



BIOSSENSORES IMPRESSOS BASEADOS EM PEROXIDASE IMOBILIZADA EM
NANOFIOS DE TITANATO

Daniela Ferreira Machado

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

Orientador(es): Helen Conceição Ferraz

Neuman Solange de Resende

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2015

BIOSENSORES IMPRESSOS BASEADOS EM PEROXIDASE IMOBILIZADA EM
NANOFIOS DE TITANATO

Daniela Ferreira Machado

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

Examinada por:

Prof^ª. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

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

Prof^ª. Eliane D'Elia, D.Sc.

Dr^ª. Aline Mara Barbosa Pires, D.Sc.

Prof^ª. Inês Rosane Welter Zwirtes de Oliveira, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
FEVEREIRO DE 2015

Machado, Daniela Ferreira

Biossensores impressos baseados em peroxidase imobilizada em nanofios de titanato/ Daniela Ferreira Machado. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2015.

XV, 101 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Helen Conceição Ferraz

Neuman Solange de Resende.

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ COPPE/Programa de Engenharia Química, 2015.

Referências Bibliográficas: p. 86-101.

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

“Sob o céu há, para cada coisa, uma ocasião e um tempo propício:

Tempo de nascer e tempo de morrer;

Tempo de plantar e tempo de colher o que se plantou;

Tempo de matar e tempo de curar;

Tempo de derrubar e tempo de edificar;

Tempo de chorar e tempo de rir;

Tempo de abraçar e tempo de abster-se de abraçar;

Tempo de estar calado e tempo de falar;

Tempo de amar e tempo de odiar;

Tempo de guerra e tempo de paz.”

Eclesiastes 3:1-5,7,8.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte primacial e única de toda Sabedoria, o qual concedeu às suas criaturas humanas a inteligência para perscrutar, e o entendimento para compreender a constituição íntima da matéria de que é feito o Universo por Ele criado.

A meus pais, aos quais devo minha existência física, terrena, os quais me provisionaram dos meios materiais de que tive necessidade para fazer meus estudos, amparando-me nas dúvidas, animando-me nas adversidades e emprestando sempre sua solidariedade em todos os momentos que vivi.

A minhas orientadoras, que colocaram à minha disposição, de um modo generoso, todo o conhecimento adquirido ao longo de suas vidas, sustentando-me na persecução das metas às quais me dediquei laboriosamente durante meus estudos no mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Fenômenos Interfaciais, em especial a Aline e Amanda, pela disponibilidade de tempo, auxiliando-me atenciosamente quando mais precisei.

Às amigas Rayane e Raquel, que compartilharam as alegrias e as tristezas, ajudaram-me na superação das situações mais complexas e difíceis, e que tornaram o período de estudos muito mais agradável, deixo meus sinceros agradecimentos.

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

BIOSENSORES IMPRESSOS BASEADOS EM PEROXIDASE IMOBILIZADA EM NANOFIOS DE TITANATO

Daniela Ferreira Machado

Fevereiro/2015

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Neuman Solange de Resende

Programa: Engenharia Química

Este trabalho descreve o desenvolvimento de biossensores impressos baseados em *horseradish peroxidase* (HRP) imobilizada em nanofios de titanato (NFT) para detecção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os NFT foram sintetizados pelo método hidrotérmico e caracterizado por técnicas físico-químicas. Os NFT tiveram sua superfície modificada com (3-aminopropil)trimetóxisilano (APTMS) e glutaraldeído (GLU) a fim de servirem como suporte para imobilização covalente da HRP. A cobertura dos NFT com a HRP foi de $1,62 \text{ mgHRP m}^{-2}$ e a enzima reteve cerca de 50% de sua atividade após a imobilização. Diferentes estratégias de preparo dos biossensores impressos foram investigadas. A estratégia mais promissora foi a de modificação da superfície de eletrodos impressos de carbono por gotejamento de solução contendo NFT/APTMS/GLU/HRP e solução de Nafion[®]. As técnicas de voltametria cíclica e cronoamperometria foram empregadas no estudo das propriedades eletroquímicas do biossensor. O biossensor apresentou excelente desempenho na redução eletrocatalítica do H_2O_2 , com baixo potencial de redução, em torno de $-0,98 \text{ V vs. Ag}$ em pH 7, resposta linear na faixa de concentração de 40 a $560 \mu\text{mol L}^{-1}$, limite de detecção de $10,7 \mu\text{mol L}^{-1}$, e ainda boa reprodutibilidade, repetibilidade e estabilidade.

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

SCREEN PRINTED BIOSENSORS BASED ON PEROXIDASE IMMOBILIZED
ONTO TITANATE NANOWIRES

Daniela Ferreira Machado

February/2015

Advisors: Helen Conceição Ferraz

Neuman Solange de Resende

Department: Chemical Engineering

This work describes the development of screen printed biosensors based on the use of the horseradish peroxidase (HRP) immobilized onto titanate nanowires (TNW) for hydrogen peroxide (H_2O_2) detection. The TNW were synthesized by the hydrothermal method and characterized by physico-chemical techniques. Titanate nanowires surface modified with (3-aminopropyl)trimethoxysilane (APTMS) and glutaraldehyde (GLU) were employed as a support for covalent immobilization of HRP. The coverage of TNW containing HRP adsorbed was $1.62 \text{ mgHRP m}^{-2}$ and residual enzymatic activity was around 50%. Different strategies were investigated to prepare the screen printed biosensor. The most suitable strategy was to modify the surface of screen printed carbon electrodes by dripping NFT/APTMS/GLU/HRP solution and Nafion solution. Cyclic voltammetry and chronoamperometry were employed to study the electrochemical properties of the biosensor. The biosensor had an excellent performance in terms of electrocatalytic reduction toward H_2O_2 . The biosensor showed a low reduction potential for H_2O_2 around $-0,98 \text{ V vs. Ag}$ at pH 7, linear response in the concentration range of 40 to $560 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ with a detection limit of $10.7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, good stability, reproducibility and repeatability.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Biossensores.....	4
2.1.1. Elementos de Transdução.....	9
2.1.2. Elementos Biológicos.....	12
2.1.2.1. A Enzima Peroxidase de Raiz Forte (HRP).....	15
2.2. Imobilização do Elemento Biológico.....	19
2.2.1. Adsorção.....	21
2.2.2. Ligação Covalente.....	22
2.2.3. Oclusão.....	23
2.2.4. Reticulação.....	23
2.2.5. Afinidade.....	23
2.3. Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	24
2.3.1. Técnicas de Detecção do H ₂ O ₂	26
2.3.2. Detecção Eletroquímica do H ₂ O ₂	27
2.4. Nanomateriais em Biossensores.....	29
2.4.1. Dióxido de Titânio.....	31
2.4.2. Nanoestruturas de Titanato.....	33
2.5. Eletrodos Impressos.....	36
2.5.1. Preparo dos Eletrodos Impressos.....	36
2.5.2. Biossensores Impressos para Detecção do H ₂ O ₂	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1. Síntese do Dióxido de Titânio.....	43
3.2. Síntese dos Nanofios de Titanato.....	43
3.3. Caracterização Físico-Química dos NFT.....	43
3.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44

3.3.2. Fisissorção de Nitrogênio.....	44
3.3.3. Difração de Raios-X (DRX).....	44
3.3.4. Fluorescência de Raios-X (FRX).....	44
3.3.5. Espectroscopia Raman.....	44
3.3.6. Espectroscopia no Infravermelho.....	44
3.3.7. Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	45
3.3.8. Potencial Zeta.....	45
3.3.9. Análise Elementar de CHN.....	45
3.4. Caracterização da Enzima HRP.....	45
3.4.1. Método de Bradford.....	45
3.4.1.1. Solução de Azul Brillhante de Coomassie.....	46
3.4.1.2. Soluções de Albumina de Soro Bovino.....	46
3.4.1.3. Curva Padrão.....	46
3.4.2. Atividade Específica da HRP.....	47
3.5. Imobilização da HRP nos NFT.....	47
3.6. Preparo dos Biossensores.....	49
3.6.1. Eletrodo de Pasta de Carbono (EPC).....	49
3.6.2. Eletrodo de Tinta de Grafite (ETG).....	50
3.6.3. Eletrodo Impresso (EI).....	50
3.7. Caracterizações Eletroquímicas.....	51
3.7.1. Caráter Condutor dos NFT.....	52
3.7.2. Avaliação Eletroquímica dos Biossensores.....	52
3.8. Avaliação do Biossensor Impresso na Detecção do H ₂ O ₂	53
3.8.1. Estudo da Reprodutibilidade.....	53
3.8.2. Estudo da Repetibilidade.....	53
3.8.3. Estudo da Estabilidade.....	53
3.8.4. Curva Analítica.....	53

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1. Caracterização do Dióxido de Titânio.....	55
4.2. Caracterização dos NFT.....	56
4.3. Imobilização da HRP nos NFT.....	59
4.3.1. Caracterização da Funcionalização e Imobilização.....	59
4.3.2. Quantificação da Imobilização.....	64
4.3.3. Atividade Residual.....	66
4.4. Caracterizações Eletroquímicas.....	68
4.4.1. Eletrodo de Pasta de Carbono.....	68
4.4.1.1. Caracterização Eletroquímica dos NFT.....	68
4.4.1.2. Avaliação Eletroquímica do Biossensor.....	69
4.4.2. Eletrodo de Tinta de Grafite.....	72
4.4.2.1. Caracterização Eletroquímica do ETG.....	72
4.4.2.2. Avaliação Eletroquímica do Biossensor.....	73
4.4.3. Eletrodo Impresso.....	74
4.4.3.1. Avaliação Eletroquímica do Biossensor.....	74
4.4.3.2. Características Analíticas.....	79
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	84
5.1. Conclusões.....	84
5.2. Sugestões para Futuros Trabalhos.....	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema de funcionamento de um biossensor. (Adaptado de SKOOG <i>et al.</i> , 2009).....	5
Figura 2.2. Representação do funcionamento de um biossensor de glicose. GOx- glicose oxidase.....	6
Figura 2.3. (a) Eletrodo contendo anticorpo imobilizado (Y); (b) ligação do analito de interesse (▼) ao eletrodo contendo o anticorpo; (c) associação do anticorpo marcado. (Adaptado de WILSON, 2006).....	13
Figura 2.4. Representação da especificidade de um biossensor enzimático: (a) com detecção do analito; (b) sem detecção do analito.....	14
Figura 2.5. Representação tridimensional da estrutura cristalina da HRP isoenzima C. O grupo heme (em vermelho) localiza-se entre dois átomos de cálcio (esferas azuis). (Extraído de VEITCH, 2004).....	16
Figura 2.6. Mecanismo geral do ciclo catalítico da HRP na presença de H ₂ O ₂ . (Extraído de NAVES, 2008).....	18
Figura 2.7. Representação esquemática dos métodos de imobilização de enzimas. E: enzima. (Adaptado de SASSOLAS <i>et al.</i> , 2012).....	20
Figura 2.8. Imobilização covalente de enzima em superfície com grupo amino, utilizando reagente de acoplamento glutaraldeído. (Adaptado de SASSOLAS <i>et al.</i> , 2012).....	22
Figura 2.9. Estruturas cristalinas de (a) anatásio, (b) rutilo e (c) bruquita. (Extraído de Carp <i>et al.</i> , 2004).....	32
Figura 2.10. Esquema da estrutura lamelar do Na ₂ Ti ₃ O ₇ . (Adaptado de MORGADO, 2007).....	32
Figura 2.11. Morfologia de (a) nanofio/nanobastão/nanofibra; (b) nanotubo. (Adaptado de MORGADO, 2007).....	34
Figura 2.12. Esquema de um sensor de grafite preparado por <i>screen-printing</i> . (Adaptado de NASCIMENTO e ANGNES, 2000).....	37
Figura 2.13. Configurações usadas no preparo de biossensores impressos. (a) Deposição manual; (b) Impressão de tinta contendo enzima; (c) Impressão de tinta biocompósita. (Adaptado de SIRVENT <i>et al.</i> , 2000).....	39
Figura 3.1. Etapas de funcionalização dos NFT e imobilização da HRP.....	48
Figura 3.2. Eletrodo de pasta de carbono.....	49

Figura 3.3. Etapas de preparo do eletrodo de tinta de grafite.....	50
Figura 3.4. (a) Eletrodo impresso; (b) Modificação do eletrodo de trabalho com NFT/APTMS/GLU/HRP.....	51
Figura 3.5. Esquema da célula eletroquímica utilizada nos experimentos. (1) Eletrodo de trabalho; (2) Eletrodo de referência; (3) Contra eletrodo. (Adaptado de GALLI, 2011).....	51
Figura 4.1. Difratoograma do dióxido de titânio.....	55
Figura 4.2. Micrografias dos NFT sintetizados.....	56
Figura 4.3. Difratoograma dos nanofios de titanato.....	57
Figura 4.4. Espectro Raman dos nanofios de titanato.....	58
Figura 4.5. Espectros de infravermelho dos (a) NFT; (b) NFT/APTMS; (c) NFT/APTMS/GLU; (d) NFT/APTMS/GLU/HRP.....	60
Figura 4.6. Medidas de potencial zeta para (a) NFT; (b) HRP; (c) NFT/APTMS; (d) NFT/APTMS/GLU; (e) NFT/APTMS/GLU/HRP.....	62
Figura 4.7. Micrografias da matriz NFT/APTMS/GLU após imobilização da HRP.....	64
Figura 4.8. Atividade residual da HRP livre e imobilizada em função do tempo.....	67
Figura 4.9. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos de (a) pasta de carbono e (b) pasta de carbono modificada com 20% de NFT, em solução 5 mmol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆] e 1 mol L ⁻¹ de KCl na velocidade de varredura de 0,1 V s ⁻¹	69
Figura 4.10. Voltamogramas cíclicos para (a) eletrodo de pasta de carbono e (b) biossensor de pasta de carbono em tampão PB 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7), velocidade de varredura de 0,1 V s ⁻¹	70
Figura 4.11. Voltamogramas cíclicos para o biossensor de pasta de carbono em (a) ausência de H ₂ O ₂ e (b) presença de 2 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ em PB 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7), velocidade de varredura de 0,1 V s ⁻¹	71
Figura 4.12. Voltamograma cíclico para o eletrodo de tinta de grafite em solução 5 mmol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆] e 1 mol L ⁻¹ de KCl na velocidade de varredura de 0,1 V s ⁻¹ ..	72
Figura 4.13. Voltamogramas cíclicos para (a) eletrodo de tinta de grafite e (b) biossensor de tinta de grafite em PB 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7), velocidade de varredura de 0,1 V s ⁻¹	73
Figura 4.14. Voltamogramas cíclicos para o biossensor de tinta de grafite em (a) ausência de H ₂ O ₂ e (b) presença de 2 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ em PB 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7), velocidade de varredura de 0,1 V s ⁻¹	74

Figura 4.15. Voltamogramas cíclicos para (a) eletrodo impresso não modificado e (b) biossensor impresso em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7), velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$..	75
Figura 4.16. Voltamogramas cíclicos para o biossensor impresso em (a) ausência de H_2O_2 e (b) presença de $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7), velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$	76
Figura 4.17. Voltamogramas cíclicos para o biossensor impresso em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) e $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 , com velocidade de varredura variando entre $0,01$ e $0,4 \text{ V s}^{-1}$	77
Figura 4.18. Dependência linear entre a corrente do pico catódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura.....	78
Figura 4.19. Resposta amperométrica do biossensor impresso NFT/APTMS/GLU/HRP a sucessivas adições de $20 \mu\text{L}$ de solução $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 em potencial de $-0,98 \text{ V}$	79
Figura 4.20. Curva analítica do biossensor impresso NFT/APTMS/GLU/HRP obtida a partir dos dados de cronoamperometria.....	80
Figura 4.21. Medidas de repetibilidade do biossensor impresso em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) contendo $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2	81
Figura 4.22. Medidas de reprodutibilidade do biossensor impresso em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) contendo $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2	81
Figura 4.23. Avaliação da estabilidade do biossensor impresso em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) contendo $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Biossensores potenciométricos baseados em enzimas.....	7
Tabela 2.2. Aplicações dos biossensores.....	8
Tabela 2.3. Transdutores usados em biossensores. (Adaptado de CAVALIERI, 2003).....	10
Tabela 2.4. Métodos de imobilização. (Adaptado de SASSOLAS <i>et al.</i> , 2012).....	21
Tabela 2.5. Biossensores enzimáticos baseados em nanoestruturas de TiO ₂	35
Tabela 2.6. Biossensores impressos enzimáticos para detecção amperométrica de H ₂ O ₂	42
Tabela 3.1. Preparo das soluções de BSA.....	46
Tabela 4.1. Resultado de FRX dos NFT.....	58
Tabela 4.2. Atribuições das bandas dos espectros de infravermelho.....	61
Tabela 4.3. Teores de CHN após etapas de funcionalização e imobilização da HRP.....	63
Tabela 4.4. Comparação da imobilização da HRP por diferentes estratégias.....	65
Tabela 4.5. Valores do potencial de redução da HRP imobilizada em diferentes substratos.....	70
Tabela 4.6. Valores das correntes de pico catódico e velocidades de varredura.....	78
Tabela 4.7. Biossensores impressos enzimáticos para detecção de H ₂ O ₂	83

LISTA DE ABREVIATURAS

APTMS	(3-aminopropil)trimetóxisilano
EI	Eletrodo Impresso
EPC	Eletrodo de Pasta de Carbono
ETG	Eletrodo de Tinta de Grafite
GLU	Glutaraldeído
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
NFT	Nanofios de Titanato
PB	Tampão fosfato de potássio

1. INTRODUÇÃO

Sensores são dispositivos que respondem a estímulos físicos ou químicos, produzindo uma resposta proporcional à quantidade da substância detectada. Quando estes possuem um sistema de detecção biológico, tais como, enzimas, proteínas, anticorpos, DNA, organelas, células inteiras, tecidos de animais ou plantas, etc., são conhecidos por biossensores (THÉVENOT *et al.*, 2001; ARYA *et al.*, 2008). Um biossensor pode ser definido como um instrumento analítico compacto, incorporando um elemento de reconhecimento biológico ou biologicamente sensível diretamente associado a um transdutor físico-químico (CHAMBERS *et al.*, 2008).

