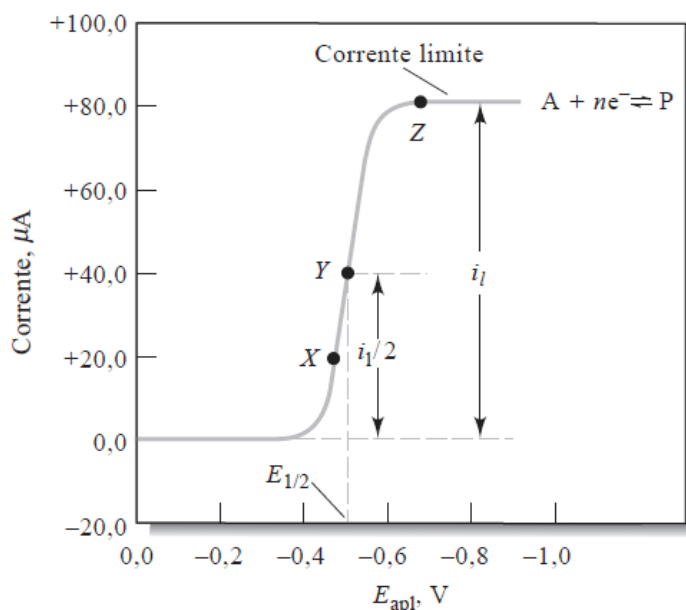


Figura 3 - Voltamograma de varredura linear. ^[7]

A corrente constante observada após o rápido aumento (ponto Z na Figura 3) é chamada corrente limite i_l , porque é limitada pela velocidade na qual o reagente é conduzido à superfície do eletrodo por processos de transporte de massa. Correntes limite geralmente são diretamente proporcionais às concentrações dos reagentes. A voltametria de varredura linear quantitativa baseia-se nessa relação.

Portanto, podemos escrever:

$$I_L = kC_A \quad (1)$$

onde C_A é a concentração do analito e k , uma constante.

O potencial no qual a corrente é igual à metade da corrente limite é denominado

potencial de meia-onda e tem o símbolo $E_{1/2}$. O potencial de meia-onda está aproximadamente relacionado com o potencial padrão para a semi-reação, mas geralmente não é idêntico a essa constante.

$$E_{1/2} = \frac{E_L}{2} \quad (2)$$

Algumas vezes os potenciais de meia-onda são úteis na identificação de componentes de uma solução. Para obter correntes limites reproduzíveis de maneira rápida, tanto a solução quanto o eletrodo precisam estar sob movimento reproduzível e constante ou um eletrodo gotejante de mercúrio deve ser utilizado.

A voltametria de varredura linear na qual a solução é agitada ou na qual o eletrodo permanece em rotação é conhecida como voltametria hidrodinâmica. A voltametria com o eletrodo gotejante de mercúrio é chamada polarografia.

No tipo de voltametria de varredura linear discutido até aqui, o potencial varia de forma suficientemente vagarosa e a transferência de massa é rápida de modo que um estado estacionário possa ser alcançado na superfície do eletrodo. Conseqüentemente, o transporte de massa do analito para o eletrodo apenas balanceia sua velocidade de redução no eletrodo. De maneira análoga, o transporte de massa para longe do eletrodo é igual a sua velocidade de produção na superfície do eletrodo.

Existe outro tipo de voltametria de varredura linear na qual velocidades de varredura rápidas (1 V/s ou mais) são empregadas em soluções não agitadas. Nesse tipo de voltametria, um sinal de corrente-tempo na forma de pico é obtido em razão da depleção do analito na solução próxima do eletrodo. A voltametria cíclica é um exemplo de um processo no qual as varreduras lineares diretas e inversas são aplicadas.

Na voltametria cíclica, os produtos formados na varredura direta podem ser detectados na varredura inversa se não foram removidos do eletrodo ou não foram alterados por uma reação química subsequente. A Figura 4 apresenta um exemplo de um voltamograma proveniente da voltametria cíclica.

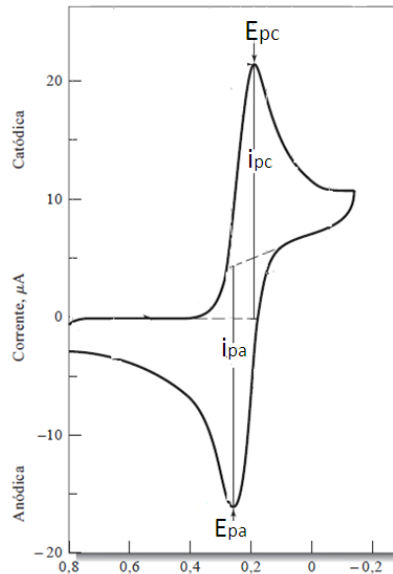


Figura 4 - Voltamograma proveniente de voltametria cíclica; onde os índices pa representa pico anódico e pc, pico catódico. [8]

2.2.2 Amperometria

A amperometria é um método eletroquímico que determina a concentração de uma solução, baseado na medida de intensidade de corrente de uma célula eletroquímica a um potencial fixo.

Como a intensidade de corrente depende principalmente do potencial do eletrólito e da concentração das substâncias eletroativas presentes em solução, a corrente limite torna-se proporcional à concentração do analito quando se aplica um potencial constante.

A corrente limite, ou corrente de difusão, pode sofrer variações de acordo com o meio em que o analito está disperso, dimensões do filme sobre o eletrodo de trabalho, e/ou velocidade de agitação da solução contida na célula e temperatura; uma vez que todos estes fatores influenciam na velocidade com que o analito se difunde em direção ao eletrodo. Deste modo, explorar essas diversas variáveis torna-se uma importante ferramenta para entender o processo de transferência eletrônica em diferentes tipos de sensores e biossensores. [9]

2.2.3 Voltametria e Amperometria hidrodinâmicas

A voltametria hidrodinâmica é realizada de várias formas. De forma geral, a solução é posta em agitação enquanto a mesma está em contato com um eletrodo fixo. Alternativamente, gira-se o eletrodo a uma velocidade elevada e constante na solução, fornecendo assim a ação de agitação (Figura 5).



Figura 5 - Montagem para realização de voltametria hidrodinâmica, onde (a) é a célula eletroquímica, (b) é o motor de rotação e (c) é o controlador de rotação.

Outra maneira de se realizar a voltametria hidrodinâmica consiste em permitir que a solução contendo o analito flua através de um tubo no qual o eletrodo de trabalho é montado. Essa última técnica está se tornando amplamente empregada na detecção de analitos oxidáveis ou reduzíveis à medida que eles deixam uma coluna de um sistema cromatográfico líquido.

De forma geral, durante a eletrólise o reagente pode ser transportado para a superfície do eletrodo por meio de três mecanismos: (1) migração sob a influência de um campo elétrico, (2) convecção resultante de agitação ou vibração e (3) difusão em razão de qualquer diferença de concentração entre a superfície do eletrodo e o seio da solução. Na voltametria, todo o esforço é feito para minimizar o efeito da migração pela introdução de um excesso de um eletrólito de suporte inerte. Quando a concentração do eletrólito de suporte excede a do analito por um fator de 50 a 100 vezes, a fração da corrente total carregada pelo analito se aproxima de zero. Como resultado, a velocidade de migração do analito para o eletrodo de carga oposta torna-se essencialmente independente do potencial aplicado.

A técnica de Eletrodo de Disco Rotativo (EDR) é um dos poucos sistemas para o qual as equações hidrodinâmicas bem como a equação de difusão-convecção têm sido rigorosamente resolvidas. Para esta técnica, um eletrodo é confeccionado de forma a encaixar-se a um motor que controla o número de revoluções por segundo (ou por minuto), ou seja, a frequência de rotação do eletrodo, f . De forma geral, é comum descrever a velocidade de rotação do eletrodo em termos de velocidade angular, ω (onde $\omega=2\pi f$).

Assim sendo, o problema residual ao aplicar técnicas hidrodinâmicas consiste em resolver a equação de difusão-convecção cuja solução é conhecida como equação de Levich:

$$I_L = 0,62nFAD_o^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}C_o^* \quad (3)$$

onde n é o número de elétrons transferidos, F a constante de Faraday, A a área do eletrodo, D_o é o coeficiente de difusão da espécie de interesse, ν é a viscosidade cinemática do meio e C_o^* a concentração da espécie.

Tendo em vista que a Equação de Levich é aplicável a processos controlados totalmente por transporte de massa, do ponto de vista da equação de Levich devemos ter uma relação linear entre a corrente limite e a raiz da velocidade de rotação do eletrodo. Contudo, do ponto de vista prático, o que se observa acima de uma determinada velocidade de rotação do eletrodo é que há um desvio do comportamento de Levich tal que a corrente independe da velocidade de rotação do eletrodo.