Grandes esforços têm sido realizados em desenvolver biossensores para as mais diversas aplicações. Novos sensores foram projetados e empregados em análise química de várias substâncias nas áreas biológica, clínica e industrial, como também no monitoramento e controle de poluentes ambientais. De acordo com o relatório “Biosensors Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2012 – 2018” o mercado mundial de biossensores foi de US\$ 9,9 bilhões em 2011 e estima-se que alcance US\$ 12 bilhões em 2015. Este crescimento está impulsionado principalmente pela sua aplicação na área da saúde, além do monitoramento ambiental (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2012).

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

O H_2O_2 é um composto encontrado na natureza e um dos agentes oxidantes mais versáteis existentes. Desempenha um papel essencial na regulação de diversos processos biológicos e é um produto secundário de algumas reações bioquímicas catalisadas por enzimas, tais como glucose oxidase, lactato oxidase, colesterol oxidase, dentre outras (CHEN *et al.*, 2012). Em concentrações micromolares, está envolvido no organismo na produção de energia, na regulação do crescimento celular, em danos aos núcleos

celulares e no mecanismo de defesa do sistema imunológico (LUO *et al.*, 2009; HUA *et al.*, 2011; LIU e ZWEIER, 2001).

Verifica-se na literatura a existência de muitos trabalhos sobre biossensores em que são abordados tópicos sobre novos materiais, novos métodos de fabricação, estratégias para melhoria na seletividade e nos limites de detecção. A repercussão da nanotecnologia tem contribuído para atender a estas características de melhora de desempenho. Desta forma, os nanomateriais tem atraído grande interesse nas pesquisas devido às suas desejáveis propriedades químicas, físicas e eletrônicas que os tornam diferentes de outros materiais (CHEN *et al.*, 2012).

Biossensores baseados em enzimas, como a peroxidase, imobilizadas em nanomateriais têm mostrado vantagens distintas para a sensibilidade ao H₂O₂. Dentre os nanomateriais, os nanotubos de titanato demonstram ser promissores para esta aplicação em razão de características como alta área específica, estabilidade térmica e química, propriedades óticas e elétricas, biocompatibilidade, facilidade de obtenção e propriedades de transdução do sinal biológico (LIU *et al.*, 2005).

Outro fator a ser considerado é a importância de oferecer dispositivos com maior robustez, metodologias mais simplificadas e adaptações quanto ao tamanho e arranjo de eletrodos que facilitem a análise em campo. Dentro deste contexto, o desenvolvimento de eletrodos impressos “*screen-printed electrode*” (SPE) tem atendido a demanda deste mercado, oferecendo um sistema completo de eletrodos projetados com grande simplicidade e economia (BONI, 2011).

Um dos principais aspectos que tornam os eletrodos impressos atrativos quando se busca o desenvolvimento de biossensores comerciais é a possibilidade de total automação na fabricação de um sistema completo contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência, impressos no mesmo suporte. Esta característica associada à simplicidade de elaboração e às inúmeras possibilidades de modificação dos eletrodos impressos promete colocar a técnica em uma posição privilegiada entre as demais.

Por outro lado, a possibilidade de modificação dos eletrodos impressos através da adição de espécies na superfície do eletrodo de trabalho, visando alterar a natureza físico-química da interface eletrodo de trabalho/solução, tem contribuído para melhorar a seletividade e sensibilidade desses dispositivos. Desta forma a tecnologia “*Screen*

printing” se torna uma ferramenta versátil para a produção barata, fácil e reprodutível de biossensores (LUO *et al.*, 2008).

Baseado neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um biossensor amperométrico para a detecção do peróxido de hidrogênio, baseado no uso da enzima peroxidase de rábano (*horseradish peroxidase*, HRP) imobilizada em nanofios de titanato.

Os objetivos específicos foram:

- ✓ Obter o dióxido de titânio, precursor dos nanofios de titanato;
- ✓ Sintetizar nanofios de titanato para serem utilizados como material de imobilização da enzima;
- ✓ Estabelecer a metodologia de imobilização da enzima HRP, com base na atividade e estabilidade da enzima imobilizada;
- ✓ Construir um biossensor impresso para detecção de peróxido de hidrogênio, caracterizando seu limite de detecção, limite de quantificação, repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade;
- ✓ Construir uma curva analítica para o biossensor desenvolvido.

Este trabalho dá continuidade a uma linha de pesquisa em biossensores do Laboratório de Fenômenos Interficiais (GRIFIT) do Programa de Engenharia Química. Guimarães (2009) utilizou a enzima colesterol oxidase para desenvolver um biossensor impresso para detecção de colesterol. Nicolini (2013) estudou diferentes técnicas de imobilização da enzima HRP em nanofios de titanato.

Esta dissertação foi dividida em cinco capítulos. O presente capítulo apresentou uma introdução ao assunto e citou os objetivos desta dissertação. O capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica sobre o assunto, abordando biossensores, nanomateriais, peróxido de hidrogênio e eletrodos impressos. A metodologia empregada neste trabalho foi descrita no capítulo 3 e os resultados e discussões no capítulo 4. Conclusões e sugestões para trabalhos futuros são apresentados no capítulo 5.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Sensores são dispositivos que respondem a estímulos físicos ou químicos, produzindo uma resposta proporcional à quantidade da substância detectada (FRADEN, 2003). A combinação de uma fase seletiva, também chamada detector ou receptor, e de um transdutor, constitui o sensor.

O termo *detector* refere-se a um dispositivo mecânico, elétrico ou químico que identifica, registra ou indica uma mudança em uma das variáveis em seu ambiente como pressão, temperatura, carga elétrica, radiação eletromagnética, presença de partículas ou moléculas. O detector é a fase de reconhecimento seletiva que converte a informação de interesse em uma característica detectável, como outra espécie química, massa, luz ou calor (HULANICKI *et al*, 1991). A parte receptora dos sensores pode basear-se em diferentes princípios:

- Físico, no qual não ocorre reação química. Exemplos típicos são medidas de absorvância, índice de refração, condutividade, variação de temperatura ou massa;
- Químico, em que uma reação química com participação do analito origina o sinal químico;
- Bioquímico, no qual um processo bioquímico é a fonte do sinal analítico. São exemplos os sensores baseados em enzimas e os imunossensores. Os sensores bioquímicos podem ser considerados como um subgrupo dos sensores químicos e são chamados de biossensores.

2.1. Biossensores

Uma vasta variedade de elementos de reconhecimento pode ser empregada nos biossensores como: enzimas, anticorpos, receptores, células, entre outros (Figura 2.1).

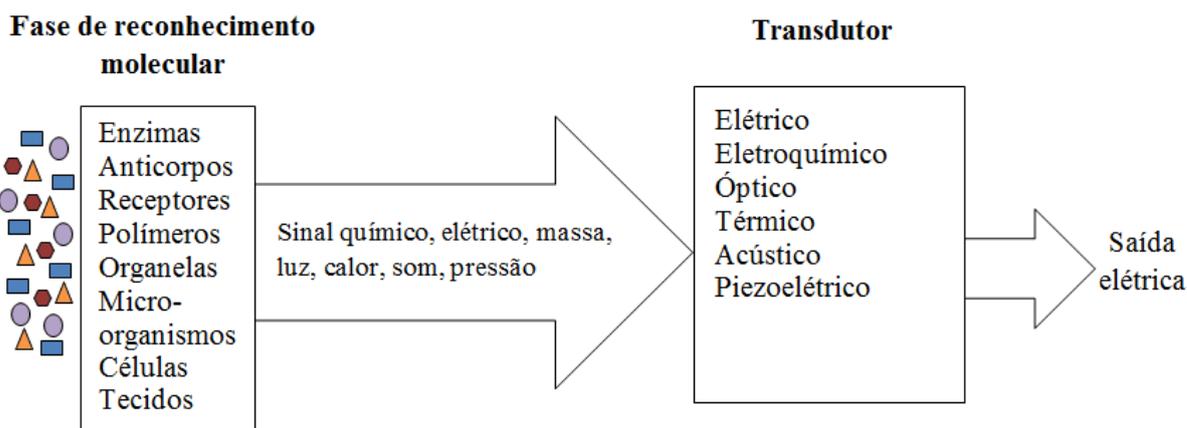


Figura 2.1. Esquema de funcionamento de um biossensor. (Adaptado de SKOOG *et al.*, 2009).

O termo *transdutor* refere-se especificamente aos dispositivos que convertem a informação em um domínio não elétrico em informação nos domínios elétricos. O transdutor, portanto, converte a característica detectada em um sinal elétrico que pode ser medido (LOWE, 2007). A denominação do transdutor dá uma indicação do tipo de transformação realizada, por exemplo, um transdutor eletromecânico transforma um sinal mecânico em elétrico, um transdutor piezoelétrico transforma uma tensão mecânica em diferença de potencial elétrico e um transdutor eletroquímico transforma um sinal químico em elétrico.

De acordo com o princípio de operação do transdutor, os sensores químicos podem ser classificados em eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos, condutimétricos, voltamétricos), ópticos, calorimétricos, acústicos, entre outros.

Consideráveis esforços têm sido realizados para combinar a seletividade de materiais biológicos com transdutores eletroquímicos, resultando em biossensores altamente seletivos para a determinação de analitos. Quando moléculas do analito reagem com esses materiais, a interação dispara a produção de espécies que podem ser direta ou indiretamente monitoradas por meio de um eletrodo seletivo a molécula ou íon (GRUNDLER, 2007).

O biossensor mais estudado e talvez o mais utilizado é aquele baseado no uso de enzimas. Nesse tipo de dispositivo, a amostra é colocada em contato com a enzima imobilizada, a qual reage com o analito produzindo espécies como amônia, dióxido de

carbono, íons hidrogênio ou peróxido de hidrogênio. A concentração dessas espécies, as quais são proporcionais à concentração dos analitos, é determinada pelo transdutor (SKOOG *et al.*, 2009).

Um dos primeiros relatos de biossensores é atribuído a Clark e Lyon, em 1962. Eles desenvolveram um sensor de glicose composto por um eletrodo amperométrico de oxigênio envolto por uma camada de gel contendo a enzima glicose oxidase imobilizada. Um biossensor de glicose similar ao de Clark e Lyon é apresentado na Figura 2.2.

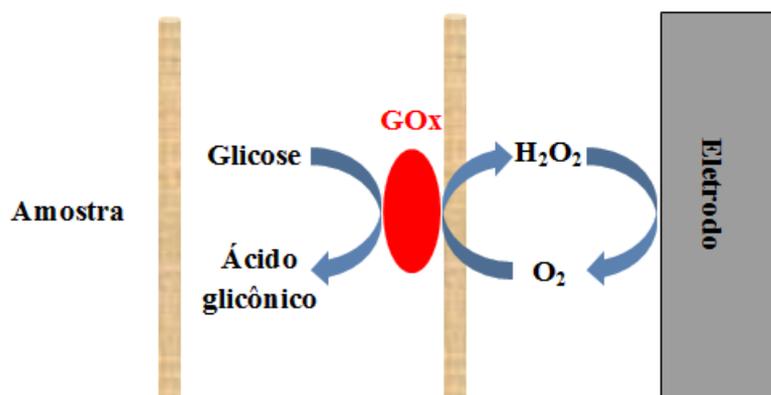
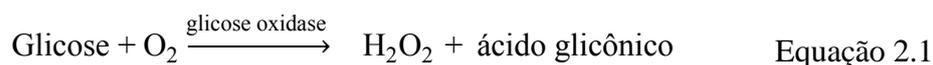


Figura 2.2. Representação do funcionamento de um biossensor de glicose. GOx – glicose oxidase.

A camada externa é um filme de policarbonato permeável à glicose, mas impermeável a proteínas e outros constituintes de amostras de sangue. A membrana intermediária possui a enzima glicose oxidase imobilizada. Como membrana interna, é utilizado o acetato de celulose, que é permeável apenas a moléculas pequenas, como peróxido de hidrogênio. Quando esse dispositivo é imerso em uma solução contendo glicose, a glicose difunde através da membrana externa em direção à enzima imobilizada, onde a seguinte reação catalítica ocorre:



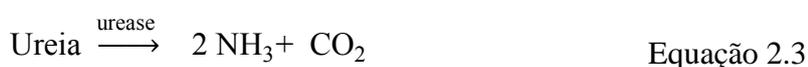
O peróxido de hidrogênio formado difunde-se, então, através da membrana interna, alcançando a superfície do eletrodo, onde é oxidado a oxigênio. Conforme a equação 2.2:



A corrente resultante é diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. Uma variação deste tipo de sensor é frequentemente encontrada em monitores de glicose doméstico, largamente utilizados por pacientes diabéticos (BAKKER & QIN, 2006).

Existem outros sensores baseados em medidas voltamétricas de peróxido de hidrogênio, produzido por oxidação enzimática de espécies de interesse clínico. Essas espécies incluem sacarose, etanol e L-lactato.

Em 1969, Guibaud e Montalvo utilizaram o método potenciométrico para detectar ureia, o maior componente da urina, baseado no uso da enzima urease, que hidrolisa a ureia formando amônia e dióxido de carbono, segundo a reação:



A concentração de amônia é monitorada com um eletrodo seletivo ao íon amônio através do valor do potencial voltamétrico, que é diretamente proporcional à concentração de ureia.

Os fatores que afetam o limite de detecção de biossensores baseados em enzimas incluem os limites de detecção inerentes aos eletrodos que suportam a camada enzimática, a cinética da reação enzimática e a velocidade de transferência de massa do substrato para a camada enzimática (SKOOG *et al.*, 2009).

Exemplos representativos de biossensores potenciométricos baseados em enzimas são mostrados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Biossensores potencimétricos baseados em enzimas.

Analito	Enzima	Reação
Ureia	Urease	$\text{Ureia} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$
Creatinina	Creatininase	$\text{Creatinina} \rightarrow \text{N-metilhidantoina} + \text{NH}_3$
L-Glutamina	Glutaminase	$\text{L-Glutamina} \rightarrow \text{Ácido glutâmico} + \text{NH}_3$
Adenosina	Adenosina deaminase	$\text{Adenosina} \rightarrow \text{Inosina} + \text{NH}_3$
Glicose	Glicose oxidase	$\text{Glicose} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Ácido glicônico} + \text{H}_2\text{O}_2$
Penicilina	Penicilinase	$\text{Penicilina} \rightarrow \text{Ácido penicilóico}$

Além do uso dos biossensores na área médica, o uso de dispositivos seletivos de detecção também é necessário em outras áreas como agricultura, processos industriais, monitoramento ambiental, indústria alimentícia, etc. Alguns exemplos de aplicações dos biossensores podem ser observados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Aplicações dos biossensores.