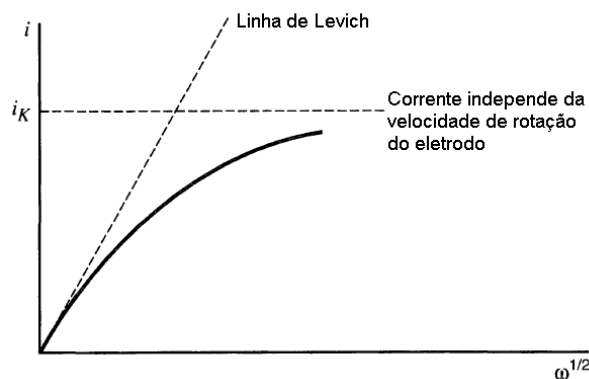


Figura 6 - Variação da corrente com a raiz da velocidade de rotação do eletrodo a potencial constante.

O desvio da linearidade na curva indica uma limitação cinética devido a cinética de transferência eletrônica na interface eletrodo-solução tal que a corrente total do sistema assume a forma ^[10]:

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{I_k} + \frac{1}{I_L} \quad (4)$$

onde I_k representa a corrente cinética referente à transferência de carga.

Neste sentido, o principal aspecto a ser desenvolvido neste trabalho para avaliar a cinética de transferência eletrônica é aplicar adequadamente as expressões para cinética de transferência eletrônica direta e mediada para a enzima HRP ^[11] Com base no mecanismo de ação enzimática sobre peróxido de hidrogênio diretamente com consequente redução da Enzima diretamente sobre o eletrodo de trabalho (Transferência eletrônica Direta) e ação enzimática sobre peróxido de hidrogênio com redução via compostos fenólicos (Transferência Eletrônica Mediada) é possível obter expressões para corrente cinética de transferência eletrônica direta e mediada ocorrendo simultaneamente e apenas direta. Tendo em vista que os compostos fenólicos entram no ciclo catalítico da enzima HRP, é possível também explorar esta enzima na detecção destes.

2.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são encontrados na composição de diversos materiais e/ou substâncias que temos contato em nosso dia-a-dia, podendo ainda ser usados na fabricação de resinas fenólicas na indústria plástica, na indústria metalúrgica como agente de limpeza de ferro e aço, como solvente seletivo para refinação de óleos lubrificantes, reativo de sínteses orgânicas (ácido salicílico, fenolftaleína, ácido pícrico, anidridos orgânicos, benzeno, cloro-fenol, cicloexanol e diversas drogas farmacológicas).

A importância da determinação destes compostos é reconhecida mundialmente devido ao grande interesse ambiental, alimentício e clínico, já que estes compostos agem de diversas formas dependendo de sua concentração. ^[12]

Outro fato que chama a atenção é que muitos compostos fenólicos são tidos como tóxicos para plantas e animais, pois penetram facilmente em membranas celulares

e na pele. Tais compostos podem afetar as velocidades das reações biocatalisadas nos processos de respiração e fotossíntese. [13]

Nas últimas décadas as principais técnicas para o monitoramento de espécies fenólicas têm sido realizadas por meio de métodos espectrofotométricos e cromatográficos. [14] Contudo, tais técnicas exigem um grande volume de amostras bem como a derivatização da mesma e apresentam elevado custo por análise.

Uma alternativa para a minimização destes problemas é o uso de técnicas eletroanalíticas, uma vez que as mesmas necessitam de pequena quantidade de amostras e apresentam baixo custo por análise. Entre tais técnicas, os métodos amperométricos com uso de biossensores têm ganhado destaque como uma alternativa para a determinação e quantificação de substâncias que empregavam métodos analíticos relativamente caros e com tempos prolongados na preparação das amostras. Assim, a importância no desenvolvimento de biossensores está em sua seletividade; baixo custo de construção, potencial para miniaturização e construção de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento rápido de espécies. [15]

2.4 Biossensores

Segundo FATIBELLO, um biossensor pode ser definido como um sensor que utiliza um material biológico (enzimas, anticorpos, antígenos, DNA, etc.) imobilizado a um transdutor que irá converter um sinal biológico em um sinal mensurável. Tal aparato encontra-se esquematizado na figura a seguir:

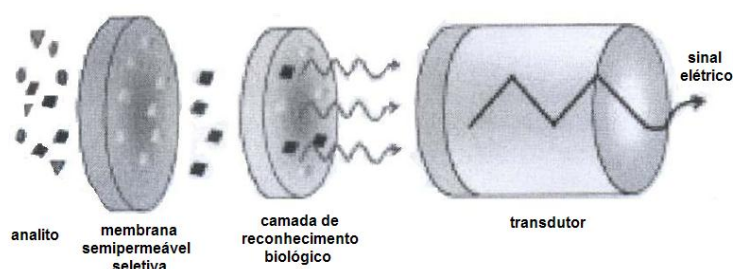


Figura 7 - Representação esquemática de um biossensor. [16]

A utilização de um elemento biológico permite fazer uso da seletividade única das biomoléculas para as espécies alvo, fazendo com que ocorra uma significativa diminuição na leitura de interferentes. O sinal traduzido no biossensor é resultante da

reação entre o material de bio-reconhecimento e o analito alvo (por oposição ao sinal obtido num eletrodo clássico que provém diretamente da reação do analito com este).

Para se obter um biossensores é necessário conseguir elevados níveis de seletividade, boa estabilidade nas condições de operação (temperatura, pH, força iônica, etc.) e também nas condições de armazenamento, bem como retenção de atividade biológica, resposta em tempo útil, precisa e reprodutível.

Para a melhora da sensibilidade dos biossensores e eletrocatalise do processo, eletrodos são modificados com filmes de biomoléculas ^[17], nanopartículas ^[18] e polímeros condutores. ^[19] Os polímeros condutores e nanomateriais têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento destes sensores devido à versatilidade de suas propriedades físicas e químicas. ^{[20][21]} Neste sentido, um aspecto fundamental para o desenvolvimento de um sensor e/ou biossensor é explorar adequadamente o ciclo catalítico da enzima.

Estes tipos de modificação tem apresentado uma excelente estabilidade frente a uma ampla faixa de potenciais de trabalho, e também fornece um microambiente favorável para a atividade biocatalítica das enzimas, pois as monocamadas auto-organizadas formadas podem simular membranas biológicas, aproximando o sistema das condições conformacionais ótimas observadas nos ambientes biológicos originais.

Várias enzimas têm sido utilizadas em biossensores para determinar analitos de interesse clínico e ambiental. O acoplamento eletrônico entre as enzimas e o eletrodo nos biossensores pode ser realizado através de diferentes mecanismos:

- (i) Pela eletroatividade do substrato ou produto enzimático (biossensores de primeira geração);
- (ii) Pelo auxílio de mediadores, livres em solução ou imobilizados juntamente com a enzima (biossensores de segunda geração) e, finalmente,
- (iii) Pela transferência eletrônica direta entre a superfície do eletrodo e o centro ativo da enzima (biossensores de terceira geração).

A sensibilidade dos biossensores de primeira geração pode ser muito incrementada, pois o método de imobilização utilizado em sua construção possui um efeito positivo na densidade, ambiente e disposição dos elementos biologicamente ativos, o que não ocorre de forma tão eficiente nos outros tipos. Neste sentido, devido à

simplicidade e versatilidade dos biossensores de primeira geração este foi o tipo de biossensor utilizado neste trabalho.

Em relação aos biossensores de segunda geração, monocamadas contendo grupos eletroativos (mediador) fornecem uma possibilidade para estudar a transferência eletrônica a “longa distância” via o contato elétrico entre o elemento biocatalítico, o mediador e a superfície do eletrodo. Um pré-requisito fundamental para o desenvolvimento de biossensores de terceira geração é o controle do processo de transferência de elétrons entre o sistema biocatalítico de reconhecimento e a superfície dos eletrodos. Esta transferência eletrônica depende, dentre vários fatores, da natureza do elemento biológico (somente um grupo reduzido de enzimas e proteínas apresenta esta propriedade) e da distância e orientação do centro de óxido-redução em relação à superfície do eletrodo. Logo a seguir encontra-se um quadro comparativo entre os biossensores de diferentes gerações quanto ao mecanismo reacional.

<i>Classificação do biossensor</i>	<i>Representação esquemática</i>
1ª geração	
2ª geração	
3ª geração	

Figura 8 - Quadro comparativo da representação esquemática do mecanismo reacional de biossensores de diferentes gerações.

2.5 Biossensores amperiométricos para fenóis

Fenóis podem ser determinados amperiométricamente através de uma oxidação eletroquímica direta, contudo, neste processo podem ocorrer inúmeras reações paralelas que levam à formação de produtos poliméricos que inativam a superfície do eletrodo.

Biossensores amperiométricos podem minimizar estes obstáculos na determinação de fenóis, uma vez que operam com um baixo potencial aplicado em relação a um eletrodo de referência, onde se mede a corrente gerada pela reação biocatalisada de oxidação ou redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo, que de um modo geral, processam-se em potenciais ao redor de 0 V vs Ag/AgCl ou ECS.^[22] Nesse potencial, a contribuição de espécies interferentes (aquelas que são facilmente oxidadas ou reduzidas) é minimizada, o que pode ser visto na Figura abaixo:

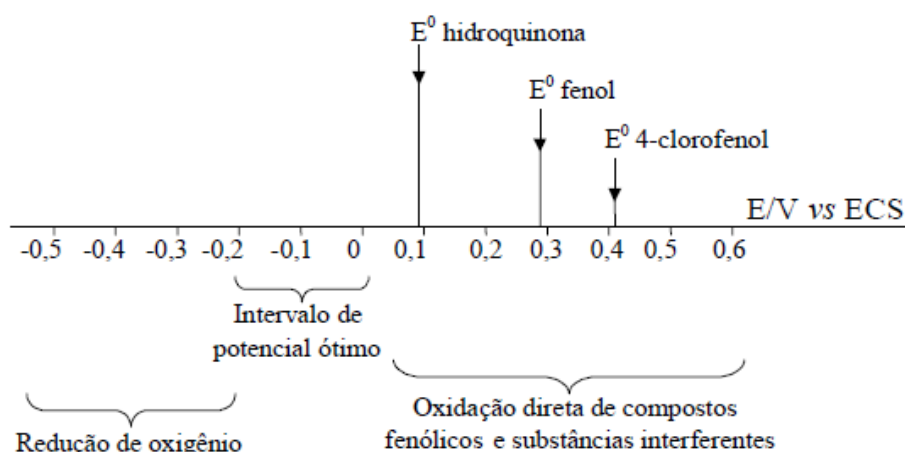


Figura 9 - Intervalo de potencial ótimo para a operação de biossensores amperio métricos e o intervalo de oxidação direta de compostos fenólicos.^[23]

Os sensores amperiométricos são mais rápidos, mais sensíveis e precisos do que os potencio métricos, pois não é necessário esperar que o equilíbrio termodinâmico seja obtido, e, além disso, mantém uma resposta linear em uma grande faixa de concentração do analito.

Dentre os principais materiais utilizados como base para esses tipos de eletrodo encontram-se o carbono vítreo, grafite pirolítico, pasta de carbono e grafite compósito, podendo ainda ter suas superfícies modificadas com enzimas redox, tais como tirosinase, lacase e peroxidase .

2.6 Imobilização de enzimas em biossensores

A imobilização do componente biológico em um biossensor é a etapa mais crítica, uma vez que o mesmo deve manter suas características físicas e químicas para que não haja a interferência de compostos indesejáveis. Contudo, quem vai garantir a

estabilidade do composto biológico, vai ser o material de suporte e para que isso ocorra, ele deve ter características tais como: ser insolúveis em água, alta capacidade de se ligar à enzimas, apresentar-se quimicamente inerte e mecanicamente estável.^[24]

As características das enzimas são os principais limitantes da escolha do método de imobilização, uma vez que dependendo do tipo de ligação, o material suporte e o método para imobilização pode ocorrer uma grande variação no pH ótimo reacional, velocidade máxima de reação e na sensibilidade do biossensor. Essas limitações podem ser minimizadas através da combinação de diferentes métodos de imobilização e a adição de alguns compostos bi ou multifuncionais ao modificador. Um exemplo clássico é o uso do glutaraldeído tanto para a imobilização como para a estabilização de enzimas imobilizadas por adsorção ou oclusão.^[25] Logo a seguir serão explicitadas as vantagens e desvantagens dos principais métodos de imobilização de compostos biológicos sobre materiais de suporte.

Tabela 1 - Procedimentos de imobilização de biomoléculas em sensores.^[26]

Tipo de Imobilização	Vantagens	Desvantagens
Adsorção	<ul style="list-style-type: none"> - simples; - realizados em condições brandas; - menos destrutiva para o material biológico. 	<ul style="list-style-type: none"> - ligações das biomoléculas são dependentes do pH, solvente e temperatura; - alta taxa de lixiviação para a solução, comprometendo a estabilidade do sistema.
Ligação Covalente	<ul style="list-style-type: none"> - complexo estável biomolécula-substrato; - lixiviação das moléculas é minimizada; - maior sensibilidade. 	<ul style="list-style-type: none"> - procedimentos mais laboriosos com consumo de tempo; - possibilidade de perda da atividade biológica do material.
Ligação Covalente Cruzada	<ul style="list-style-type: none"> - procedimento simples; - forte ligação química das biomoléculas. 	<ul style="list-style-type: none"> - dificuldade de controle da reação; - pode ocorrer falta de rigidez da superfície

2.6.1 Adsorção

Este é o método de imobilização mais simples e baseia-se em colocar uma solução do composto biológico em contato físico com um material adsorvente, ou uma dispersão do mesmo, por um período de tempo. Passado esse período, se interrompe o contato físico e lava-se a superfície para se retirar o material que não foi adsorvido.

As enzimas podem ser adsorvidas diretamente sobre o material de eletrodo ou sobre suportes orgânicos ou inorgânicos tais como: alumina, carvão, argila, celulose, sílica, gel, vidro e colágeno. Tal fato deve-se a mecanismos de troca iônica ou por simples adsorção física, usualmente fraca, ocorrendo via formação de ligações de Van Der Waals, como as ligações de hidrogênio; ou adsorção física e química envolvendo ligações covalentes. [27]

Contudo, a adsorção enzimática e a manutenção de sua atividade em um material de suporte é dependente do pH, natureza do solvente utilizado, concentração da enzima e do adsorvente, e temperatura; sendo o conhecimento e o controle deste fatores indispensáveis para a montagem de um biossensor.

Sabe-se que a simples adsorção da enzima na superfície de eletrodos leva a uma baixa estabilidade operacional, necessitando assim da união de outro método de imobilização, tal como a ligação cruzada com glutaraldeído ou a introdução de um filme ou membrana para evitar a perda do material biológico em meio aquoso. [28]

2.6.2 Ligação covalente

A ligação covalente é formada através dos grupos funcionais da enzima, proporcionando uma maior estabilidade ao biossensor. [27] É importante que os aminoácidos essenciais para a atividade catalítica da enzima não sejam envolvidos na ligação covalente ao suporte, uma vez que a presença da mesma causa a perda da atividade enzimática. Este problema pode ser prevenido se a enzima for imobilizada na presença do seu substrato como forma de proteção de seu sítio ativo. [29]

2.6.3 Ligação covalente cruzada

Este procedimento consiste na formação de uma rede polimérica ou partículas macroscópicas entre as moléculas da enzima ou entre as moléculas do suporte com os

reagentes funcionais. Esta nova organização molecular permite a enzima uma maior estabilidade aos efeitos gerados pelo pH, força iônica, diferentes solventes e temperatura.^[30] Porém, muitas vezes são gerados problemas difusionais devido a danos gerados as enzimas, fazendo com que na maioria das vezes este método de imobilização seja utilizado em conjunto com os demais métodos.^[31]

2.7 Biossensores a base de peroxidases e as vias de transferência eletrônica

O uso de enzimas óxido-redutases como modificadores tem sido muito comum na construção de biossensores amperiométricos porque as mesmas catalisam uma reação química redox, envolvendo uma etapa de transferência eletrônica de seu próprio ciclo natural. A enzima horseradish peroxidase (HRP) catalisa a oxidação de uma variedade de compostos inorgânicos e orgânicos na presença de peróxido de hidrogênio através de seu sítio ativo protoporfirínico, como pode ser visto na Figura 10.

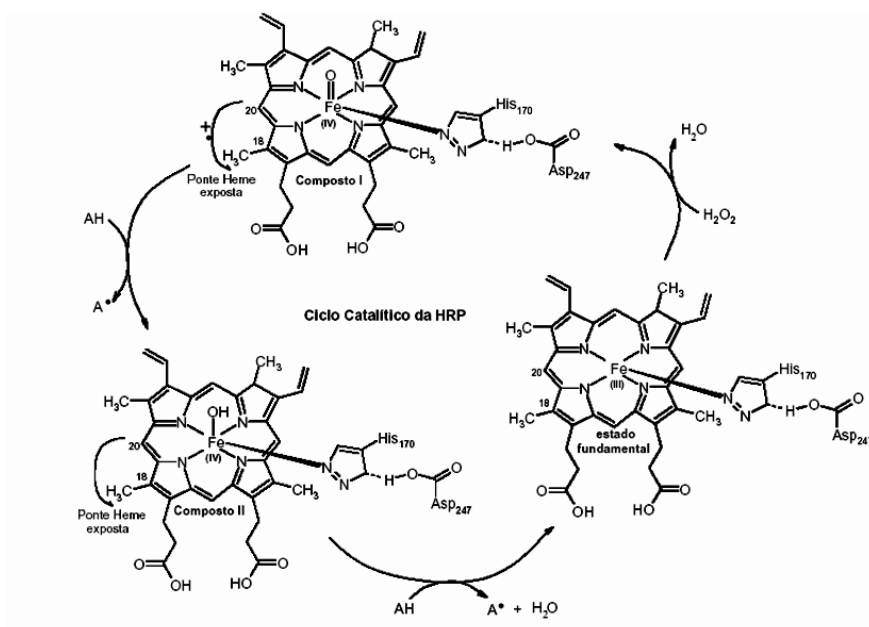
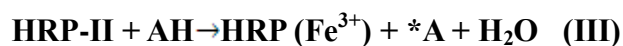
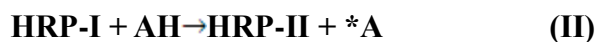


Figura 10 - Mecanismo geral do ciclo catalítico da HRP na presença de H_2O_2 (agente oxidante). AH representa o substrato redutor e A^\bullet o radical formado.^[32]

O ciclo catalítico das peroxidases pode ser descrito através das seguintes equações:



onde HRP-I e HRP-II são intermediários oxidados da enzima, AH é o substrato redutor e *A é um radical livre.