Aplicação/Analito	Elemento biológico	Referência	
Biomédica	Glicose	Glicose oxidase	ATANASOV <i>et al.</i> , 1997
	Colesterol	Colesterol oxidase	BRAHIM <i>et al.</i> , 2001
	Lactato	Lactato oxidase	YAO <i>et al.</i> , 2003
	Ureia	Urease	PIZZARIELLO <i>et al.</i> , 2001
	Etanol	Álcool oxidase	GUILBAULT <i>et al.</i> , 1995
	Oxalato	Oxalato oxidase	SEZGINTURK <i>et al.</i> , 2003
Indústria de alimentos	Frutose	Frutose desidrogenase	CAMPUZANO <i>et al.</i> , 2003
	Sulfito	Sulfito oxidase	ABASS <i>et al.</i> , 2000
	Metanol	Álcool oxidase	PRADA <i>et al.</i> , 2003
Ambiental	Pesticidas	Acetil colinesterase	CHOI <i>et al.</i> , 2001
	Metais pesados	<i>E. coli</i>	RASMUSSEN <i>et al.</i> , 2000
Farmacêutica	Progesterona	Anticorpos	GILLIS <i>et al.</i> , 2002
	Paracetamol	Peroxidases	VIEIRA <i>et al.</i> , 2003

Os biossensores podem ser considerados como uma ferramenta de análise alternativa aos métodos clássicos convencionais (como por exemplo a cromatografia líquida de alta eficiência) devido às suas características de especificidade, simplicidade, relativo baixo custo e resposta rápida (SASSOLAS *et al.*, 2012).

A natureza da amostra influencia a escolha da técnica analítica e da técnica de preparo a serem usadas. Muitas técnicas não toleram a presença de partículas e/ou suspensões e somente podem ser aplicadas em soluções verdadeiras, ou ainda requerem que o analito esteja concentrado, exigindo, assim, o tratamento prévio da amostra. Em amostras biológicas, como sangue, muitos componentes como eritrócitos e leucócitos precisam ser removidos antes da realização da análise (DAVIS *et al.*, 2007).

Amostras médicas são, frequentemente, misturas bastante complexas e requerem o uso de técnicas de análise de alta especificidade. Nesse caso, os biossensores são uma

opção visto que a interação do elemento biológico é altamente específica e não sofre interferência de outras substâncias, como acontece em outros métodos analíticos (CASTILLO *et al.*, 2004). A dispensabilidade do preparo da amostra também implica análises mais rápidas e de menor custo. Entretanto, a vantagem da seletividade dos biossensores é contraposta ao limite de estabilidade de muitas substâncias bioquímicas, as quais não permitem seu uso em ambientes agressivos.

A escolha do método de análise também deve basear-se no nível de detecção desejado (DAVIS *et al.*, 2007). Em alguns casos, os níveis de detecção requeridos para amostras ambientais são ordens de magnitude menores que os requeridos em amostras biológicas. Como, por exemplo, pesticidas presentes no meio ambiente que são progressivamente bioacumulados por espécies animais de uma cadeia alimentar. A detecção de patógenos em amostras também é uma questão desafiadora devido à necessidade de detecção em níveis de traços. A resposta à presença de apenas um analito específico resulta na sua determinação em baixos limites de detecção (FRADEN, 2003; BRUCNER-LEA, 2004).

A simplicidade de operação dos biossensores e a tendência de miniaturização dos mesmos têm permitido o crescente emprego destes dispositivos em campo, à beira do leito de um paciente ou em casa (WANG, 2001).

2.1.1. Elementos de Transdução

O transdutor é o elemento do sensor capaz de converter um efeito físico, químico ou biológico em um sinal elétrico, com alta sensibilidade e com mínima perturbação do sinal (LOWE, 2007).

A escolha do transdutor é baseada em três requisitos: adequação para adaptação ao material biológico imobilizado; especificidade para o analito de interesse, sendo capaz de detectar alguma variação específica que ocorra durante a reação biológica e; que a variação ocorra na faixa de concentração apropriada (MELLO, 2007). Outros aspectos também devem ser atendidos, como: frequência da resposta; compatibilidade com o meio de análise; exatidão; características elétricas (relação entre sinal e ruído, possibilidade de amplificação do sinal quando insuficiente) e condições de aplicação e robustez.

Além da classificação baseada no elemento biológico, os biossensores podem ser classificados de acordo com o seu sistema de transdução (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Transdutores usados em biossensores. (Adaptado de CAVALIERI, 2003).

Transdutor	Subdivisão
<i>Eletroquímico</i>	Amperométrico Potenciométrico Íon seletivo Transistor de Efeito de Campo (FET) Condutimétrico Voltamétrico
<i>Óptico</i>	Fibra óptica Ressonância de Plasma de Superfície (SPR) Fibra óptica SPR
<i>Calorimétrico</i>	Condução de Calor Isotérmico
<i>Acústico</i>	Onda Acústica de Superfície Microbalança piezocristal

Biossensores baseados em transdutores eletroquímicos são os mais comuns e mais frequentemente citados na literatura, pois são simples, sensíveis, confiáveis e de resposta rápida, possuem a vantagem de serem econômicos e a possibilidade de automação, permitindo sua aplicação em um grande número de amostras. Operam em condições em que não é necessário um pré-tratamento da amostra e permitem efetuar determinações em uma ampla faixa de concentração (THÉVENOT, 2001).

Os transdutores eletroquímicos são dispositivos que transformam informações sobre algum constituinte químico da amostra em sinal elétrico. Dependendo do princípio de mediação, os biossensores eletroquímicos podem ser subdivididos em amperométrico, condutimétrico e potenciométrico.

- Amperométrico

O biossensor amperométrico baseia-se na medida da corrente resultante da oxidação ou redução eletroquímica de espécies eletroativas. A medida é realizada com manutenção de potencial constante entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo de

referência. A corrente resultante é linearmente proporcional à concentração da espécie eletroativa (THÉVENOT, 2001).

Os biossensores amperométricos são confiáveis, de baixo custo (devido à simplicidade dos dispositivos e instrumentos) e são altamente sensíveis para aplicações clínicas, ambientais e industriais (CHAUBEY e MALHOTRA, 2002). São também mais rápidos, pois não precisam esperar que o equilíbrio termodinâmico seja obtido.

Pelo fato destes biossensores serem operados por difusão, apresentam uma faixa dinâmica pequena devido à cinética de saturação da enzima, os potenciais relativamente elevados podem oxidar espécies diferentes do composto de interesse e a corrente pode ser afetada pela velocidade com a qual o analito difunde-se até a superfície do eletrodo. Para superar estes inconvenientes, têm-se proposto: o uso de nanoestruturas que aumentem a eletroatividade entre os componentes do biossensor; o uso de membranas limitantes de difusão para manter as concentrações de substrato abaixo dos níveis de saturação da enzima e o uso de mediadores (PEREZ, 2000).

Os biossensores amperométricos representam a maioria dos dispositivos comerciais disponíveis atualmente, isto porque estes eletrodos são baseados em enzimas redox (SIGNORI e FATIBELLO-FILHO, 1994) e existe um grande número destas enzimas comercialmente disponíveis que podem atuar na detecção de diversos analitos de interesse.

- Potenciométrico

Os biossensores potenciométricos utilizam um eletrodo de referência e um eletrodo indicador, sensíveis a gases ou íons, ambos em contato com a amostra. Os biossensores baseados em eletrodos íons seletivos desenvolvem um potencial no eletrodo de trabalho por acumulação da carga, aumentando a densidade de carga superfície do eletrólito. Assim, em biossensores baseados em enzimas, por exemplo, espécies químicas ou íons são produzidas ou consumidas pelas enzimas durante a reação catalítica. Consequentemente, uma diferença de potencial é criada entre o eletrodo de referência e o eletrodo de íon-seletivo ou de trabalho, sendo transformada em um sinal mensurável (ARYA, 2008).

Biossensores potenciométricos têm sua medição afetada pela atividade de um dado íon em solução, por isso espécies que possam formar complexos com o íon de

interesse devem ser removidas ou mascaradas. Embora estes sensores tenham uma ampla faixa de medição, apresentam inconvenientes de responder a outros contaminantes (SILVA, 2011).

- **Condutimétrico**

O transdutor condutimétrico mede a variação da condutividade do eletrólito em uma célula eletroquímica (FRADEN, 2003). Desta forma, utilizam-se principalmente enzimas que produzem ou consomem espécies iônicas, em suas reações bioquímicas, alterando a condutividade global da solução.

Poucos biossensores condutimétricos têm sido desenvolvidos, em função de serem menos seletivos, de o sinal depender fortemente da temperatura e por não ser possível usar amostras sem diluição prévia. Muitas reações enzimáticas produzem uma variação de condutividade, mas somente poucas oferecem um sinal de magnitude estável (MELO, 2008).

2.1.2. Elementos Biológicos

A parte mais importante de um biossensor é o seu sistema de reconhecimento, pois esta determina a seletividade e a sensibilidade do dispositivo. A escolha do elemento biológico depende da natureza do analito alvo, de sua estabilidade no meio em que a detecção será feita e da possibilidade de imobilização no transdutor sem perda de atividade biológica. (SALGADO, 2001).

Uma das possíveis classificações dos biossensores é baseada no tipo de reconhecimento biológico. Muitas biomoléculas podem ser empregadas em biossensores, como enzimas, anticorpos, micro-organismos, tecidos, ácidos nucléicos, lectinas, entre outros. Os elementos biológicos mais comumente usados estão descritos a seguir.

- **Anticorpos**

Anticorpos são proteínas que possuem uma excepcional especificidade para os analitos e são os elementos de reconhecimento mais comumente empregados nos imunossensores (LUPPA, 2001).

Várias estratégias são utilizadas em imunossensores. Um dos métodos mais comuns emprega dois anticorpos, um que é imobilizado sobre a superfície do sensor e é utilizado para capturar o analito alvo, e outro, denominado marcador, empregado para detectar o analito capturado (Figura 2.3).

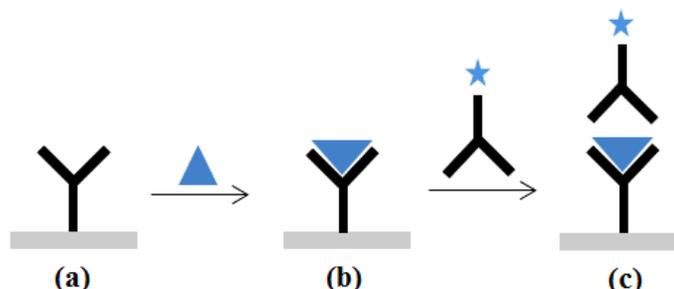


Figura 2.3. (a) Eletrodo contendo anticorpo imobilizado (Y); (b) ligação do analito de interesse (▼) ao eletrodo contendo o anticorpo; (c) associação do anticorpo marcado. (Adaptado de WILSON, 2006).

Tradicionalmente, radionuclídeos são usados como marcadores em imunoenaios, mas eles têm sido substituídos por marcadores mais apropriados, como as moléculas e as enzimas fluorescentes. Esses imunossensores fazem uso de uma grande variedade de métodos de detecção, como técnicas óticas ou eletroquímicas.

Os anticorpos apresentam as mesmas limitações das enzimas. Além disso, a interação do anticorpo com o analito pode não ser reversível e a regeneração da superfície pode requerer variações drásticas como baixo pH, alta força iônica, detergentes, etc. Entretanto, muitos estudos têm sido realizados para contornar essas limitações e desenvolver imunossensores de baixo custo e resposta rápida.

- Micro-organismos

Micro-organismos como bactérias, fungos e mesmo vírus podem ser utilizados em biossensores para detecção de moléculas específicas. O uso de micro-organismos como elementos de detecção em biossensores é baseado em medidas do consumo do analito, como oxigênio e dióxido de carbono, e em medidas eletroquímicas (CAVALIERI, 2003).

Os micro-organismos têm a vantagem de serem mais baratos que enzimas e anticorpos e podem ser mais estáveis. Todavia, são menos seletivos que as enzimas e apresentam maior tempo de resposta.

No que se refere às aplicações de biossensores baseados em micro-organismos, muitos esforços têm sido direcionados para a detecção de metais pesados (MICHELINI, 2012). Um exemplo deste tipo de biossensor é o produzido pela imobilização da bactéria *Escherichia coli* para detecção de arsênio em amostras de água (BUFFI *et al.*, 2011).

- Enzimas

As enzimas são proteínas com atividade catalítica, ou seja, diminuem a energia de ativação da reação e desta forma permitem o aumento da velocidade da reação. Os compostos transformáveis pela ação da enzima recebem o nome de substrato. As enzimas são específicas em relação à reação que catalisam e exibem alto grau de especificidade em relação ao substrato (Figura 2.4).

As forças atrativas que se estabelecem entre a estrutura tridimensional do centro catalítico (ou centro ativo) da enzima e o substrato permitem a aproximação entre os reagentes em uma orientação apropriada.

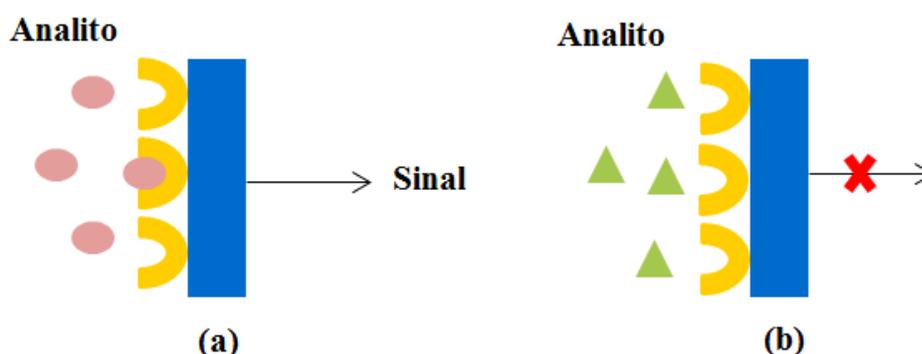


Figura 2.4. Representação da especificidade de um biossensor enzimático: (a) com detecção do analito; (b) sem detecção do analito.

As enzimas são os elementos biológicos mais usados em biossensores. A maioria das enzimas utilizadas catalisa reações de oxi-redução do tipo oxidase ou redutase, gerando um fluxo de elétrons que pode ser detectado eletroquimicamente

(LOWE, 2007). O interesse no uso das enzimas está no fato de que a atividade catalítica e a especificidade permitem detectar analitos em baixa concentração. Além disso, existe uma grande disponibilidade comercial das enzimas, com altos níveis de pureza.

Uma das limitações que envolvem o uso de enzimas é o seu alto custo, principalmente quando são empregadas em medidas contínuas ou de rotina (SKOOG *et al.*, 2009). Essa desvantagem levou ao uso de enzimas na forma imobilizada, na qual uma pequena quantidade de enzima pode ser utilizada repetidamente na análise de várias amostras.

Outras limitações incluem fatores que interferem em sua atividade biológica como pH, força iônica, inibidores químicos e temperatura. Muitas enzimas perdem atividade biológica quando expostas a temperaturas acima de 60 °C (CAVALIERI, 2003).

2.1.2.1. A Enzima Peroxidase de Raiz Forte (HRP)

Uma das enzimas amplamente utilizadas na confecção de biossensores é a peroxidase de raiz forte (HRP). A HRP é encontrada nas raízes da erva raiz forte (*Armoracia rusticana*), pertence à classe das peroxidases, enzimas que usam H₂O₂ ou outros peróxidos orgânicos para oxidar uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos (VEITCH, 2004).

A HRP (do inglês *horseradish peroxidase*; E.C. 1.11.1.7) é uma glicoproteína globular que contém vários tipos de isoenzimas, sendo a isoenzima C (HRP C) a mais abundante delas. Esta isoenzima é constituída de 308 resíduos de aminoácidos, um grupo prostético Fe(III) protoporfirina IX (grupo heme), dois íons cálcio e oito cadeias laterais neutras de carboidratos que se ligam à enzima através dos resíduos de asparagina (WELINDER, 1976).

Apresenta massa molar entre 40 e 45 kDa, sendo que a cadeia polipeptídica corresponde a 33.890 g mol⁻¹ e a porção de carboidratos é de 18 a 22% do total. A estrutura tridimensional da HRP está apresentada na Figura 2.5.

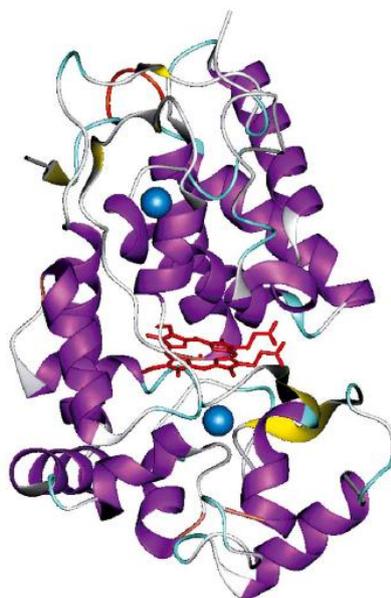


Figura 2.5. Representação tridimensional da estrutura cristalina da HRP isoenzima C. O grupo heme (em vermelho) localiza-se entre dois átomos de cálcio (esferas azuis). (Extraído de VEITCH, 2004).