Na primeira etapa, a enzima reduz o peróxido formando um composto oxidado intermediário (HRP-I) de elevado estado de oxidação. A forma oxidada da enzima é então, reduzida à sua forma nativa em duas etapas, sendo que em cada etapa uma substância orgânica é oxidada, podendo este processo ocorrer de forma direta ou mediada.

Na transferência de elétrons direta (TED) as formas oxidadas da enzima são reduzidas por elétrons doados do próprio eletrodo. Já na transferência mediada (TEM), a enzima recebe elétrons de substâncias doadoras (AH₂), que podem ser fenóis, amins aromáticas, ou ferrocenos.

Na presença de uma substância doadora de elétrons a enzima é regenerada e as espécies *A formadas são reduzidas eletroquimicamente no eletrodo, resultando em uma corrente de redução proporcional à concentração da substância doadora.

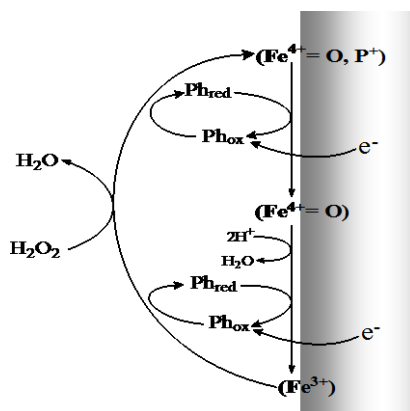


Figura 11 - Mecanismo de transferência de elétrons mediada por fenol em eletrodos modificados com peroxidase. **Ph_{ox}** e **Ph_{red}** são as formas oxidada e reduzida do mediador, respectivamente. **P+** = radical protoporfirina [33]

Desta forma os fenóis, tais como a dopamina, podem atuar como doadores de elétrons na reação da peroxidase com peróxidos, sendo este o princípio da utilização de eletrodos modificados com peroxidase para a detecção de espécies fenólicas em células eletroquímicas. [34]

A sensibilidade dos biossensores a base de peroxidase para a determinação de fenol é limitada pela corrente produzida pela transferência de elétrons direta entre a enzima e o eletrodo na presença apenas de peróxido, sendo interessante uma diminuição neste processo para aumentar a sensibilidade do biossensor para fenol. Neste sentido, o estudo da cinética de TED e TEM da HRP sobre novos materiais de eletrodo é fundamental para se aperfeiçoar os biossensores enzimáticos.

Estudos demonstraram a possibilidade de utilizar os eletrodos de grafite sólido e de pasta de carbono modificados com HRP para a determinação de fenóis e compostos relacionados.

Neste contexto, os nanotubos de carbono (NTC) têm surgido como uma nova classe de nanomateriais que têm despertado considerável interesse nos últimos anos, apresentando-se como um novo tipo de estrutura finita de carbono com morfologia tubular e dimensões nanométricas, possui propriedades físicas e químicas únicas. Sabe-se que os nanotubos de carbono foram sintetizados pela primeira vez em 1991^[35] através do processo de pirólise de grafite em plasma sob atmosfera controlada de hélio. Contudo, em 1889, numa patente norte-americana, já se relatava que filamentos de carbono poderiam ser formados a partir de hidrocarbonetos, em cadinhos de metal em altas temperaturas.^[36]

Estes materiais têm sido comumente utilizados na preparação de modificadores de superfícies de eletrodos devido à sua elevada área superficial, alta condutividade elétrica e estabilidade química, que quando em conjunto com as outras espécies modificadoras potencializam a detecção dos mais diversos analitos.^[37]

A modificação de eletrodos com estes materiais tem proporcionado o desenvolvimento de sistemas com propriedades químicas melhoradas, proporcionando uma maior sensibilidade e seletividade para os métodos analíticos desenvolvidos. Essas características têm sido melhoradas quando se adsorve sobre a superfície dos nanotubos de carbono substâncias eletrocatalisadoras.

Neste sentido, tem-se verificado o grande emprego dos materiais biológicos, como é o caso das enzimas, as quais tem proporcionado uma alta seletividade aos sistemas desenvolvidos. Assim os estudos relacionados a transferência eletrônica direta e mediada destas substâncias tem foco de grande interesse.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos:

Nos estudos conduzidos neste trabalho, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança analítica modelo AY220 (SHIMADZU);
- Rotatório Modelo AFMSRCE (PINE);
- Potenciostato Modelo 128N (AUTOLAB);
- Estufa para esterilização e secagem Mod. EL - 1.2 (ODONTOBRÁS).

3.2 Materiais e reagentes:

- Eletrodo de carbono vítreo;
- Eletrodo auxiliar: fio de platina;
- Eletrodo de referência de Ag/AgCl;
- Célula eletroquímica com capacidade para 20 ml;
- Azul de meldola;
- Dopamina;
- HRP Tipo VI (EC 1.11.17);
- Nanotubo de Carbono de Paredes Múltiplas (NTCPM);
- Glutaraldeído;
- Peróxido de hidrogênio;
- Gás Nitrogênio;
- Fosfato de sódio monobásico.

3.3 Preparação do nanotubo de carbono modificado com azul de meldola (NTCPM/MB)

Inicialmente pesou-se 2 g de NTCPM e 4 g de azul de meldola. Adicionou-se as duas massas a 1 ml de água destilada e deixou-se em repouso por 48 horas. Passado o período de tempo adicionou-se mais 100 mg de NTCPM à dispersão e filtrou-se. A massa de NTCPM/MB foi seca em estufa a 45°C por 24 horas e, posteriormente, armazenada em recipiente plástico.

3.4 Estudos de imobilização da enzima em eletrodos de carbono vítreo

Inicialmente foram preparados diferentes modificadores, variando-se a quantidade de HRP, tampão fosfato pH 7, NTCPM/MB, para se avaliar a aderência do modificador sob o eletrodo. Logo após foram testadas as condições de temperatura para modificação do eletrodo.

3.5 Estudos dos parâmetros cinéticos do eletrodo modificado com a enzima (NCTPM/HRP) em presença de peróxido

Realizou-se estudos baseados nas técnicas de voltametria cíclica, voltametria hidrodinâmica e cromoamperometria com diferentes concentrações de H_2O_2 ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$; $200 \mu\text{mol L}^{-1}$; $300 \mu\text{mol L}^{-1}$; $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $500 \mu\text{mol L}^{-1}$) em meio fosfato, variando-se a velocidade de rotação do eletrodo de carbono vítreo para se obter os parâmetros cinéticos envolvidos na transferência eletrônica direta do eletrodo para a enzima, bem como se avaliar a resposta em função da concentração de peróxido.

3.6 Estudos dos parâmetros cinéticos do eletrodo modificado em presença de dopamina

Foram realizados estudos semelhantes aos do tópico 3.5 para o eletrodo de carbono vítreo modificado, porém fixando-se o volume de peróxido em $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ e variando-se a concentração de dopamina na célula eletroquímica ($0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $200 \mu\text{mol L}^{-1}$), para se obter as porcentagens de transferência eletrônica mediadas para a enzima.

3.7 Cálculos das porcentagens de TED e TEM

Através da razão dos coeficientes angulares das curvas de Koutecky-Levich para redução de peróxido na superfície do eletrodo modificado na presença e na ausência de dopamina, respectivamente, obtém-se a porcentagem de TED. Fazendo-se o cálculo diminuindo-se esta porcentagem obtida do total de porcentagem de transferência eletrônica, tem-se a porcentagem de TEM/TED.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Redução de Peróxido de Hidrogênio sobre Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas e a Enzima HRP.

Inicialmente foram conduzidos voltamogramas de varredura linear para o eletrodo modificado com NTCPM/HRP sob diferentes velocidades de rotação do eletrodo em tampão fosfato, pH 7, e uma concentração de peróxido de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 12). Este estudo produz duas informações de extrema importância relacionadas à viabilidade dos estudos de quantificação da TEM e TED: (1) a corrente de redução do peróxido de hidrogênio é proporcional à velocidade de rotação do eletrodo e (2) o eletrodo modificado apresenta estabilidade mesmo sob condições hidrodinâmicas.