A estrutura da HRP possui dois domínios similares e bem definidos. Cada domínio contém um íon cálcio que garante estabilidade estrutural e controla diretamente a atividade enzimática. Ambos os domínios fornecem um ambiente hidrofóbico onde o grupo heme se localiza, sendo que no domínio chamado proximal um resíduo de histidina (His170) ocupa a 5ª posição de coordenação do átomo de ferro, e o outro domínio, denominado domínio distal, contém uma histidina não coordenada (His42) (VEITCH, 2004).

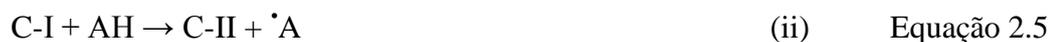
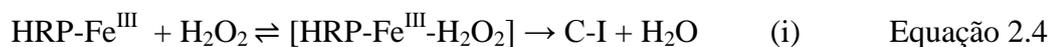
A HRP possui ponto isoelétrico (pI) de 7,2 (XIALING e LIN, 2009) e pH ótimo entre 5,0 e 6,5 (CHATTOPADHYAY e MAZUMDAR, 2000; MOHAMED *et al.*, 2011). Temperaturas acima de 50°C afetam sua estabilidade com perdas significativas de sua atividade enzimática (MOHAMED *et al.*, 2011). Além disso, este grupo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

A enzima HRP apresenta várias vantagens que permitem o seu uso em muitas aplicações analíticas como, por exemplo, a construção de biossensores amperométricos para a detecção de compostos fenólicos e catecólicos. As enzimas peroxidases encontram emprego na síntese de químicos aromáticos, na remoção de peróxido de

alimentos e água industrial (HAMID e REHMAN, 2009), oxidação de corantes sintéticos (KIM *et al.*, 2005). Além disso, as peroxidases são amplamente utilizadas na fabricação de biossensores enzimáticos. As hemo-proteínas, que incluem, além da HRP, citocromo c, hemoglobina, microperoxidase e mioglobina têm grande potencial de aplicação bioeletroquímica, principalmente no desenvolvimento de biossensores, devido a sua capacidade redox (WANG, 2005).

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

O ciclo catalítico básico da HRP, conforme apresentado na Figura 2.6, envolve três etapas: (i) a reação da enzima (HRP-Fe^{III}) com o H₂O₂, resultando em uma molécula de água e no composto I (C-I), uma forma oxidada da HRP (Fe^{IV}=O); (ii) a redução do composto I pela doação de um elétron proveniente do substrato AH, o que leva à formação do composto intermediário II (C-II) e; (iii) a redução do composto II pela doação de elétron proveniente de outra molécula de AH, levando ao estado de oxidação original do átomo de Fe da HRP:



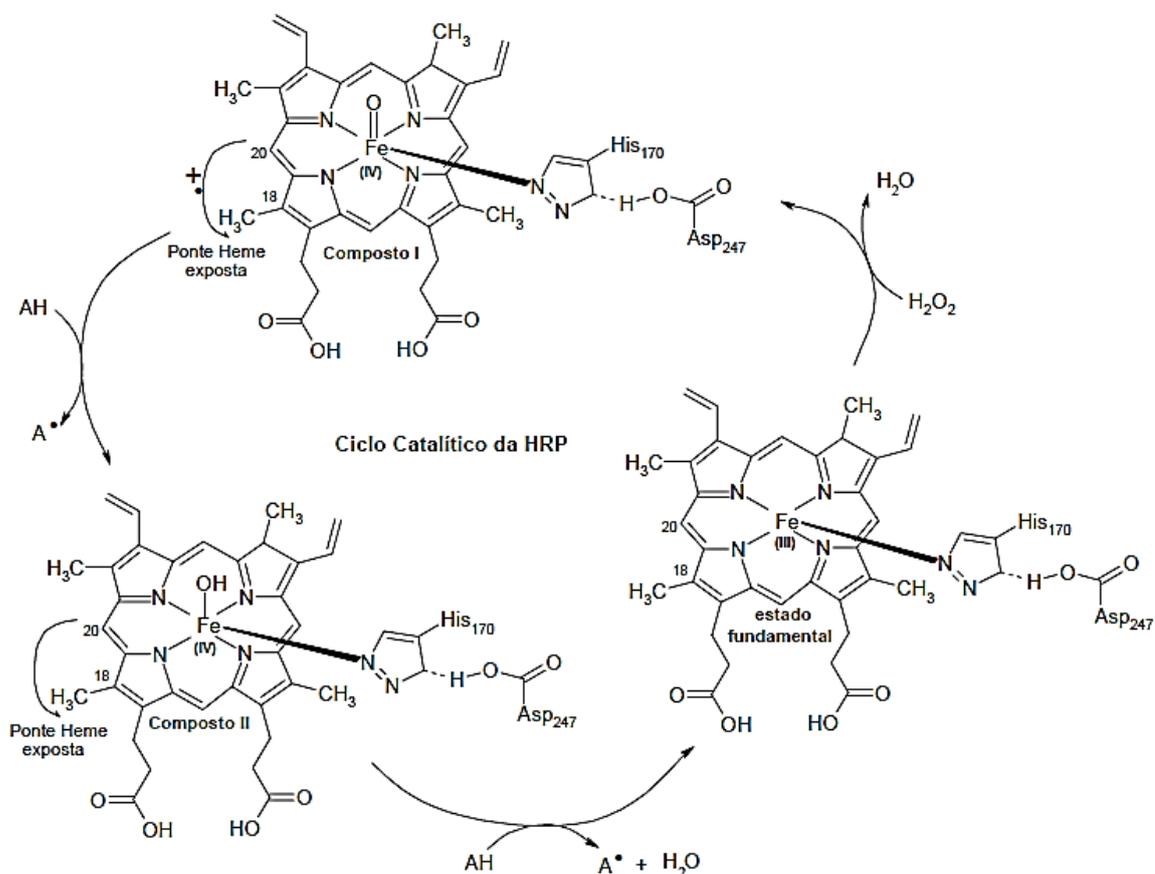


Figura 2.6. Mecanismo geral do ciclo catalítico da HRP na presença de H_2O_2 . (Extraído de NAVES, 2008).

Para o caso especial da HRP em contato elétrico direto com um eletrodo, a regeneração da enzima ao estado original do átomo de ferro pode ser alcançado na ausência de um substrato doador de elétrons. Nesse caso, dois elétrons são transferidos do eletrodo para o grupo heme da HRP em duas etapas:



Esse processo é comumente denominado como transferência eletrônica direta (DET). A transferência eletrônica direta tem sido estudada em eletrodos de diferentes materiais (SOVIC *et al*, 2011; FERANPOTOVA, 2004) tanto com o objetivo de estudar

o mecanismo cinético da HRP, quanto para estudar as aplicações bioeletrocatalíticas da HRP.

Como as reações (iv) e (v) ocorrem em potencial mais catódico do que o potencial formal de redução dos compostos I e II (790 e 770 mV vs. Ag/AgCl em pH=6, respectivamente), o ciclo bioeletrocatalítico descrito pelas reações (i), (iv) e (v) permite a redução do peróxido de hidrogênio em pequeno sobrepotencial, eliminando a detecção de espécies interferentes (SOVIC *et al.*, 2011).

A sensibilidade do biossensor baseado em transferência eletrônica direta da HRP depende criticamente do material do eletrodo e do método de imobilização da HRP no eletrodo (SOVIC *et al.*, 2011). Dentre os materiais disponíveis como suporte para imobilização da HRP, os materiais nanoestruturados apresentam destaque por suas altas áreas específicas e, conseqüentemente, pela alta quantidade de enzima que pode ser imobilizada por massa de suporte. Vários nanomateriais, incluindo nanopartículas de metais nobres (LI *et al.*, 2010; VILLALONGA *et al.*, 2011), sílica mesoporosa (CHEN *et al.*, 2009), nanomateriais baseados em TiO₂ (ZHANG *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2008), nanotubos de aluminossilicato (SUN *et al.*, 2010) e nanotubos de carbono (YU *et al.*, 2003; LYON *et al.*, 2008), foram investigados como suporte para imobilização da HRP e foram usados na construção de biossensores para a detecção de H₂O₂.

A eficiência dos biossensores enzimáticos depende fortemente da integridade da estrutura nativa da enzima, de forma que a imobilização é uma etapa crítica na construção desse tipo de biossensor. Várias estratégias de imobilização têm sido propostas na literatura, como adsorção, ligações covalentes, oclusão, ligações cruzadas e afinidade.

2.2. Imobilização do Elemento Biológico

A imobilização do elemento biológico é um fator chave no desenvolvimento de biossensores eficientes com desempenho apropriado, como estabilidade, altas sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade, e, ainda, tempo de resposta curto (SOTOMAYOR e KUBOTA, 2001).

As biomoléculas imobilizadas devem manter sua estrutura, sua função, reter sua atividade biológica após a imobilização e não desorver da superfície durante o uso do

biossensor. A forma de imobilização afeta a estabilidade e sensibilidade dos biossensores enzimáticos. Fatores como precisão das medidas, reprodutibilidade e tempo de vida do dispositivo são drasticamente influenciados pela estabilidade da enzima no suporte (SASSOLAS *et al.*, 2012).

Como o desempenho analítico do biossensor é fortemente afetado pelo processo de imobilização, muitos métodos têm sido estudados com o intuito de desenvolver estratégias eficientes de imobilização. Destacam-se: adsorção, ligação covalente, oclusão, ligações reticuladas ou afinidade (Figura 2.7).

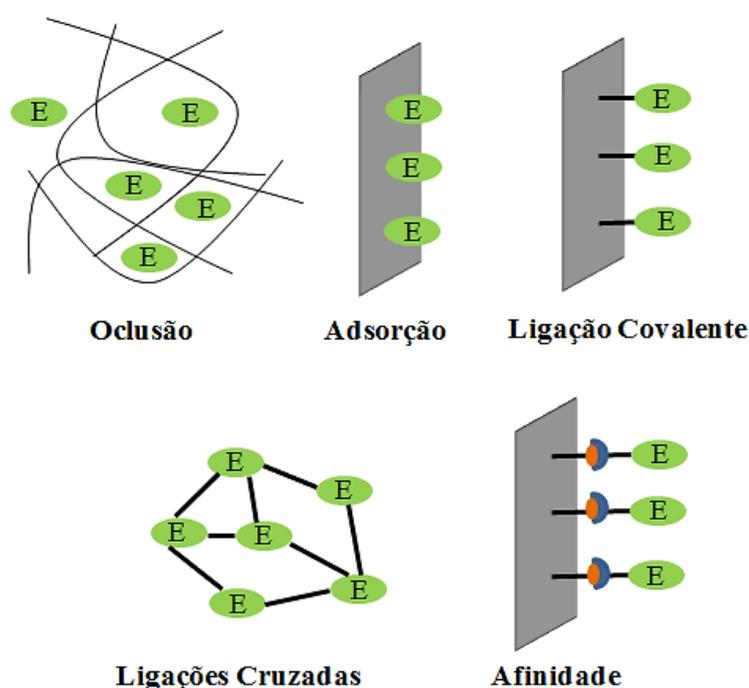


Figura 2.7. Representação esquemática dos métodos de imobilização de enzimas. E: enzima. (Adaptado de SASSOLAS *et al.*, 2012).

Cada método de imobilização apresenta vantagens e desvantagens (Tabela 2.4). A eficiência do biossensor será garantida se a biomolécula for imobilizada por um mecanismo que garanta a orientação da biomolécula, não interferindo em sua estrutura e conformação (ANSARI, 2012; KIM *et al.*, 2006). No caso de enzimas, o sítio ativo deve estar disponível, devendo ser observada a sua orientação e acessibilidade e que assegure a manutenção de sua atividade biológica (NORDE *et al.*, 2008).

Tabela 2.4. Métodos de imobilização. (Adaptado de SASSOLAS *et al.*, 2012).

	Natureza da ligação	Vantagens	Desvantagens
Adsorção	Ligações fracas	Simples e fácil Menor perda de atividade enzimática	Dessorção Adsorção não específica
Ligação Covalente	Ligações químicas entre grupos funcionais da enzima e do suporte	Estável Pequeno tempo de resposta Elevado tempo de vida	Matriz não regenerável
Oclusão	Incorporação da enzima em gel ou polímero	Diversos tipos de enzimas podem ser imobilizadas no polímero Sem reações químicas que afetem a atividade	Barreira de difusão Perdas da enzima
Reticulação	Ligação entre enzima e reticulante	Simples	Alta perda de atividade enzimática
Afinidade	Ligação de afinidade entre grupo funcional do suporte e marcador presente na proteína	Imobilização controlada e orientada	Necessita da presença de grupos específicos na enzima

2.2.1. Adsorção

A adsorção de enzimas em suportes sólidos é o método mais fácil e simples de imobilização física (CHOI, 2004). A enzima em solução é posta em contato com o suporte sólido por um período fixado de tempo. Os mecanismos de adsorção são baseados em ligações fracas como Van der Waals, interações eletrostáticas e/ou interações hidrofóbicas. Esta técnica não envolve nenhuma funcionalização do suporte e geralmente não afeta a atividade biológica da enzima.

Entretanto, as enzimas são facilmente dessorvidas do suporte em razão de variações de temperatura, pH e força iônica, o que resulta em um dispositivo com baixa estabilidade. Outro problema da técnica está relacionado à adsorção não específica de outras proteínas e substâncias (OSTUNI *et al.*, 2003; SASSOLAS *et al.*, 2012).

2.2.2. Ligação Covalente

A imobilização covalente de enzimas em suportes sólidos é um método bastante usado no desenvolvimento de biossensores enzimáticos. A ligação das enzimas ao suporte é feita através de grupos funcionais que elas contêm (grupos carboxílico, amino, hidroxílico, etc.) e que não são essenciais para a atividade catalítica. Trata-se de uma adsorção química, ou quimissorção.

Inicialmente, o suporte sólido passa pelo processo de ativação de sua superfície usando reagentes multifuncionais (por exemplo, glutaraldeído e carbodiimina) e, em seguida, a enzima é adicionada para formação da ligação, como pode ser visualizado na Figura 2.8. O suporte pode ser um material inorgânico, natural ou um polímero sintético (SASSOLAS *et al.*, 2012).

A escolha do reagente imobilizante tem como pré-requisito o conhecimento do aminoácido presente no sítio ativo da enzima, isto porque esse aminoácido não deve reagir com o grupo presente no suporte. Assim, se a enzima utiliza o grupo carboxílico do centro ativo para participar da catálise, é conveniente que a ligação covalente entre a enzima e o suporte se faça através do grupo amino (CASTILHO, 2003).

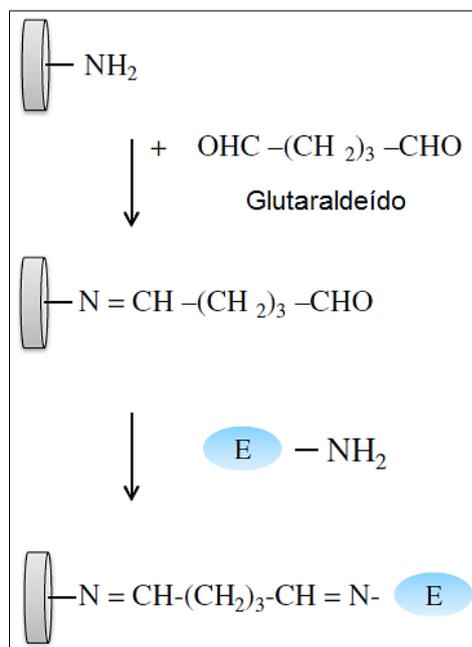


Figura 2.8. Imobilização covalente de enzima em superfície com grupo amino, utilizando reagente de acoplamento glutaraldeído. (Adaptado de SASSOLAS *et al.*, 2012).

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

2.2.3. Oclusão

A técnica de oclusão consiste em imobilizar a biomolécula em matrizes tridimensionais como um gel ou polímero. Entre as vantagens ressaltam-se que enzimas e aditivos podem ser depositados na mesma matriz e que a atividade da enzima é preservada durante o processo de imobilização. Todavia, a barreira de difusão através da estrutura do polímero aumenta o tempo de resposta, assim como a perda contínua de enzimas pelos poros, constituem duas grandes desvantagens do método (ZANIN, 1989; MATEO *et al.*, 2000).

2.2.4. Reticulação

Neste método de imobilização, as moléculas de enzima ligam-se entre si por pontes intermoleculares, formando uma ampla rede tridimensional. A ligação cruzada envolve a formação de ligações covalentes entre as enzimas, utilizando para tal agentes bi ou multifuncionais, como, por exemplo, glutaraldeído e hexametilenodiamina. (CASTILHO, 2003). É um método atrativo devido a sua simplicidade e à forte ligação química alcançada pelas moléculas. A principal desvantagem está na possibilidade de perda da atividade em razão de distorções na conformação da enzima durante a formação das reticulações.