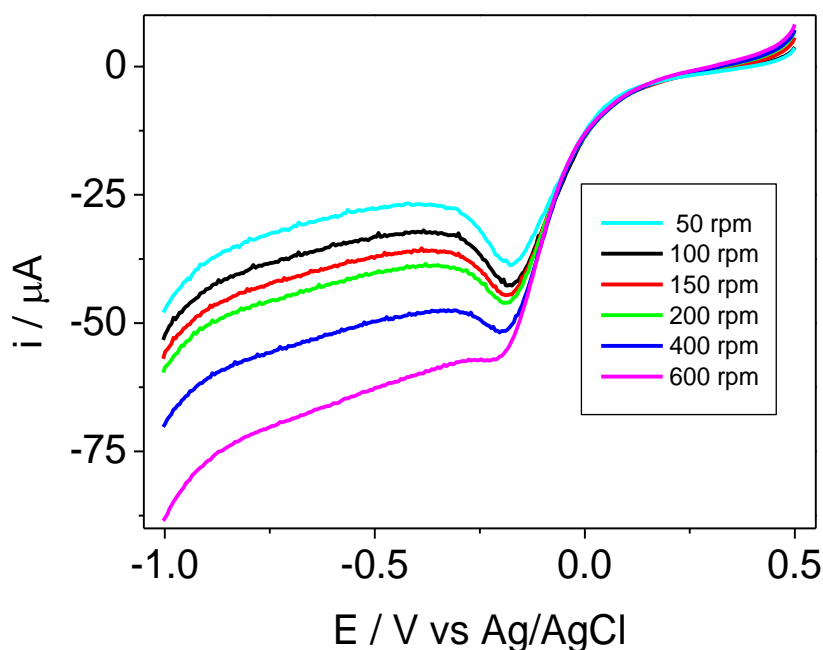


Figura 12 - Voltamogramas de varredura linear para eletrodo de carbono vítreo modificado com NTCPM/HRP em $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 em diferentes velocidades de rotação do eletrodo.

Sob condições de controle por transporte de massa a solução da Equação de Difusão-Convecção (Equação 5) mostra que a corrente limite é proporcional à concentração de seio de solução, C_o^* , bem como à raiz quadrada da velocidade de

varredura do eletrodo, $\omega^{1/2}$ conforme estabelecido pela bem conhecida Equação de Levich:

$$i_{l,c} = 0,62nFAD_0^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}C_0^* \quad (5)$$

onde n representa o número de elétrons da reação, F é a constante de Faraday ($C\text{ mol}^{-1}$), A é a área do eletrodo, D_0 o coeficiente de difusão da espécie eletroativa na forma oxidada (cm^2s^{-1}), ν é a viscosidade cinemática do meio (cm^2s^{-1}), C_0^* é a concentração da espécie eletroativa na forma oxidada, $i_{l,c}$ é a corrente limite catódica (corrente de redução) e ω representa a velocidade angular de rotação do eletrodo.

Para a oxidação, a corrente anódica limite está relacionada à velocidade angular pela expressão:

$$i_{l,a} = -0,62nFAD_R^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}C_R^* \quad (6)$$

onde D_R é o coeficiente difusional da espécie eletroativa na forma reduzida, C_R^* é a concentração da espécie eletroativa na forma reduzida e $i_{l,a}$ é a corrente limite anódica. Os demais símbolos tem seus significados usuais como citado anteriormente no processo catódico.

Por outro lado, em condições nas quais o gradiente de concentração não é máximo, ou seja, quando a concentração de superfície da espécie oxidada ou reduzida não são extremamente pequenas ($C_0(y=0) \rightarrow 0$ ou $C_R(y=0) \rightarrow 0$) as correntes desenvolvidas obtidas de acordo com as seguintes expressões:

$$i = i_{l,c} \left[\frac{C_0^* - C_0(y=0)}{C_0^*} \right] \quad (7)$$

e

$$i = i_{l,a} \left[\frac{C_R^* - C_R(y=0)}{C_R^*} \right] \quad (8)$$

Nestes casos, para um processo Nernstiano, a combinação das equações de corrente elétrica à equação de Nesnst gera a equação de onda voltamétrica:

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(i_{l,c} - i)}{(i - i_{l,a})} \quad (9)$$

onde,

$$E_{1/2} = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_R}{D_O} \right)^{2/3} \quad (10)$$

Ao se observar a equação de onda voltamétrica fica evidente que a forma da onda voltamétrica independe da velocidade angular de rotação do eletrodo. Ou seja, já que i_l varia com $\omega^{1/2}$, a corrente elétrica, i , deve variar com a raiz da velocidade de rotação do eletrodo em qualquer potencial elétrico aplicado.

Contudo, o que se observa na prática, para a maioria das reações de eletrodo investigadas por EDR é que a relação entre corrente elétrica e a raiz quadrada da velocidade angular de rotação do eletrodo não é linear, uma vez que há um desvio da relação entre i_L e $\omega^{1/2}$ de forma que a corrente apresenta-se independente da velocidade de rotação do eletrodo. Em tal circunstância, a corrente elétrica é denominada corrente cinética, i_k , e expressa a corrente na ausência de qualquer efeito de transporte de massa.

Ou seja, esta é a corrente elétrica que deverá fluir sob limitação cinética caso o transporte de massa seja eficiente suficientemente para manter a concentração na superfície tão elevada quanto à concentração no seio da solução.

Claramente, $\frac{i}{\omega^{1/2}}$ C deve ser constante se i_k é elevado, bem como o gráfico i vs $\omega^{1/2}$ deve ser curvado e tender a um valor limite $i = i_k$ quando $\omega^{1/2} \rightarrow \infty$. Conseqüentemente, o gráfico $1/i$ vs $1/\omega^{1/2}$ deve ser linear e pode ser extrapolado para $\omega^{-1/2} = 0$ permitindo obtermos i_k^{-1} .

Neste contexto, a corrente de redução do peróxido de hidrogênio sobre um eletrodo modificado com a enzima HRP pode ser limitado pelo transporte de peróxido para a superfície do eletrodo e/ou pela cinética de transferência eletrônica da reação enzimática. A corrente medida, i , é uma combinação da corrente limitada pelo transporte de massa, i_l , e a corrente limitada pela cinética do processo, i_k , de acordo com a equação de Koutecky-Levich:

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{i_k} + \frac{1}{i_{l,c}} = \frac{1}{i_k} + \frac{1}{0,62nFAD_0^{2/3} \omega^{1/2} \nu^{-1/6} C_0^*} \quad (11)$$

onde todos os termos tem seus significados usuais.

Na Figura 13 são apresentados amperogramas sob diferentes velocidades de

rotação do eletrodo ($\omega = 0, 100, 200, 400, 600$ e 900 rpm) na presença de $200 \mu\text{molL}^{-1}$ de H_2O_2 . Conforme pode ser observado, à medida que a velocidade de rotação do eletrodo aumenta há uma maior corrente catódica referente à redução do peróxido de hidrogênio.

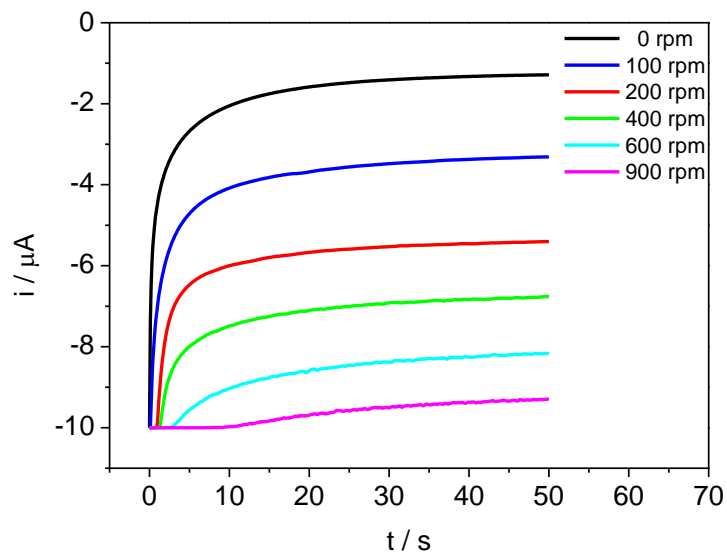
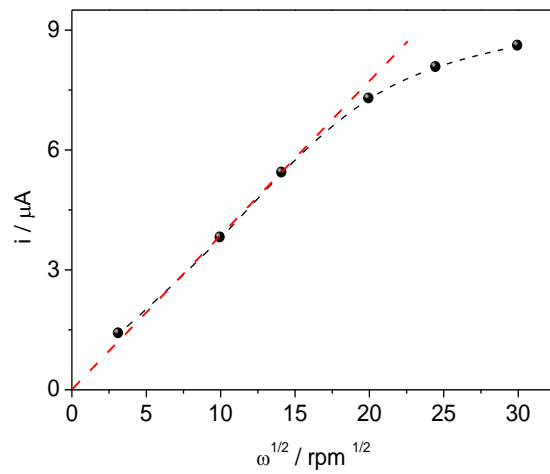
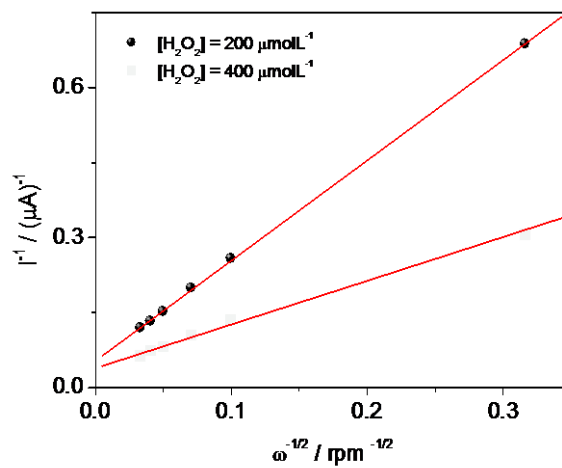


Figura 13 - Medidas de Amperometria com eletrodo de disco rotatório modificado com NTCPM/HRP em $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 em diferentes velocidades de rotação do eletrodo. Experimento realizado em tampão fosfato $0,1\text{M}$, pH 7.

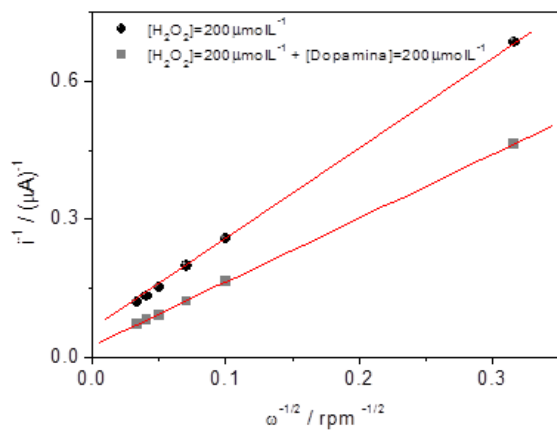
Neste sentido, foram plotados os gráficos de Levich e Koutecky-Levich (Figura 14) com o propósito de se avaliar a existência de controle cinético no experimento realizado.



(a)



(b)



(c)

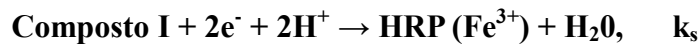
Figura 14 - (a) Gráfico de Levich referente aos dados da Figura 12, (b) Gráfico de Koutecky-Levich para redução de peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações e (c) Gráfico de Koutecky-Levich para redução de peróxido de hidrogênio na ausência e presença de dopamina. Experimento realizado em tampão fosfato 0,1 M pH 7.

O comportamento linear obtido nas Figuras 14b e 14c estão em concordância com a Equação de Koutecky-Levich, de forma que é possível extrair os parâmetros cinéticos para a transferência eletrônica direta e direta-mediada:

$$\mathbf{i}^{-1} = \mathbf{i}_k^{-1} + \mathbf{i}_L^{-1} \quad (12)$$

onde i_k e i_L ($i_L = 0,62nFAD^{2/3}\omega\nu^{-1/6}c^*$) representam as correntes cinética e difusional, respectivamente.

A análise dos dados foi conduzida explorando duas abordagens diferentes: (i) Mecanismo de transferência eletrônica direta e (ii) mecanismo de transferência eletrônica direta e mediada ocorrendo simultaneamente. Na primeira abordagem a redução de peróxido é conduzida pela enzima e a redução do sítio ativo da enzima ocorre diretamente sobre o eletrodo conforme a seguir:



onde k_1 e k_s representam as constantes de velocidade referente às etapas 1 e 2, respectivamente. (k_s representa a velocidade de transferência eletrônica entre as formas oxidadas da enzima e a superfície do eletrodo).

A velocidade de ocorrência da oxidação do estado nativo da HRP, a qual é equivalente à redução de peróxido de hidrogênio, é dado pela primeira das duas reações apresentadas anteriormente:

$$\begin{aligned} \mathbf{v} &= - \frac{\mathbf{d [H_2 O_2]}}{\mathbf{dt}} \\ &= \mathbf{K_1 [H_2 O_2] \Gamma_{HRP,TED}} \end{aligned} \quad (13)$$

onde $\Gamma_{HRP,TED}$ é a concentração de superfície da HRP apta para realizar TED.

Considerando que a concentração total de enzima na superfície do eletrodo Γ (em mol cm⁻²) é a soma de todas as formas da enzima na superfície, isto é:

$$\mathbf{\Gamma = \Gamma_{HRP,TED} + \Gamma_{C_I} + \Gamma_{C_{II}}} \quad (14)$$

onde $\Gamma_{HRP,TED}$, Γ_{C_I} e $\Gamma_{C_{II}}$ representam a concentração de peroxidase no estado nativo e os estados oxidados, respectivamente.

Para a HRP sob TED a correspondente equação para balanço entre as formas da enzima na superfície do eletrodo é $\Gamma = \Gamma_{HRP,TED} + \Gamma_{CI,TED}$, já que não se pode discernir entre os compostos I e II. Assim sendo, de acordo com as equações que descrevem o processo de TED, tem-se que:

$$\frac{d\Gamma_{CI,TED}}{dt} = -\frac{d\Gamma_{HRP,TED}}{dt} = K_1\Gamma_{HRP,TED}[H_2O_2] - K_s\Gamma_{CI,TED} \quad (15)$$

Neste caso, como aproximação, quando a corrente cinética é considerada, a concentração de peróxido é assumida por ser equivalente à concentração de seio de solução. Como para o estado estacionário (sob medida amperométrica em potencial constante e sob transporte de massa para a superfície do eletrodo), a concentração das três formas de peroxidase são constantes de forma que:

$$\frac{d\Gamma_{CI,TED}}{dt} = \frac{d\Gamma_{HRP,TED}}{dt} = 0 \quad (16)$$

e

$$K_1\Gamma_{HRP,TED}[H_2O_2] = K_s\Gamma_{CI,TED} \quad (17)$$

Excluindo $\Gamma_{CI,TED}$ da equação anterior, usando a equação (14), temos que:

$$\Gamma_{HRP,TED} = \frac{\Gamma_{TED} K_s}{K_1[H_2O_2] + K_s} \quad (18)$$

Caso a expressão para $\Gamma_{HRP,TED}$ anterior seja substituída na expressão da velocidade da reação a seguir:

$$v = -\frac{d[H_2O_2]}{dt} = K_1[H_2O_2]\Gamma_{HRP,TED} \quad (19)$$

teremos:

$$v = -\frac{d[H_2O_2]}{dt} = K_1[H_2O_2]\Gamma_{HRP,TED} = K_1[H_2O_2]\frac{\Gamma_{DET}K_s}{K_1[H_2O_2] + K_s} \quad (20)$$

Tendo em vista que a expressão para corrente cinética é dada por:

$$i_k = nFAv \quad (21)$$

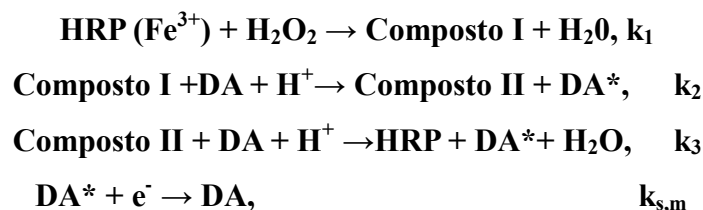
temos a expressão que relaciona a corrente cinética com concentração de peróxido bem como a concentração de HRP hábil para realizar DET (Γ_{DET}):

$$\frac{1}{i_{kin}} = \frac{K_1[H_2O_2] + K_s}{nFA \cdot K_1[H_2O_2]\Gamma_{TED}K_s} = \frac{1}{nFA \Gamma_{TED}} \frac{K_1[H_2O_2] + K_s}{K_1[H_2O_2]K_s}$$

$$\frac{1}{i_{kin}} = \frac{1}{nFA \Gamma_{TED}} \left(\frac{1}{K_1[H_2O_2]} + \frac{1}{K_s} \right) \quad (22)$$

Tendo-se a abordagem para a TED, pode-se obter as constantes cinéticas para as etapas reacionais da TED a partir de um estudo empírico da relação entre i_k e $[H_2O_2]$.

Para a transferência eletrônica mediada, o ciclo da peroxidase é expresso pela sequência de reações equivalentes a descritas na Figura 11:



onde DA representa a dopamina e DA* representa a semidopaminaquinona.

A velocidade do ciclo reacional da peroxidase anterior é definida como $v = -d[DA]/dt$, onde DA é a espécie doadora de elétrons. A constante de velocidade $k_{s,m}$ define a reação eletroquímica de regeneração da DA* para DA. Assim, o par redox serve como um mediador. O substrato DA é escolhido de forma a garantir que $k_{s,m}$ seja alto suficiente e não seja a etapa limitante da reação.