2.2.5. Afinidade

Pela técnica de afinidade, as enzimas são imobilizadas de forma orientada e sítio-específica. A estratégia é criar ligações de afinidade entre um suporte ativo (como metais quelantes ou grupos ligantes) e um grupo específico (marcador) presente na sequência da proteína (histidina, resíduo de carboidrato, etc). Esse método permite o controle da orientação da biomolécula, o que reduz a possibilidade de desativação e/ou bloqueio do sítio ativo da enzima (SASSOLAS *et al.*, 2012).

Em resumo, a escolha da técnica de imobilização depende da natureza do elemento biológico e do analito que se deseja detectar. Um dos analitos que desperta interesse no desenvolvimento de biossensores é o peróxido de hidrogênio. Uma síntese das características e das técnicas de detecção do peróxido de hidrogênio é apresentada a seguir.

2.3. Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ou água oxigenada como é vulgarmente conhecido, quando puro é um líquido viscoso, transparente e tem odor característico. É solúvel em água em quaisquer proporções. Sua primeira comercialização data de 1800, e sua produção mundial aumenta a cada ano. Acredita-se que o peróxido de hidrogênio seja um dos reagentes mais empregados nas mais diversas aplicações (COOPER *et al.*, 1988; STEINER *et al.*, 1992).

Por ser versátil, o peróxido de hidrogênio é utilizado para as mais variadas finalidades como nas áreas médica, de alimentos, no monitoramento ambiental e de processos, dentre outros. Está presente em inúmeras reações biológicas como principal produto de várias oxidases, e é um parâmetro importante na quantificação desses bioprocessos (MATTOS *et al.*, 2003).

O peróxido de hidrogênio apresenta excelente propriedade oxidante, superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio. Através de catálise, pode ser convertido em radical hidroxila com reatividade inferior apenas ao flúor. Por esse motivo, o H₂O₂ tem sido usado nos processos de tratamento de efluentes conhecidos como “Processos Oxidativos Avançados”. Estes são baseados na geração do radical hidroxila para promover a degradação de vários compostos poluentes em pouco tempo (BENITEZ *et al.*, 2000).

Entre as aplicações envolvidas com o uso do peróxido de hidrogênio na forma isolada, têm-se controle de odores e controle de corrosão (MAAB *et al.*, 1995). A redução da demanda química e bioquímica de oxigênio (DQO e DBO) em efluentes industriais tem sido realizada com peróxido de hidrogênio há alguns anos (LARISCH e DUFF, 1997). Dentre as razões citam-se menores custos e maior eficiência do processo.

Pode ser empregado na oxidação de componentes orgânicos, como hidrólise de formaldeído, destruição de fenóis, pesticidas, solventes, plastificantes, entre outros (LIN e GUROL, 1996; BADELLINO *et al.*, 2006). Assim como na oxidação de compostos inorgânicos como cianetos, que são usados em vários processos de síntese química e metalúrgica e são altamente tóxicos (SWEILEH, 1996).

Na forma combinada, pode ser empregado em procedimentos de floculação e/ou precipitação pela oxidação de complexos metálicos e aumento do desempenho de floculantes inorgânicos (MATTOS *et al.*, 2003). Na indústria de papel e celulose, que é um dos setores que mais contribui para o processo de contaminação do meio ambiente por compostos organoclorados, o peróxido de hidrogênio é usado no tratamento dos efluentes gerados por reagir com as formas livres HClO e ClO⁻ (FREIRE *et al.*, 2000).

O tratamento de solos através da oxidação química de contaminantes (resíduo de petróleo, solventes, pesticidas) usando peróxido de hidrogênio tem sido explorado. O peróxido oxida os contaminantes em produtos mineralizados e oferece vantagens quando comparado aos métodos tradicionais no que se refere a preço, disponibilidade e rapidez do processo (MATTOS *et al.*, 2003; EVERSE, 1991).

O peróxido de hidrogênio também é empregado no controle de bioprocessos, como desinfecção e inibição no crescimento de bactérias. A adição de peróxido de hidrogênio ao leite se reporta ao seu efeito antibacteriano e sua função de dissimulação das más condições higiênico-sanitárias de obtenção, conservação e/ou transporte do leite. Neste sentido, a adoção dessa prática por produtores objetiva o prolongamento da vida útil do leite por eliminar ou inibir o desenvolvimento de bactérias deterioradoras deste produto (SILVA, 2011).

A determinação do peróxido de hidrogênio tem grande importância na área médica, pois sua presença deve ser monitorada para se evitar que as células sofram estresse (LARISCH e DUFF, 1997). Mesmo em concentrações micromolares, o peróxido de hidrogênio causa estresse oxidativo nas células, levando a danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial (HUA *et al.*, 2011, BARREIROS *et al.*, 2006). Estudos apontam sua relação como causa ou fator de agravamento de várias patologias (BARREIROS *et al.*, 2006).

Desta forma, a relação entre concentração de peróxido de hidrogênio e fisiologia humana tem atraído intensos estudos e a determinação precisa de peróxido de hidrogênio vem se tornando uma prática importante nos campos clínicos, ambiental e industrial, com especial interesse para detecção de baixas concentrações (HUA *et al.*, 2011).

2.3.1. Técnicas de Detecção do H₂O₂

Sejam nas utilizações do peróxido de hidrogênio ou nas suas considerações no meio ambiente, observa-se que é de suma importância que se desenvolvam métodos para sua determinação e/ou monitoramento (MATTOS *et al.*, 2003).

Desta forma, várias técnicas têm sido propostas para detecção do peróxido de hidrogênio, como quimiluminescência, fluorimetria, espectrofotometria, volumetria, cromatografia e métodos eletroquímicos. Com exceção dos eletroquímicos, os métodos citados são vulneráveis a espécies interferentes, requerem preparo de amostra e geralmente requerem o uso de reagentes de preços elevados (LI *et al.*, 2007, KAFI *et al.*, 2008, MATTOS *et al.*, 2003).

O uso dos métodos espectrofotométricos visando a determinação do peróxido de hidrogênio é baseado na oxidação de metais, reação com cromogênicos (na presença de catalisador) ou formação de complexos. A reação do peróxido de hidrogênio com titânio(IV) em soluções ácidas fornece um método para determinação espectrofotométrica em soluções aquosas. A medida é possível pela formação do complexo amarelo peroxititânio que absorve em 407 nm. Entretanto, o método é sujeito a um grande número de espécies interferentes, como fosfatos, que reagem com o titânio(IV) ou absorvem no mesmo comprimento de onda (CLAPP *et al.*, 1989).

Na área ambiental, muitos trabalhos têm sido realizados utilizando os métodos quimiluminescentes. A razão é que estes métodos são adequados para determinações de baixas concentrações, geralmente os limites de detecção são da ordem de 0,1 a 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (DÍAZ *et al.*, 1996). As reações baseadas em quimiluminescência, que pode ser definida como a emissão de luz (na região do ultravioleta, visível ou infravermelho) oriunda de uma reação química, podem ocorrer em todas as fases, mas é na fase líquida que observam-se maiores aplicações (TOWNSHEND, 1990).

ESCOBAR *et al.* (2000) apresentaram um método automatizado para a determinação de peróxido de hidrogênio em culturas de microalgas. O método foi baseado na reação de luminol e H₂O₂ usando Cr(III) como catalisador. Foram obtidos limites de detecção da ordem de 0,04 µmol L⁻¹. YUAN E SHILLER (2000) usaram o sistema luminol e H₂O₂, porém com o cobalto como catalisador e monitoraram os teores de peróxido de hidrogênio em águas de chuva. QIN *et al.* (1998) detectaram peróxido de hidrogênio pela reação de quimiluminescência com luminol e cobalto(II) numa coluna de troca iônica. Obteve-se um limite de detecção da ordem de 0,01 µmol L⁻¹, porém a presença de diferentes espécies causou interferência no sistema.

Métodos volumétricos são baseados na oxidação do peróxido de hidrogênio com permanganato e possuem limite de detecção de 300 ppm ou, aproximadamente, 0,01 µmol L⁻¹. (GUWY *et al.*, 2000). Apresentam o inconveniente de decomposição durante estocagem ou transporte, o que requer análise imediatamente após a coleta. Estudos com fluorimetria (HOLM *et al.*, 1987) e métodos cromatográficos também são citados na literatura para determinação do H₂O₂ (KAFI *et al.*, 2011).

As propostas fazendo uso de técnicas eletroquímicas se destacam por apresentarem boas seletividade e sensibilidade (limite de detecção da ordem de 0,1 µmol L⁻¹), amplo intervalo de determinação e rápida resposta do eletrodo. Além disso, não sofrem interferências em função da coloração das amostras.

2.3.2. Detecção Eletroquímica do H₂O₂

As primeiras detecções eletroquímicas do peróxido de hidrogênio foram baseadas na oxidação direta em eletrodos de platina ou carbono (MOODY *et al.*, 1986), entretanto, devido a elevados valores de potencial (em torno de 300 a 600 mV vs. Ag/AgCl), sofrem interferência de outras espécies eletroativas. Por este motivo, diversos procedimentos de modificações químicas e eletroquímicas nas superfícies dos eletrodos de trabalho têm sido pesquisados com a finalidade de diminuir o sobrepotencial de oxidação do peróxido de hidrogênio (MATTOS *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2012).

Neste contexto, observam-se estudos empregando hexacianoferrato de metais (Me-HCF) para modificar a superfície dos eletrodos. Como exemplo, cita-se o filme de Azul da Prússia ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), que age como um mediador de elétrons entre o eletrodo e o peróxido de hidrogênio presente em solução ou formado durante o curso de uma reação enzimática, sendo possível minimizar as espécies interferentes presentes em solução e obter sensores amperométricos seletivos a H_2O_2 (HUA *et al.*, 2011; MATTOS *et al.*, 2003).

Eletrodos de pasta de carbono modificados com hexacianoferrato de metais de transição (como níquel, cobre e cobalto) também têm sido reportados na literatura. Eletrodos de dióxido de titânio, ouro, carbono vítreo e pasta de carbono também foram modificados para a determinação de H_2O_2 (KIM *et al.*, 1999).

LEE *et al.* (1986) empregaram um microeletrodo de platina para a quantificação (*in vivo*) de peróxido de hidrogênio em ratos. O H_2O_2 tem sido avaliado em tecidos de animais predadores e até em seres humanos, pois se acredita que haja uma relação direta entre os distúrbios celulares e o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio (CIOLINO *et al.*, 1997). KIM *et al.* (1999) reportaram um sensor amperométrico para a determinação de peróxido de hidrogênio no intervalo de 0,1 a 1 mmol L^{-1} . Esses autores também empregaram este sensor como base para o biossensor que foi usado para a determinação de creatinina em fluidos biológicos.

A redução do potencial redox, seletividade para o H_2O_2 e intensificação do sinal do sensor pode ser alcançado com o uso de biossensores (GIANNOUDI *et al.*, 2006). KULYS (1992) propôs a determinação de peróxido de hidrogênio empregando-se a enzima catalase em um sistema automatizado baseado nos sistemas FIA (“flow injection analysis”). Essa enzima foi imobilizada em membrana à base de polietileno glicol sobre sensor sensível a oxigênio.

CAMPANELLA *et al.* (1992) desenvolveram um biossensor baseado em catalase para determinação de peróxido de hidrogênio em formulações farmacêuticas e cosméticos. YABUKI *et al.* (2000) propuseram a determinação de peróxido de hidrogênio empregando eletrodo de carbono vítreo modificado com ferroceno e a enzima peroxidase. O sensor apresentou tempo de resposta de 15 s, intervalo linear de até 10 mmol L^{-1} e limite de detecção da ordem de 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

2.4. Nanomateriais em Biossensores

O uso de nanomateriais em biossensores constitui uma recente ferramenta para aumentar o desempenho destes dispositivos de detecção. As perspectivas promissoras dos nanomateriais se devem às suas propriedades únicas. Nanomateriais, incluindo nanopartículas, nanofios e nanotubos, têm atraído considerável atenção para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos devido a características como alta área específica, baixa resistência à transferência de massa, biocompatibilidade, propriedades elétricas, mecânicas e térmicas (SASSOLAS *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2006).

A modificação de um material de base com nanomateriais pode levar a uma superfície com maior razão área por volume, transporte eficiente de elétrons e intensificação das propriedades ópticas, fazendo com que suas propriedades elétricas sejam fortemente influenciadas por mínimas perturbações, o que pode resultar em grande aumento da sensibilidade (WELCH e COMPTON, 2006; YOGESWARAN e CHEN, 2008).

Nanomateriais preparados a partir de metais, carbono ou espécies poliméricas permitem desenvolver biossensores com elevada sensibilidade e estabilidade. Sua excelente condutividade permite aumentar a transferência eletrônica entre o centro redox de proteínas e a superfície do eletrodo. Por causa de sua alta relação superfície-volume e facilidade no transporte de elétrons, suas propriedades elétricas são fortemente influenciadas por perturbações mínimas no sistema. Esta propriedade fornece aos biossensores rapidez na detecção eletrônica direta, além de sensibilidade na detecção (WANEKAYA *et al.*, 2007; WANG, 2005).

CHEN *et al.* (2011a) desenvolveram uma nova estratégia para fabricação de um sensor para detecção do peróxido de hidrogênio ao eletrodepositarem nanopartículas de prata na superfície de eletrodo de carbono vítreo. O sensor apresentou um limite de detecção de $2,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o H_2O_2 em um potencial de $-0,3 \text{ V}$ (*versus* eletrodo de calomelano saturado). Em uma avaliação sobre a influência de substâncias interferentes, o ácido ascórbico não teve influência na detecção do peróxido de hidrogênio.

LI *et al.* (2007) modificaram a superfície de um eletrodo de carbono vítreo com nanofibras de carbono de cerca de 25 nm de diâmetro. O eletrodo apresentou limite de detecção de $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ em um potencial de $0,65 \text{ V}$ vs Ag/AgCl no eletrodo de trabalho.

Todos os dados revelam que os desempenhos analíticos para os sensores amperométricos são comparáveis, conseguindo-se baixos limites de detecção. No entanto, em alguns trabalhos, espécies interferentes afetam a determinação do H₂O₂, seja pelo potencial aplicado ou provavelmente a habilidade catalítica de alguns nanomateriais em reagir com as substâncias interferentes (LI *et al.*, 2010).

Devido à biocompatibilidade, menores limites de detecção podem ser conseguidos por melhorar a estabilidade da enzima, além de operar em um potencial mais próximo do potencial redox da enzima, evitando reações com interferentes (LAURENT *et al.*, 2008; WANG, 2005).

Nanomaterias são também conhecidos por sua alta área específica para imobilizar proteínas (LUO *et al.*, 2006). Além disso, a adsorção direta de enzimas na superfície do eletrodo frequentemente resulta na desnaturação da proteína e perda da bioatividade que podem ser evitadas se a enzima for primeiramente adsorvida no nanomaterial antes de ser depositada no eletrodo (LIU *et al.*, 2005).

Diversos tipos de biossensores enzimáticos baseados em nanomateriais têm sido reportados. As enzimas podem ser imobilizadas em nanomateriais funcionalizados por adsorção (WANG *et al.*, 2009) ou covalência (XUE *et al.*, 2003). Em outros casos, enzimas e nanomateriais podem ser incorporados em um polímero (WANG e MUSAMEH, 2005) ou em eletrodos de pasta de carbono.

JIA *et al.* (2008) desenvolveram um biossensor para detecção de glicose usando glicose oxidase e nanotubos de carbono incorporados em uma matriz de pasta de carbono. Os resultados mostraram boas sensibilidade e estabilidade do biossensor com detecção de glicose acima de 20 mmol L⁻¹.

CAO *et al.* (2008) desenvolveram um biossensor para detecção de H₂O₂ através da imobilização da HRP em nanotubos de carbono. A HRP foi imobilizada covalentemente utilizando o glutaraldeído como reagente de acoplamento. O sistema foi imobilizado em um eletrodo de ouro. O biossensor apresentou limite de detecção de 0,5 μmol L⁻¹ para detecção amperométrica do H₂O₂.

LIU *et al.* (2014) adsorveram azul de metileno, um mediador de elétrons, e HRP em nanocápsulas de grafite para construção de biossensor para detecção de peróxido de

hidrogênio. As nanocápsulas modificadas foram adsorvidas em eletrodo de carbono com auxílio de uma solução de recobrimento composta por Nafion e etanol. A plataforma demonstrou capacidade de detecção do H_2O_2 menor que $1 \mu\text{mol L}^{-1}$.

As nanoestruturas de titanato têm sido frequentemente propostas como interface para a imobilização de biomoléculas (MATHUR *et al.*, 2009). Nanopartículas, nanotubos e nanofios, têm sido usadas na construção de biossensores contendo enzimas, anticorpos, micro-organismos e DNA (QIU *et al.*, 2011). Os biossensores baseados nesses materiais têm alcançado elevada sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez na detecção de compostos químicos e bioquímicos como glicose, peróxido de hidrogênio e células cancerosas, em razão de suas propriedades de não toxicidade, alta área superficial, alta adsorvidade, alta uniformidade e excelente biocompatibilidade.

A seguir, serão apresentadas as propriedades das nanoestruturas de titanato e de seu precursor, o dióxido de titânio.

2.4.1. Dióxido de Titânio

O dióxido de titânio (TiO_2) é um dos óxidos metálicos mais estudados devido às suas características notáveis como estabilidade térmica e química, não toxicidade, biocompatibilidade, alto índice de refração, o que possibilita sua aplicação em múltiplas e diferentes áreas. O TiO_2 tem sido usado na construção de células solares, de sensores de gás, em fotocatalise, em degradação e processos de adsorção de moléculas orgânicas, como pigmento, como anodo em baterias de íon-lítio, etc. (RIVERA *et al.*, 2011).

Uma unidade octaédrica é o bloco básico da estrutura do dióxido de titânio, formada por um átomo de titânio envolvido por seis átomos de oxigênio (ALVES, 2009). Tanto as titânias quanto os titanatos lamelares são constituídos das mesmas unidades básicas – os octaedros de TiO_6 – que se conectam por vértices e arestas e se arranjam de várias maneiras no espaço dando origem aos diferentes polimorfos de dióxido de titânio e distintas formas de titanatos lamelares (MORGADO, 2007). Os polimorfos mais conhecidos do TiO_2 são o anatásio e rutilo (tetragonais) e a bruquita (ortorrômbica). Essas fases estruturais diferem entre si pela disposição das unidades octaédricas (Figura 2.9).

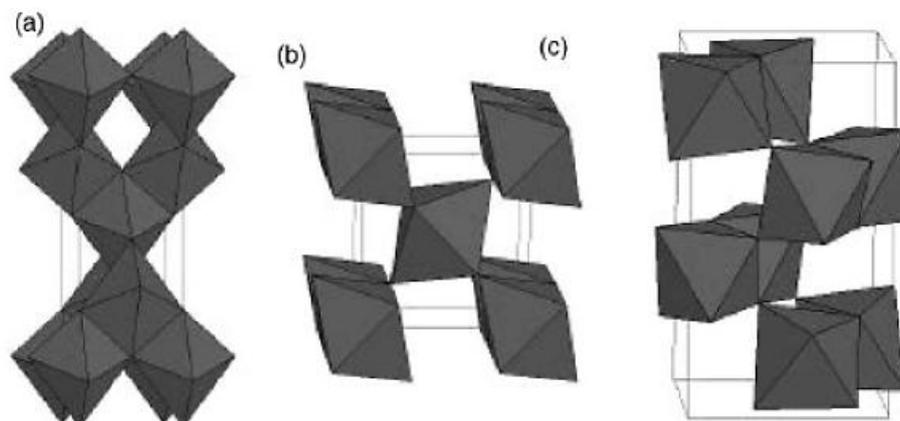


Figura 2.9. Estruturas cristalinas de (a) anatásio, (b) rutilo e (c) bruquita. (Extraído de Carp *et al.*, 2004).

Os titanatos podem ser derivados do TiO_2 , adicionando-se a sua estrutura átomos de outros elementos, como metais alcalinos. A maioria dos titanatos possui uma estrutura lamelar na qual os octaedros de TiO_6 se arranjam formando camadas compactas (Figura 2.10). Como os cátions de metais alcalinos acomodam-se entre essas camadas, a separação entre as mesmas é definida pelo tamanho do cátion. Esta estrutura lamelar facilita a troca iônica nos titanatos, podendo-se reduzir as distâncias interlamelares e formar estruturas para diferentes finalidades. Por exemplo, pode-se obter um titanato protônico do tipo $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ a partir do titanato sódico $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$. Nesta mudança, há uma redução da distância interlamelar de 0,84 nm para 0,79 nm (ALVES, 2009; ANDERSSON, 1961; FEIST & DAVIES, 1992).

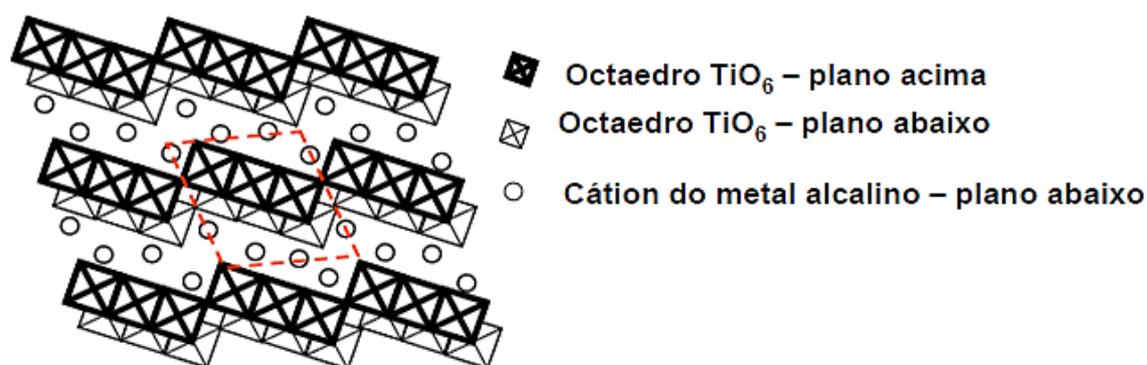


Figura 2.10. Esquema da estrutura lamelar do $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$. (Adaptado de MORGADO, 2007).

2.4.2. Nanoestruturas de Titanato

Nanoestruturas de TiO_2 e de titanatos podem ser sintetizadas por vários métodos, tais como o método sol-gel, deposição eletroquímica, deposição química de vapor, deposição física de vapor, síntese por combustão, anodização e tratamento alcalino hidrotérmico (BAVYKIN *et al.*, 2006).

KASUGA *et al.* (1999) propuseram uma alternativa simples e eficiente para a síntese de nanoestruturas baseadas em TiO_2 . Essa síntese consiste no tratamento hidrotérmico do dióxido de titânio em solução alcalina de NaOH sob aquecimento e pressão, com posterior lavagem com água e ácido diluído. O material resultante possuía morfologia de tubos com diâmetro de 7 a 10 nm e comprimento da ordem de 100 nm.

O mecanismo de formação dos NTT ainda não foi totalmente elucidado. Acredita-se que a combinação de alta pressão e temperatura potencializam o caráter corrosivo dos íons OH^- em solução, dissolvendo o TiO_2 , que posteriormente é convertido em nanoestruturas por formação de pequenas camadas em forma de folhas que se desprendem dos grãos de TiO_2 e depois se enrolam formando tubos ou formação dos tubos diretamente a partir de íons de TiO_3^+ em solução (ALVES, 2009).

Diversos trabalhos investigaram o papel das variáveis do método hidrotérmico de KASUGA e colaboradores, tais como temperatura, duração do tratamento, concentração da solução alcalina, fase do dióxido de titânio utilizado como matéria-prima, processos de lavagem e neutralização do material produzido (CHEN *et al.*, 2003; YUAN & SU, 2004; YU & ZHANG, 2004).

Observa-se que em todos os tipos de síntese, as condições experimentais são importantes e afetam a morfologia do material resultante. Quanto à área específica, vários autores reportam que há um aumento considerável com incrementos de até 500% em relação à área da titânia de partida (MORGADO, 2007). Alguns autores relatam que temperaturas mais altas de reação podem levar à formação de estruturas como nanofios (BAVYKIN *et al.*, 2006; YUAN & SU, 2004; JOSHI *et al.*, 2005).

Como pode ser visualizado na Figura 2.11, os nanofios ou nanofibras são caracterizados por uma morfologia alongada com clara definição da direção de crescimento, no entanto sua seção transversal não é necessariamente uniforme e bem

definida. Os nanobastões podem ser considerados como uma variação dos nanofios com menor relação comprimento/diâmetro e maior rigidez. Já os nanotubos exibem morfologia unidimensional conforme a dos nanofios, porém vazada (oca) com paredes simples ou multilamelares (MORGADO, 2007).

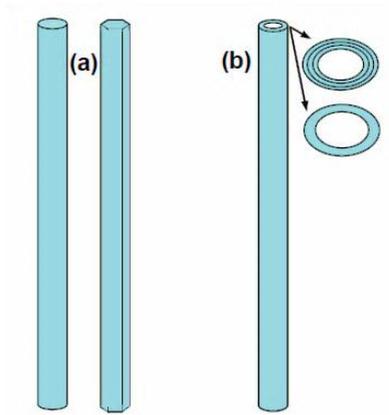


Figura 2.11. Morfologia de (a) nanofio/nanobastão/nanofibra; (b) nanotubo. (Adaptado de MORGADO, 2007).

Estudos têm demonstrado que a modificação de eletrodos com nanoestruturas de titanato pode aumentar o transporte direto de elétrons em reações de superfície no eletrodo (TOKUDOME e MIYAUCHI, 2005; LIU *et al.*, 2007), podendo ser empregado na confecção de biossensores e melhorando o seu desempenho. Nestes casos, os NTT desempenham um papel de condutor e suporte inerte.

Eletrodos modificados com nanoestruturas de titanato podem reter a bioatividade de enzimas e fornecer estabilidade à enzima. A Tabela 2.5 mostra o desempenho de biossensores enzimáticos baseados em nanoestruturas de titânia e titanato reportados na literatura. Vários tipos de enzimas, como glicose oxidase (GOx), *horseradish peroxidase* (HRP), tirosinase, entre outras, podem ser imobilizadas em nanomateriais de titanato.

Tabela 2.5. Biossensores enzimáticos baseados em nanoestruturas de TiO₂.

Biossensor	E (V vs Ag/AgCl)	Faixa linear (μmol L ⁻¹)	LD (μmol L ⁻¹)	Referência
Nanofibras TiO ₂ /Quitosana/GOx	0,6	10 – 6980	10	TANG <i>et al.</i> , 2010
Nanotubos TiO ₂ /HRP	-0,5	11 – 2000	1,2	LIU e CHEN, 2005
Nanotubos TiO ₂ /GOx	-0,1	15 – 4000	5,0	BENVENUTO <i>et al.</i> , 2009
Nanotubos TiO ₂ /Hemoglobina	-0,244	0,5 – 100	0,1	XIAO <i>et al.</i> , 2007
Nanotubos TiO ₂ /Au/HRP	-0,4	5 – 1000	2,1	LIU <i>et al.</i> , 2012
Nanopartículas TiO ₂ /Tirosinase	-0,15	0,12 - 260	0,10	YU <i>et al.</i> , 2003

YU *et al.* (2003) desenvolveram biossensor amperométrico para detecção de fenol pela imobilização de tirosinase em nanopartículas de TiO₂ obtidas através do método sol-gel. O fenol pode ser oxidado por oxigênio dissolvido na amostra em presença de tirosinase imobilizada. O biossensor apresentou faixa linear de $1,2 \times 10^{-7}$ a $2,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

BENVENUTO *et al.* (2009) concluíram que nanotubos de titanato fornecem excelentes matrizes de imobilização para glicose oxidase e os biossensores resultantes apresentam baixo limite de detecção ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), alta sensibilidade ($36 \mu\text{A L mmol}^{-1}$) e boa reprodutibilidade na detecção de glicose. A utilização de nanotubos de titanato demonstrou algumas vantagens na imobilização da enzima mioglobina (Mb) e melhoria da taxa de transferência de elétrons (LIU *et al.*, 2005). LIU *et al.* (2005) verificaram que grupos hidroxil presentes na superfície dos NTT, a carga da superfície e a morfologia tubular dos NTT desempenham papel importante para a ligação da proteína.

VITICOLI *et al.* (2006) imobilizaram GOx e HRP na superfície de nanoestruturas de titanato. O biossensor eletroquímico apresentou um par de picos voltamétricos bem definido e quasi-reversível. A transferência eletrônica entre as enzimas e o eletrodo foi aumentada em razão da presença do nanomaterial.

NICOLINI (2013) desenvolveu um biossensor baseado na enzima HRP e NFT para determinação do H₂O₂. O biossensor exibiu baixo potencial de redução, em torno de -0,38 V vs Ag/AgCl em pH 7,0, constante de transferência de elétrons de $3,5 \text{ s}^{-1}$, faixa linear de 250 a $6.760 \mu\text{mol L}^{-1}$, e limite de detecção de $27,24 \mu\text{mol L}^{-1}$.

2.5. Eletrodos Impressos

Sensibilidade, seletividade, estabilidade, precisão, resposta rápida, facilidade de uso, baixo custo e robustez são as características mais importantes almejadas no desenvolvimento de sensores. Baixo custo e facilidade de uso são determinantes no desenvolvimento de versões comercializáveis de sensores para o público em geral (NASCIMENTO e ANGNES, 1998).

A tecnologia de *screen-printing*, também conhecida como *silk screen*, parece ser uma das mais promissoras tecnologias que permitem a produção simples, rápida e barata de sensores (LEDRU *et al.*, 2006). Ao mesmo tempo que possibilita a produção em massa de eletrodos a um custo reduzido, é simples e apropriada para a produção de eletrodos descartáveis.

O Eletrodo Impresso (EI), ou *Screen-Printed Electrode* (SPE), é o tipo de sensor mais apropriado para análises *in situ* devido à baixa energia necessária em seu uso, resposta rápida, alta sensibilidade e habilidade de operar em temperatura ambiente (HORI *et al.*, 1997).

Um dos principais aspectos dos EIs, que os tornam atrativos quando se busca o desenvolvimento de sensores comerciais, é a possibilidade de total automação na fabricação de um sistema completo contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência impressos no mesmo suporte. Essa característica, associada à simplicidade de elaboração e às inúmeras possibilidades de modificação dos EIs, abre um vasto campo de aplicação para esses eletrodos. As modificações incluem, por exemplo, a imobilização de componentes biológicos para o desenvolvimento de biossensores. (LI *et al.*, 2012; NASCIMENTO e ANGNES, 1998).

2.5.1. Preparo dos Eletrodos Impressos

O processo de *screen-printing* consiste na deposição de camadas de tinta em um suporte inerte, geralmente de PVC ou cerâmica de alumina. A tinta é depositada com auxílio de uma tela, que define a geometria do eletrodo. O processo pode ser feito manualmente ou por máquinas. A etapa final da impressão geralmente consiste na aplicação de uma camada de material isolante para definir uma área a ser usada como

contato elétrico em uma extremidade e outra área para ser a superfície do eletrodo na outra extremidade, como pode ser visualizado na Figura 2.12. (LOMILLO *et al.*, 2009).

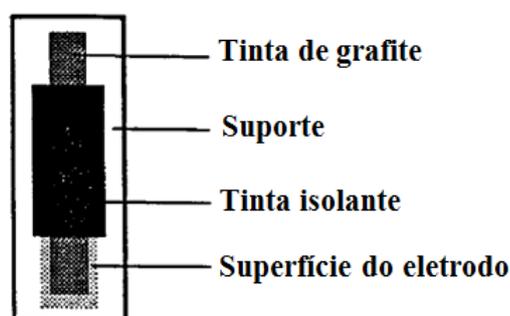


Figura 2.12. Esquema de um sensor de grafite preparado por *screen-printing*. (Adaptado de NASCIMENTO e ANGNES, 1998).

Os eletrodos impressos foram inicialmente confeccionados com tintas condutoras e isolantes comerciais desenvolvidas para aplicações na elaboração de circuitos impressos na área de eletrônica. Posteriormente, começaram a surgir novas formulações destinadas especificamente à confecção de EIs. A razão para isso é que a preparação completa da tinta permite o controle da composição e a elaboração de formulações com propriedades específicas para viabilizar e otimizar, por exemplo, a imobilização de um componente biológico no caso de biossensores. Eletrodos modificados podem ser elaborados através da modificação dos componentes que serão usados na fabricação da tinta ou adicionando aditivos à tinta já preparada, ou mesmo após a impressão do eletrodo pela modificação de sua superfície, usando métodos convencionais (NASCIMENTO e ANGNES, 1998; NEWMAN *et al.*, 1995).

A composição das tintas compreende basicamente um material inerte de elevada condutividade como grafite de alta pureza, um aglutinante como o polímero acetato de celulose e um sistema solvente como ciclohexanona-acetona. As tintas também devem apresentar características como viscosidade, aderência, flexibilidade e baixa resistividade elétrica. A viscosidade depende da natureza do aglutinante e do sistema solvente utilizado. O sistema solvente deve garantir volatilidade adequada para prolongar o tempo de evaporação e também pode contribuir para melhorar a fixação do filme ao suporte. A flexibilidade da tinta é um fator importante para evitar a formação de rachaduras na superfície do eletrodo. Outro fator desejável é que a tinta apresente menor resistividade elétrica possível, o que está relacionado com a porcentagem de

material condutor, aglutinante e outros aditivos. Portanto, no preparo da tinta, devem-se levar em conta todos os fatores que determinam o desempenho final do sensor, desde a viscosidade da tinta até, por exemplo, a atividade enzimática do biossensor (ROHM *et al.*, 1996; HOWER *et al.*, 1996).