Neste sentido, as equações para velocidade de reação para o ciclo catalítico da peroxidase de acordo com as equações referentes às etapas k_1 , k_2 e k_3 são dadas por:

$$v = - \frac{d[s]}{dt} = K_2[S]\Gamma_{CI} + K_3[S]\Gamma_{CII} \quad (23)$$

bem como, temos que:

$$\frac{d\Gamma_{CI}}{dt} = K_1[H_2O_2]\Gamma_{HRP} - K_2[S]\Gamma_{CI} \quad (24)$$

$$\frac{d\Gamma_{CII}}{dt} = K_2[S]\Gamma_{CI} - K_3[S]\Gamma_{CII} \quad (25)$$

$$\frac{d\Gamma_{HRP}}{dt} = K_3[S]\Gamma_{CII} - K_1[H_2O_2]\Gamma_{HRP} \quad (26)$$

Considerando que no estado estacionário as concentrações de superfície de HRP, CI e CII são aproximadamente constantes teremos que:

$$\frac{d\Gamma_{CI}}{dt} = \frac{d\Gamma_{CII}}{dt} = \frac{d\Gamma_{HRP}}{dt} = 0 \quad (27)$$

$$K_1[H_2O_2]\Gamma_{HRP} = K_2[S]\Gamma_{CI} \quad (28)$$

$$K_2[S]\Gamma_{CI} = K_3[S]\Gamma_{CII} \quad (29)$$

$$K_3[S]\Gamma_{CII} = K_1[H_2O_2]\Gamma_{HRP} \quad (30)$$

Excluindo Γ_{HRP} das últimas três equações usando a relação da equação (14), chegamos às seguintes expressões para C_I e C_{II} :

$$\Gamma_{CI} = \frac{K_1K_3\Gamma[H_2O_2]}{K_1K_2[H_2O_2] + K_1K_3[H_2O_2] + K_2K_3[S]} \quad (31)$$

$$\Gamma_{CII} = \frac{K_1K_2\Gamma[H_2O_2]}{K_1K_2[H_2O_2] + K_1K_3[H_2O_2] + K_2K_3[S]} \quad (32)$$

Por sua vez, ao inserirmos as duas expressões anteriores na equação (23), tem-se que:

$$\frac{2\Gamma}{v} = \frac{1}{K_1[H_2O_2]} + \frac{K_2 + K_3}{K_2K_3[S]} \quad (33)$$

onde se $k_2 \gg k_3$, temos:

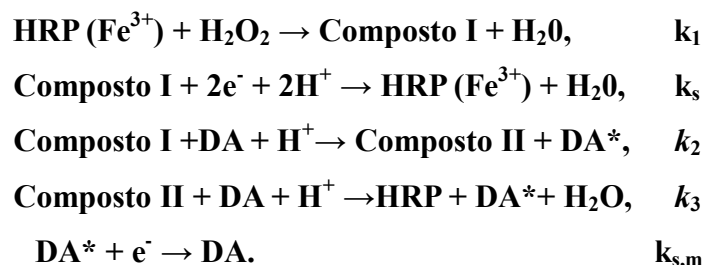
$$\frac{2\Gamma}{v} = \frac{1}{K_1[H_2O_2]} + \frac{1}{K_3[S]} \quad (34)$$

Finalmente, combinando a última expressão com a expressão 21, para corrente elétrica, temos:

$$\frac{1}{I_{kin}} = \left(\frac{1}{K_1[H_2O_2]} + \frac{1}{K_3[S]} \right) \quad (35)$$

onde Γ representa a concentração total de enzima ativa na superfície e os demais termos tem seu significado conforme definidos anteriormente.

Por fim, para a transferência direta e mediada ocorrendo simultaneamente os mecanismos de TED e TEM são combinados em um mecanismo de transferência eletrônica mista de TED e TEM. Neste caso temos:



Conforme pode ser observado, a redução da forma oxidada da enzima (Composto I) é feita diretamente sobre o eletrodo bem como pelo mediador de forma que a TED e a TEM ocorrem simultaneamente. Para este caso de ocorrência simultânea

de TED e TEM temos que a corrente cinética relaciona-se com a concentração de peróxido de hidrogênio pela seguinte equação:

$$\frac{1}{I_{\text{kin}}} = \frac{1}{nFA\Gamma_{\text{TED/TEM}}} \left(\frac{1}{K_1[\text{H}_2\text{O}_2]} + \frac{1}{K_s + K_3[\text{S}]} \right) \quad (36)$$

onde $\Gamma_{\text{TED/TEM}}$ representa a quantidade total de enzima ativa na superfície.

Conforme pode ser observado, mediante a análise das equações anteriormente deduzidas, que relacionam a corrente cinética (I_{kin}) com a concentração de peróxido de hidrogênio, a dependência da corrente cinética com a concentração de peróxido de hidrogênio é similar.

A Figura 15 ilustra o gráfico de Koutecky-Levich para a redução de peróxido de hidrogênio na ausência de dopamina. Fica evidente que o coeficiente angular das curvas de Koutecky-Levich são dependentes do aumento da concentração de peróxido, o que está em concordância com a Equação 36.

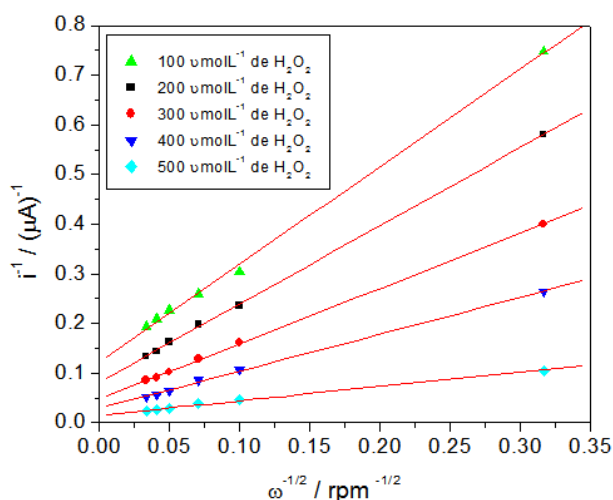


Figura 15 - Gráfico de Koutecky-Levich para eletrodo modificado com NTCPM/HRP: 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 .

A partir da intercessão das curvas de Koutecky-Levich para diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio foram obtidos os valores de corrente cinética para o processo de TED e, então, foram plotadas as curvas de I_{kin}^{-1} vs $[\text{H}_2\text{O}_2]^{-1}$ na presença e ausência de dopamina (Figura 16).

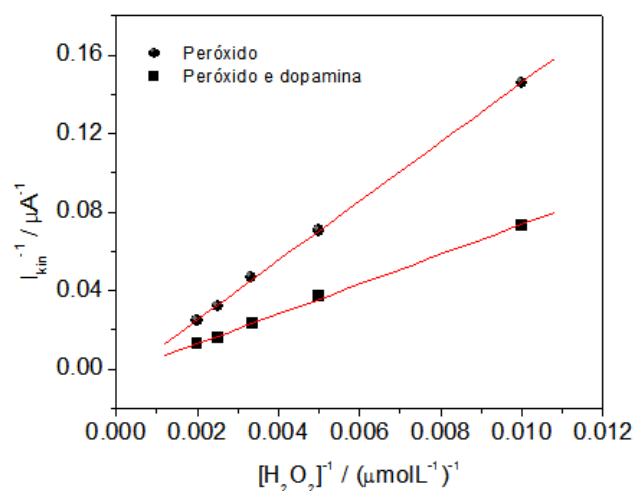


Figura 16 - Dependência dos interceptos dos gráficos de Koutecky-Levich com a concentração de peróxido na ausência e presença de dopamina 200 μmol L⁻¹.

Contudo, os coeficientes angulares dos gráficos I_{kin}^{-1} vs $[H_2O_2]$ referentes à TED, TEM e TED/TEM simultâneo são diferentes. Conforme pode ser observado, a razão dos coeficientes angulares das equações para a TED e TED/TEM nos fornece o percentual de enzima na superfície hábil para realizar a transferência eletrônica direta em relação ao percentual total de enzima ativa na superfície.

$$\frac{\text{coeficiente angular}_{TED/TEM}}{\text{coeficiente angular}_{TED}} = \frac{\frac{1}{nFA\Gamma_{TED/TEM}}}{\frac{1}{nFA\Gamma_{TED}}} = \frac{\Gamma_{TED}}{\Gamma_{TED/TEM}} \quad (37)$$

Com base nas expressões para corrente cinética anteriores para TED e TED/TEM; e pelos coeficientes angulares das curvas de Koutecky-Levich, foram estimados os percentuais de TED e TEM para os materiais confeccionados: 55% de TED e 45% de TED/TEM. Tais resultados demonstram que os eletrodos modificados de tal forma apresentam-se como excelentes materiais para se explorar a TED para a enzima HRP mediante uma redução da TEM sobre materiais nanoestruturados.