Hart *et al.* (1990) propuseram uma tinta que combina o uso de acetato de celulose como aglutinante e ciclohexanona-acetona como sistema solvente. Desde então, essa composição tem sido largamente utilizada na elaboração de biossensores impressos em suportes de PVC (GILMARTIN *et al.*, 1994; WRING *et al.*, 1992; NASCIMENTO e ANGNES, 1998). O sistema solvente assegura uma forte aderência das partículas de grafite ao suporte de PVC. A ciclohexanona contribui para aumentar o tempo de evaporação, enquanto o acetato de celulose confere uma superfície de grafite flexível, que previne a formação de fissuras se o eletrodo for flexionado levemente.

Como dito anteriormente, os eletrodos já impressos também podem ser facilmente modificados. Diversas fontes comerciais disponibilizam EIs com diferentes configurações e materiais. Em configurações de três eletrodos são usadas tintas de carbono e tintas metálicas de Au, Pt, Ag ou outro metal para imprimir os eletrodos de referência e auxiliar juntamente com o eletrodo de trabalho.

A modificação consiste em acoplar espécies químicas ativas à superfície do eletrodo de trabalho impresso. Quanto às possibilidades de modificação, os EIs se assemelham aos eletrodos de pasta de carbono, uma vez que, em princípio, todos os artifícios usados para a modificação dos eletrodos de pasta de carbono se adequam aos EIs. Diversas modificações têm sido reportadas e incluem o uso de metais nobres, nanomateriais inorgânicos, enzimas, DNA, entre outros. As funções de cada um desses modificadores são bem estabelecidas e estudadas em detalhes na literatura (LI *et al.*, 2012; SOUZA, 1997; NASCIMENTO e ANGNES, 1998).

2.5.2. Biossensores Impressos para Detecção do H₂O₂

No preparo de biossensores impressos enzimáticos, diferentes configurações de imobilização desses elementos biológicos têm sido usadas. De modo geral, as configurações podem ser classificadas em três grupos. A primeira configuração é

baseada na deposição manual de camadas no eletrodo já impresso. Para a imobilização do material biológico, são usadas as técnicas convencionais de imobilização (adsorção, ligações cruzadas, oclusão, etc.) que são feitas manualmente ou por eletrodeposição, mas não são impressas (Figura 2.13a).

A segunda configuração consiste em imprimir tintas contendo a enzima. A impressão se dá nos eletrodos previamente impressos. A principal diferença dessa configuração para a primeira configuração é que a deposição do material biológico não é manual, mas por impressão (Figura 2.13b).

Na terceira configuração, enzimas e outros materiais como grafite, catalisadores, estabilizadores, são misturados formando uma tinta, chamada biocompósita, que é impressa no suporte. Neste caso, o biossensor é construído em uma única etapa (Figura 2.13c). Embora seja a configuração mais rápida e simples, requer uma otimização complexa do preparo da tinta tendo em vista as suas propriedades reológicas, o seu comportamento eletroquímico e a atividade eletrocatalítica dos materiais biológicos.

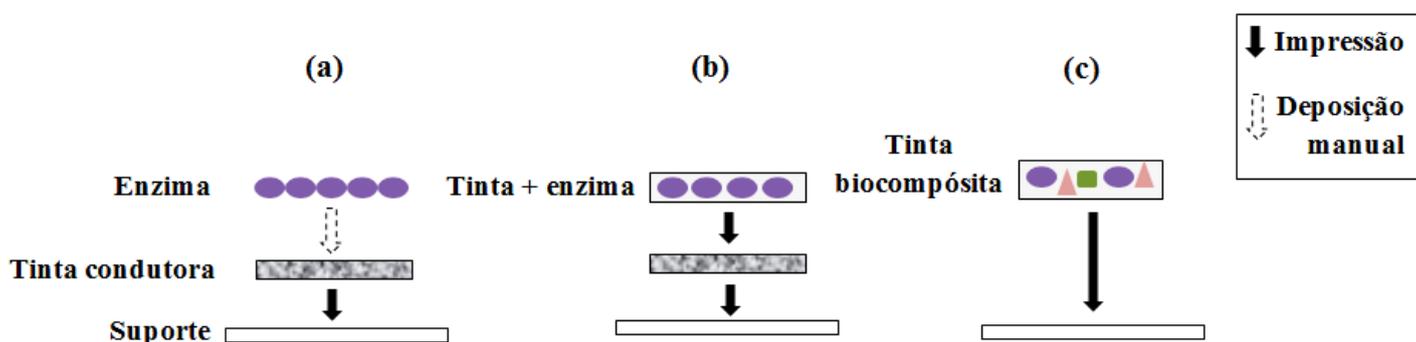


Figura 2.13. Configurações usadas no preparo de biossensores impressos. (a) Deposição manual; (b) Impressão de tinta contendo enzima; (c) Impressão de tinta biocompósita. (Adaptado de SIRVENT *et al.*, 2000).

Em relação às técnicas convencionais usadas para deposição de enzimas em eletrodos impressos, a adsorção é o procedimento mais simples e rápido. A adsorção física baseada nas forças de atração de Van der Waals entre a enzima e a superfície do eletrodo de trabalho (geralmente grafite) é o método mais usado devido a sua simplicidade. Por essa razão, o método é geralmente usado como um teste preliminar para futuras configurações mais complexas. A principal desvantagem do método, como

já foi mencionada, é que as forças de interação são fracas e podem resultar em perdas do material biológico dependendo das condições experimentais como pH, força iônica, solvente e temperatura (SIRVENT *et al.*, 2000).

O método de adsorção foi utilizado por TENG *et al.* (2009). Em eletrodos impressos de carbono foi gotejada uma solução de HRP e Nafion[®] e deixada secar em temperatura ambiente. A finalidade do Nafion[®] é prevenir a lixiviação dos componentes do biossensor. O Nafion[®] também é comumente usado para dispersar nanomateriais e imobilizar enzimas, devido a sua excelente capacidade de formação de filmes, boa condutividade elétrica, não toxicidade, biocompatibilidade, permeabilidade e estabilidades mecânica e química (YIN *et al.*, 2010). Os resultados voltamétricos demonstram um par de picos redox em -0,33 V *vs* eletrodo de calomelano saturado, faixa linear de detecção de H₂O₂ de 5,98 a 35,36 μmol L⁻¹ e limite de detecção de 0,48 μmol L⁻¹.

GAO *et al.* (2004) propuseram um método de imobilização envolvendo inserção de grupos amino em eletrodos impressos de carbono por eletro-oxidação de tionina. O SPCE modificado com tionina foi então tratado com solução aquosa de glutaraldeído. Posteriormente, o SPCE/THI/GLU é imerso em solução de HRP, o que permite que a enzima se ligue ao glutaraldeído através de ligações covalentes. O biossensor apresentou faixa linear de detecção entre 5 e 65 μmol L⁻¹ e limite de detecção de 0,5 μmol L⁻¹.

PALANISAMY *et al.* (2012) combinaram o método de adsorção com eletrodeposição para construção de um biossensor impresso baseado em óxido de grafeno e HRP. Uma solução de óxido de grafeno e HRP foi gotejada em eletrodo impresso de carbono e após secagem, o eletrodo modificado foi transferido para uma solução tampão PBS (pH=5) na qual o filme GO-HRP foi eletroquimicamente reduzido a ERGO (óxido de grafeno reduzido)-HRP por voltametria cíclica. De acordo com os autores, o biossensor apresentou boas propriedades eletroanalíticas frente a detecção amperométrica de H₂O₂, com faixa linear de detecção de 9 a 195 μmol L⁻¹.

TANGKUARAM *et al.* (2007) desenvolveram um biossensor em que nanopartículas de ouro e HRP foram dispersos em matriz de quitosana. O eletrodo impresso de carbono foi inserido na mistura e um potencial foi de -2,0 V foi aplicado no

mesmo. A matriz de quitosana foi, então, juntamente com HRP e NpAu, depositada na superfície do eletrodo. O biossensor SPCE/CHIT/NpAu/HRP demonstrou faixa linear de detecção para o peróxido de hidrogênio de 10 a 11.300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 0,65 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

LOMILLO *et al.* (2011) construíram um biossensor baseado em HRP para detecção da micotoxina OTA. O preparo começa com a impressão dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar em um suporte, usando para isso tintas comerciais de carbono e prata. Em seguida, a enzima foi adicionada à tinta de carbono comercial na proporção de 0,4% (m/m). A mistura foi sonicada e imediatamente impressa no eletrodo de trabalho.

Baseados no processo de uma única etapa, LEDRU *et al.* (2006) desenvolveram um eletrodo impresso de carbono modificado com HRP para detecção de H_2O_2 . A tinta biocompósita foi preparada com pó de grafite, HRP, acetato de celulose, ciclohexanona e periodato. O periodato foi adicionado com o intuito de estudar seu efeito na atividade eletroquímica da HRP. Os resultados mostraram que o íon periodato contribui para aumentar a transferência eletrônica direta da HRP, aumentando a sensibilidade e a faixa linear de operação do biossensor.

A Tabela 2.6 apresenta uma coletânea de alguns biossensores impressos enzimáticos para detecção de peróxido de hidrogênio encontrados na literatura.

Tabela 2.6. Biossensores impressos enzimáticos para detecção amperométrica de H₂O₂.

Biossensor impresso	Potencial (V vs Ag/AgCl)	Faixa linear (μmol L⁻¹)	LD (μmol L⁻¹)	Referência
SPCE/GS–Nafion/Fe ₃ O ₄ -Au-HRP	-0,3	20-2.500	12	XIN <i>et al.</i> , 2013
SPCE/ERGO-HRP	-0,26	9-195	-	PALANISAMY <i>et al.</i> , 2012
SPCE/HRP	0	10-250	-	LEDRU <i>et al.</i> , 2006
SPCE/Nafion/HRP	-0,33*	5,98 - 35,36	0,48	TENG <i>et al.</i> , 2009
SPCE/CHIT/NpAu/HRP	-0,4	10-11.300	0,65	TANGKUARAM <i>et al.</i> , 2007
SPCE/THI/GLU/HRP	-	5-65	0,5	GAO <i>et al.</i> , 2004
SPCE/Au/Hb	-0,227*	10-320	5,5	XU <i>et al.</i> , 2004

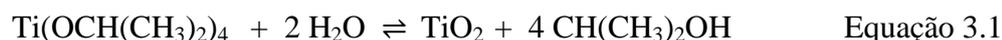
*Potencial vs eletrodo de calomelano.

SPCE – Eletrodo impresso de carbono; ERGO – Óxido de grafeno reduzido; CHIT – Quitosana; NpAu – Nanopartículas de ouro; Hb – Hemoglobina; GS – Folhas de grafeno; THI – Tionina; GLU – Glutaraldeído.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese do Dióxido de Titânio

O dióxido de titânio (TiO₂), precursor dos nanofios de titanato, foi obtido pela hidrólise lenta do isopropóxido de titânio (Sigma-Aldrich), conforme a reação estequiométrica apresentada a seguir:



A síntese foi realizada em atmosfera inerte, devido à instabilidade do reagente isopropóxido de titânio. Portanto, em uma câmara plástica preenchida com N₂, a água foi adicionada, em proporções estequiométricas, ao isopropóxido de titânio de forma lenta e contínua, sob agitação magnética. O precipitado resultante foi filtrado a vácuo, lavado com água destilada e seco em estufa a 120 °C por 12 h. Posteriormente, foi pulverizado com o auxílio de gral e pistilo e calcinado a 350 °C por 6 h, mantendo-se vazão de ar de 30 mL min⁻¹.

3.2. Síntese dos Nanofios de Titanato

Os nanotubos de titanato foram sintetizados pelo método hidrotérmico descrito por KASUGA *et al* (1999). Nesse procedimento, 4 g de dióxido de titânio calcinado são solubilizados em 200 mL de uma solução 10 mol L⁻¹ de NaOH, sob agitação durante 2 h. A solução resultante foi igualmente distribuída em quatro reatores de teflon e aço inox e aquecida em estufa giratória a 130 °C com agitação a 56 rpm por 24 h. Ainda sob agitação, os reatores foram resfriados por 12 h. Após este período, os reatores foram abertos e a suspensão obtida foi filtrada a vácuo. A fim de eliminar os íons sódio da estrutura formada, lavou-se o sólido várias vezes com porções de 100 mL de solução de HNO₃ 1 mol L⁻¹ e, em seguida, com porções de mesmo volume de água destilada até obtenção de um filtrado com pH 7. O sólido foi seco em estufa a 100 °C por 12 h.

3.3. Caracterização Físico-Química dos NFT

A seguir, são apresentadas as técnicas usadas para caracterização dos nanofios de titanato.

3.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A técnica de MEV foi empregada para confirmar a formação de NFT e avaliar alterações morfológicas após funcionalização e adsorção da enzima. As análises foram realizadas em microscópio (do Núcleo de Catálise – NUCAT – do PEQ) FEI Company, modelo Quanta 200, após metalização das amostras com ouro.

3.3.2. Fisissorção de N₂

A área superficial dos NFT foi determinada pelo método BET, utilizando-se a técnica de fisissorção de nitrogênio a -196 °C, em equipamento ASAP (Accelerated Surface Area and Porosity) modelo 2020 da Micromeritics. Inicialmente o material foi tratado sob vácuo a 150 °C durante 12 h, para permitir a dessorção de água.

3.3.3. Difração de Raios-X (DRX)

As análises de DRX foram realizadas em um difratômetro de raios X Rigaku modelo Miniflex com radiação de cobre ($\text{CuK}\alpha = 1,54178 \text{ \AA}$). Os valores variaram de 0 a 80°, com passo de 0,05° e tempo de contagem de 1 segundo. A técnica foi empregada para verificar as fases cristalinas presentes no dióxido de titânio e nos NFT sintetizados.

3.3.4. Fluorescência de Raios-X (FRX)

A análise de FRX foi realizada em um equipamento Rigaku, modelo RIX 3100 com tubo de ródio e operado a uma voltagem de 4 kW para determinar a composição química dos NFT.

3.3.5. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman foi realizada com o objetivo de estudar os grupamentos químicos nos NFT. As análises foram feitas em espectrômetro LabRam Horiba HR-UV 800 com resolução $1 \mu\text{m}^3$, com laser He-Ne (comprimento de onda 632 nm e potência 10,3 mW) e detector CCD (Charge Coupled Device). Foi utilizada uma lente objetiva de 100x em três regiões distintas da amostra de NFT.

3.3.6. Espectroscopia no Infravermelho

A análise de espectroscopia no infravermelho permitiu avaliar a inserção dos grupos funcionais nos NFT em virtude das funcionalizações realizadas. Os espectros foram obtidos em espectrômetro com transformada de Fourier (FTIR) Perkin Elmer,

Spectrum 100. As análises foram realizadas na região de 4000 a 800 cm^{-1} , 64 varreduras e resolução 4 cm^{-1} .

3.3.7. Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A espectroscopia UV-Vis foi empregada para realização do Método de Bradford de quantificação de proteínas e para a determinação da atividade enzimática da HRP. As análises foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Analyst for UV-1803, Alpha-Asw-002.

3.3.8. Potencial Zeta

A técnica de potencial zeta permitiu a realização de medidas das cargas superficiais dos NFT funcionalizados e com HRP imobilizada. As medidas foram realizadas em equipamento Zeta Plus Analyser Brookhaven Instruments Corporation. O potencial zeta foi determinado pela média de 5 ciclos por ensaio em cubetas de plástico (10 mm de percurso) com as amostras numa concentração de 0,01% m/m em água Milli-Q.

3.3.9. Análise Elementar de CHN

A análise do teor dos elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio foi feita a fim de verificar a variação da quantidade desses elementos após as etapas de modificação dos NFT. As análises foram feitas em equipamento Perkin Elmer – CHN 2400, na Central Analítica da USP.

3.4. Caracterização da Enzima HRP

3.4.1. Método de Bradford

O método de Bradford é uma técnica de quantificação de proteínas totais que utiliza o corante Azul Brilhante de Coomassie. Este método é baseado na interação entre o corante e proteínas que contém cadeias laterais básicas ou aromáticas. A interação provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica do corante, que absorve fortemente em 595 nm (ZAIA *et al.*, 1998).