5. CONCLUSÃO

Através do presente trabalho foi possível:

- Explorar os diferentes parâmetros que ocasionam variações nas porcentagens de TED e TEM/TED de biossensores enzimáticos contendo HRP como material biológico, bem como efetuar os cálculos das mesmas;
- Perceber que tanto a quantidade de substrato enzimático, quanto de mediador na célula eletroquímica alteram os valores de TED devido à variação de disponibilidade de enzimas ativas para manter a cinética reacional na superfície do eletrodo;
- Comprovar que o fator limitante da cinética racional deste tipo de biossensor é o transporte de massa, uma vez que a corrente de redução do peróxido de hidrogênio é proporcional à velocidade de rotação do eletrodo.

Tais resultados demonstram que os eletrodos modificados de tal forma apresentam-se como excelentes materiais para se explorar a TED para a enzima HRP mediante uma redução da TEM sobre materiais nanoestruturados. Contudo, os estudos também demonstram a possibilidade de desenvolvimento futuro de materiais com propriedades melhoradas para um melhor aprofundamento deste tipo de estudo.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] FERNANDES, J. C. B.; KUBOTA, L. T. e OLIVEIRA NETO, G.; **Ion-selective electrodes: historical, mechanism of response, selectivity and concept review**; Quím. Nova [online], v.24, n.1, p. 120-130, 2001.

[2] BRETT, A. M. O. ; BRETT, C. M. A.; **Electroquímica - Princípios, Métodos e Aplicações**, Oxford University Press, Inc., Livraria Almedina, Coimbra, p.156,1996.

[3] CARREIRA, E. da S.; **Caracterização de um Sensor de Hidrogênio Baseado na Variação do Nível de Fermi em Metais**; Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

[4] SKOOG, D.A.; HOOLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª ed., Artmed Editora, Porto Alegre, p. 613, 1998.

[5] BOLLO, S.; FINGER, S.; STURM, J. C.; NÚÑEZ-VERGARA, J. A.; SQUELLA, J. A.; **Cyclic voltammetry and scanning electrochemical microscopy studies of heterogeneous electron transfer reaction of some nitroso aromatic compounds** *Electrochimica; Acta*, v. 52, n. 15, p. 4892-4898, 2007.

[6] SKOOG, D. A.; HOLLER, F.; NIEMAN, T. A.; **Princípios de Análise Instrumental**, 5ª ed., Ed. Bookman, Porto Alegre, p. 629, 2002.

[7] SKOOG, D. A.; HOLLER, F.; NIEMAN, T. A.; **Princípios de Análise Instrumental**, 5ª ed., Ed. Bookman, Porto Alegre, p. 634, 2002.

[8] SKOOG, D. A.; HOLLER, F.; NIEMAN, T. A.; **Princípios de Análise Instrumental**, 5ª ed., Ed. Bookman, Porto Alegre, p. 656, 2002.

[9] RICCARDI, C. S.; **Imunossensor Amperométrico**, Química Nova, vol.25, n.2, São Paulo, 2002. Disponível em < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_art

text&pid=S0100-40422002000200020> acessado em 24 de maio 2011.

[10] ALLEN J. BARD AND LARRY R. FAULKNER, **Electrochemical Methods**, John Wiley & Sons, 1980.

[11] L. GORTON; A. LINDGREN, T. LARSSON, F.D. MUNTEANU, T. RUZGAS, I. GAZARYAN; **Analytica Chimica Acta**, v. 400, p. 91–108, 1999.

[12] NISTOR, C.; EMNÉUS, J.; GORDOTN, L; e CIUCU, A; **Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds**; *Anal. Chem. Acta.*, v. 387, p. 309, 1999.

[13] RUSSEL, I. M. e BURTON, S. G.; **Development and demonstration of an immobilized polyphenol oxidase bioprobe for the detection of phenolic pollutants in water**; *Anal. Chem. Acta*, v. 389, p. 161, 1999.

[14] PUIG, D. e BARCELO, D.; **Determination of phenolic compounds in waste water**. *Trends Anal. Chem.*, v. 15, p.362, 1996.

[15] CHEN,S.H.; YUAN, R.; CHAI , Y.Q.; ZHANG, L.Y.; WANG, N.; LI , X.L.; **Amperometric third-generation hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of hemoglobin on multiwall carbon nanotubes and gold colloidal nanoparticles**; *Biosens. Bioelectron*, v. 22, p. 1268, 2007.

[16] FATIBELLO FILHO, O. ; CAPELATO, M. D. ; **Biossensores**; *Quím. Nova*, v.15, p. 28-39, 1992.

[17] J.L. TANG; B.Q. WANG; Z.Y. WU; X.J. HAN; S.J. DONG; E.K. WANG; **Lipid membrane immobilized horseradish peroxidase biosensor for amperometric determination of hydrogen peroxide**; *Biosens. Bioelectron*, v. 18, p. 867–872, 2003.

[18] LIU,Y.; LEI, J.P.; JU ,H.X.; **Amperometric sensor for hydrogen peroxide based**

on electric wire composed of horseradish peroxidase and toluidine blue multiwalled argon nanotubes nanocomposite; *Talanta*, v. 74, p. 965–970, 2008.

[19] XU, Q.; ZHU, J.J.; HU, X.Y.; **Ordered mesoporous polyaniline film as a new matrix for enzyme immobilization and biosensor construction**; *Anal. Chim. Acta*, v. 597, p. 151–156, 2007.

[20] SARMA, A.K.; VATSYAYAN, P.; GOSWAMI, P.; MINTEER, S.D.; **Recent advances in materials science for developing enzyme electrodes**, *Biosens. Bioelectron.*, v. 24, p. 2313–2322, 2009.

[21] RAJESH, T.; AHUJA, D.; KUMAR; **Recent progress in the development of nanostructured conducting polymers/nanocomposites for sensor application**; *Sens. Actuators*, v. 136, p. 275–286, 2009.

[22] ROSATTO, S. S.; FREIRE, R.S.; DURÁN, N. KUBOTA, L. T.; **Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental**; *Quim. Nova*, v. 24, p. 77-86, 2007.

[23] MARKO-VARGA, G.; EMNÉUS, J.; LO GORTON; RUZGAS, T.; **TRENDS**; *Anal. Chem.*, v.14, p.319, 1995.

[24] GUILBAULT, G. G.; **Handbook of enzymatic methods of analysis**; **Marcel Dekker**, New York, 4^a ed., 1976.

[25] CASS, T.; LIGLER, F. S. **Immobilized biomolecules in analysis: a practical approach**, **Oxford University**. Press: Nova Iorque, 1998.

[26] MENDES, R. K.; **Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização em monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor**; Tese de doutorado; Campinas, SP (s.n.), 2006.

- [27] ALFAYA, A. A.; KUBOTA, L. T.; **A utilização de materiais obtidos pelo processo de solgel na construção de biossensores**; Química Nova, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002.
- [28] POLÁSEK, M.; GORTON, L.; APPELVIST, R.; MARKO-VARGA, G.; JOHANSSON, G.; **Amperometric glucose sensor based on glucose-dehidrogenase immobilized on a graphite electrode modified with an n,n-bis(benzophenoxazinyl) derivative of benzene-1,4-dicarboxamida**; Analytica Chimica Acta., v. 246, p. 283, 1991.
- [29] CHIBATA, I. ; **Immobilized enzymes research and development**, John Wiley and Sons, Nova Iorque, p. 32, 1978.
- [30] FILHO, O. F.; CAPELATO, M. D. ; **Biossensores**; Química Nova, v. 15, p. 28, 1992.
- [31] OLIVEIRA NETO, G.; YAMANAKA, H. **Enzimas e materiais biológicos imobilizados: biossensores**. Química Nova, v. 11, p. 432, 1988.
- [32] NAVES, A. F.; **Estudo da adsorção de horseradish peroxidase (HRP) sobre superfícies planas e de sua atividade catalítica**; Tese de doutorado; Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- [33] Ruzgas, T.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; **Anal. Chim. Acta**, v.341, p. 245, 1995.
- [34] RUZGAS, T.; GORTON, L.; EMNÉUS, J.; MARKO-VARGA, G.; **J. Electroanal. Chem.** ,v. 41, p. 391, 1995.
- [35] IJIMA, S.; **Nature**, v. 56, p.354, 1991.
- [36] HUGHES, T. V.; CHAMBERS, C. R.; **U.S. pat. 405**, p.480, 1889.

[37] KANG, X.H.; MAI, Z.B.; ZOU, X.Y.; CAI, P.X.; MO, J.Y.; **A sensitive nonenzymatic glucose sensor in alkaline media with a copper nanocluster/multiwall carbon nanotube-modified glassy carbon electrode**; *Anal. Biochem.*, v. 363, p.143–150, 2007.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial do presente trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

Delton Martins Pimentel

deltonpimentel@gmail.com

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Campus Juscelino Kubitschek de Oliveira, Rodovia MGT 367 - Km 583, Nº 5.000,
39100-000, Diamantina - MG.