3.4.1.1. Solução de Azul Brilhante de Coomassie

Para o preparo de uma solução 100 mg L^{-1} do corante, dissolveram-se 100 mg desse reagente em 50 mL de etanol 95% sob agitação por 20 minutos. Em seguida, adicionaram-se 100 mL de ácido ortofosfórico 85%, mantendo-se em agitação por 1h para completa homogeneização. A solução obtida foi transferida para balão volumétrico de 1 L e o volume foi aferido com água destilada. Devido à fotossensibilidade do reagente, a solução era armazenada em frasco âmbar a 4°C , e sempre filtrada antes do uso.

3.4.1.2. Soluções de Albumina de Soro Bovino

Para a construção da curva padrão, foram preparadas soluções de albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações de 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e $0,1 \text{ g L}^{-1}$. A solução de concentração $0,1 \text{ g L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução de 10 mg de BSA em água Milli-Q, completando-se o volume em balão volumétrico de 100 mL. As outras soluções foram preparadas em tubos Falcon pela retirada de alíquotas de 1, 2, 3 e 4 mL da solução $0,1 \text{ g L}^{-1}$, com adição de 4, 3, 2 e 1 mL de água Milli-Q, respectivamente, completando um volume final de 5 mL. Todas as soluções eram preparadas a cada dia de análise.

Tabela 3.1. Preparo das soluções de BSA.

Concentração da solução de BSA (g L^{-1})	Alíquota da solução $0,1 \text{ g L}^{-1}$ BSA (mL)	Volume de H_2O (mL)	Volume final da solução (mL)
0,02	1,0	4,0	5,0
0,04	2,0	3,0	5,0
0,06	3,0	2,0	5,0
0,08	4,0	1,0	5,0

3.4.1.3. Curva Padrão

A concentração de HRP foi determinada pela curva padrão construída com as soluções de BSA nas concentrações de 0,02 a $0,1 \text{ g L}^{-1}$. As amostras foram preparadas misturando-se 1 mL da solução de Azul Brilhante de Coomassie a 0,1 mL da solução a ser analisada. Após 10 minutos de reação, a amostra era lida em espectrofotômetro no

comprimento de onda de 595 nm. A cada dia de análise construía-se uma curva padrão, em razão da instabilidade da solução de Azul Brilhante de Coomassie.

3.4.2. Atividade Específica da HRP

A determinação da atividade específica da HRP (Sigma-Aldrich) foi feita através do ensaio colorimétrico proposto por Trinder (1966). Este ensaio utiliza fenol, 4-aminoantipirina e peróxido de hidrogênio como substratos geradores de coloração. Na reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase, o peróxido de hidrogênio reage com a 4-aminoantipirina e fenol formando um complexo de cor vermelha, a quinoneimina. A taxa de geração de cor a 510 nm é proporcional à taxa de H₂O₂ consumido, que é proporcional à concentração de enzima ativa no ensaio (NICELL e WRIGHT, 1997).

O ensaio consiste na adição, em uma cubeta, de 1,5 mL de solução 0,0017 mol L⁻¹ H₂O₂ em tampão fosfato de potássio (PB 0,1 mol L⁻¹, pH 7) e 1,4 mL de solução 0,0025 mol L⁻¹ de 4-aminoantipirina com 0,17 mol L⁻¹ de fenol em tampão PB. A mistura é incubada em espectrofotômetro em 510 nm a temperatura ambiente, estabelecendo a taxa de branco. Após isso, são adicionados 0,1 mL da amostra contendo a enzima ativa e registrado o aumento da absorbância por 5 minutos. A amostra é diluída em água para obter uma taxa de 0,02 a 0,04 ΔA(510nm)/min. Isto possibilita o cálculo da ΔA(510nm)/min da porção linear da curva. A atividade específica (U/mg) é dada pela equação 3.2:

$$U/mg = \frac{\Delta A (510 \text{ nm})/\text{min}}{6,58 \times \frac{\text{mg enzima}}{3 \text{ mL}}} \quad \text{Equação 3.2}$$

e a quantidade de enzima em mg é determinada pelo método de Bradford.

3.5. Imobilização da HRP nos NFT

Para a imobilização da enzima foi escolhido o método de ligação covalente e, para isso, foram inseridos grupamentos funcionais na superfície dos NFT. A Figura 3.1 mostra as etapas do processo.

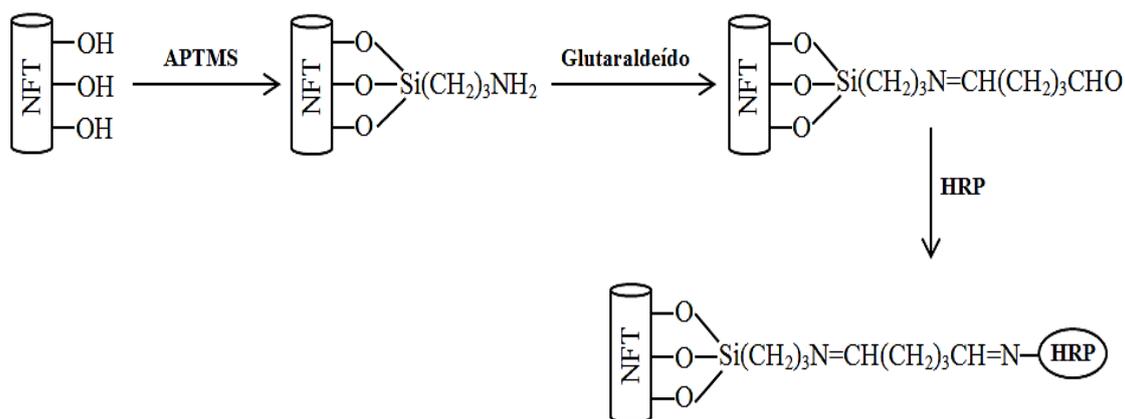


Figura 3.1. Etapas de funcionalização dos NFT e imobilização da HRP.

A primeira etapa consistiu na dispersão, em sonicador, de 250 mg de NFT em 25 mL de diclorometano por 30 segundos. Foi adicionado a esta solução, 0,5 mL de 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS). Em temperatura ambiente, a mistura foi mantida sob agitação a 20 rpm por 3 h. Após este período, a mistura foi filtrada sob vácuo em membrana porosa com filtro 8 μ m (Quanty). Os NFT modificados (NFT/APTMS) foram lavados com diclorometano e secos a 60°C em estufa por 10 minutos. Na segunda etapa de funcionalização, a 200 mg de NFT/APTMS foram adicionados 10 mL de uma solução de glutaraldeído 2,5% (m/m) em 0,1 mol L⁻¹ de tampão PB (0,1 mol L⁻¹, pH 7). A solução foi mantida sob agitação de 20 rpm por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, foi filtrada e lavada com tampão PB.

Na etapa de imobilização, 5 mg de NFT modificados com glutaraldeído (NFT/APTMS/GLU) foram colocados em contato com 1 mL de solução HRP 1mg mL⁻¹ por 2 h em agitação a 20 rpm e a temperatura ambiente. Após esse tempo, a suspensão resultante foi inserida em filtros de centrifugação Millipore de 100 kDa e centrifugada a 400 rpm por 4 minutos. Com isso, a HRP não imobilizada passa pela membrana de diálise, já que a massa molar da HRP é de 60 KDa. Concluída a etapa de imobilização, os NFT/APTMS/GLU/HRP foram armazenados em 0,1 mol L⁻¹ PB (pH 7) a 4 °C.

A quantidade de enzima imobilizada foi calculada pela seguinte equação:

$$Q = \frac{(C_i - C_f)V}{m} \quad \text{Equação 3.3}$$

onde Q é a massa de HRP adsorvida ($\text{mg}_{\text{HRP}}/\text{g}_{\text{NFT}}$), C_i e C_f (mg mL^{-1}) são a concentração inicial da solução de HRP e a concentração da solução obtida após a centrifugação (ambas as concentrações são determinadas pelo método de Bradford de quantificação de proteínas), V (mL) é o volume da solução e m (g) é a massa de NFT/APTMS/GLU usada.

3.6. Preparo do Biossensores

No preparo dos biossensores foram estudadas diferentes plataformas. O primeiro biossensor foi construído em eletrodo de pasta de carbono, por ser de preparo mais simples e rápido, e com o objetivo de verificar a manutenção da atividade electrocatalítica da enzima imobilizada nos nanofios de titanato. As outras plataformas – eletrodo de tinta de grafite e eletrodo impresso – foram estudadas com a finalidade de preparar biossensores impressos.

3.6.1. Eletrodo de Pasta de Carbono (EPC)

A pasta de carbono foi preparada na proporção de 75% (m/m) de pó de grafite (Sigma-Aldrich) com óleo mineral. A mistura foi homogeneizada por 15 minutos com gral e pistilo. Finalmente, a esta pasta foi inserido 20% (m/m) de NFT/APTMS/GLU/HRP em relação à mistura. A mistura foi novamente homogeneizada por 15 minutos e inserida na cavidade de 3 mm de diâmetro do eletrodo de trabalho (área de $0,071 \text{ cm}^2$), como ilustrado na Figura 3.2.



Figura 3.2. Eletrodo de pasta de carbono.

3.6.2. Eletrodo de Tinta de Grafite (ETG)

Os eletrodos de tinta de grafite foram preparados em suporte de PVC cortado nas dimensões de 3 cm de altura por 0,5 cm de largura. Os suportes foram primeiramente tratados com HCl 0,1 mol L⁻¹, depois foram imersos em álcool 95% e em álcool absoluto. Em seguida, foram secos em temperatura ambiente. A tinta foi preparada pela adição de 500 mg de grafite em pó a 500 µL de uma mistura composta de 40 mg de acetato de celulose, 1 mL de acetona e 1 mL de ciclohexanona. Duas camadas de tinta eram depositadas na placa de PVC com o auxílio de um pincel. Após secagem, mediam-se a resistência dos eletrodos com um multímetro, em uma distância de 1 cm, e somente os eletrodos com resistências menores que 200 Ω eram utilizados.

Usando uma fita adesiva, a área de trabalho dos eletrodos foi delimitada em 1,5 mm de altura e 0,5 cm de largura (área de 0,075 cm²). Para o preparo do biossensor, a área de trabalho foi pintada novamente com a tinta de grafite modificada com 20% (m/v) de NFT/APTMS/GLU/HRP.

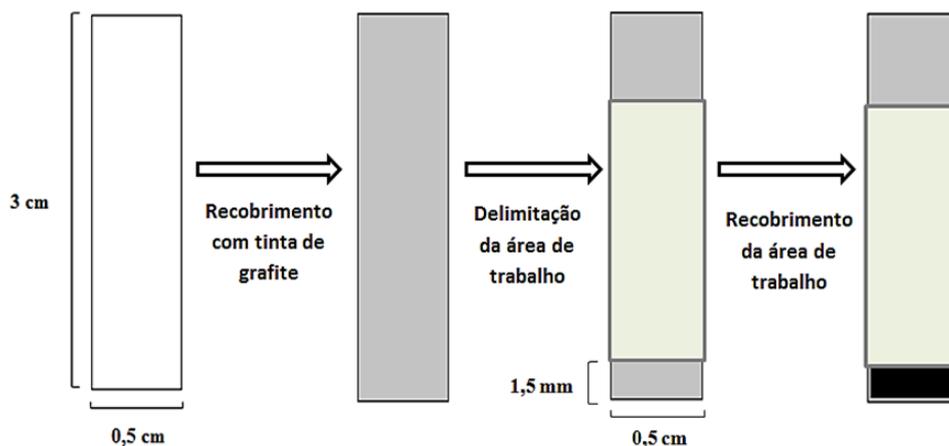


Figura 3.3. Etapas de preparo do eletrodo de tinta de grafite.

3.6.3. Eletrodo Impresso (EI)

Foram usados eletrodos impressos (IS-1 Florence sensors) com eletrodo de trabalho de carbono grafite (3 mm de diâmetro, 0,071 cm² de área), contra eletrodo de pasta polimérica de carbono e eletrodo de referência de pasta de prata (potencial 0,799 mV vs EPH) em substrato de poliéster (Figura 3.4a). A superfície do eletrodo de

trabalho foi modificada com 30 μL de NFT/APTMS/GLU/HRP dispersos em tampão PB 0,1 mol L^{-1} , pH 7, e após secagem, foram depositados 30 μL de solução alcoólica de Nafion[®] 10% para aumentar a aderência no eletrodo (Figura 3.4b).

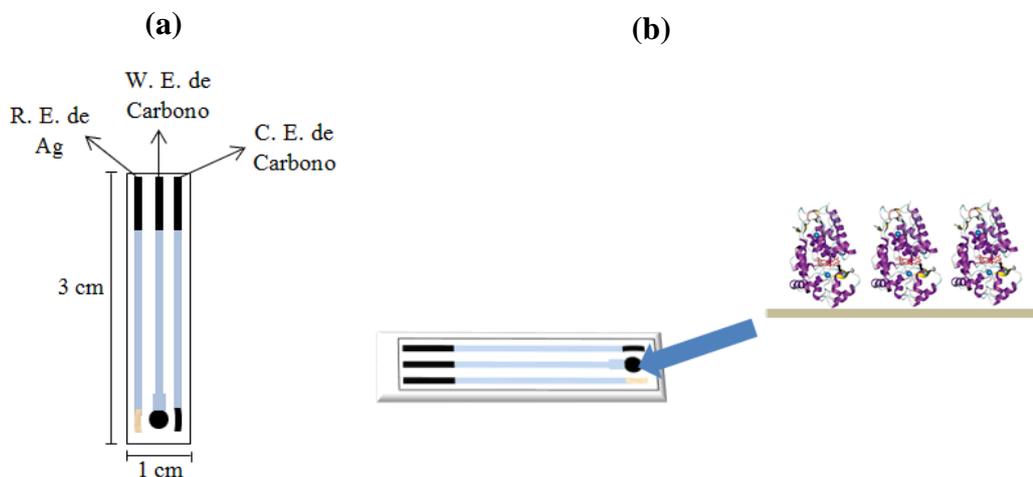


Figura 3.4. (a) Eletrodo impresso; (b) Modificação do eletrodo de trabalho com NFT/APTMS/GLU/HRP.

3.7. Caracterizações Eletroquímicas

Para os experimentos eletroquímicos com o eletrodo de pasta de carbono e com o eletrodo de tinta de grafite, foi utilizada uma célula de vidro, com capacidade de 50 mL e tampa contendo orifícios para o posicionamento dos eletrodos de trabalho, contra eletrodo e de referência, como pode ser visualizado na Figura 3.5.

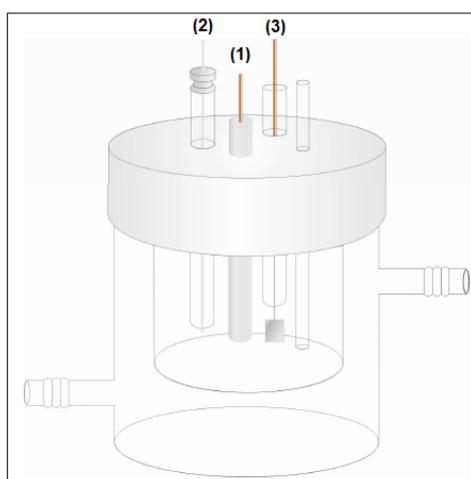


Figura 3.5. Esquema da célula eletroquímica utilizada nos experimentos. (1) Eletrodo de trabalho; (2) Eletrodo de referência; (3) Contra eletrodo. (Adaptado de GALLI, 2011).

Os eletrodos de trabalho utilizados foram:

- ✓ EPC
- ✓ EPC modificados com 20% de NFT
- ✓ EPC modificados com 20% de NFT/APTMS/GLU/HRP (biossensor)
- ✓ ETG
- ✓ ETG modificados com 20% de NFT/APTMS/GLU/HRP (biossensor)

O eletrodo de referência empregado foi o Ag/AgCl/Cl^- , que consiste de um fio de prata recoberto com cloreto de prata em contato com solução de cloreto de potássio saturada. O valor do seu potencial é de aproximadamente 0,222 V em relação ao eletrodo padrão de hidrogênio (EPH). E o contra eletrodo utilizado foi o eletrodo de fio de platina de 10 mm de diâmetro. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente.

Como os eletrodos impressos possuem os três eletrodos (eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra eletrodo) impressos no mesmo suporte, a célula é miniaturizada e o aparato experimental é simplificado.

Todas as caracterizações eletroquímicas foram realizadas no potenciostato Palm Sens que é constituído do software PSTrace.

Nas análises de voltametria cíclica, a varredura catódica foi feita no sentido do potencial mais positivo para o mais negativo, e a varredura anódica no sentido do potencial mais negativo para o mais positivo.

3.7.1. Caráter Condutor dos NFT

O caráter condutor dos NFT foi avaliado em solução 5 mmol L^{-1} de ferricianeto de potássio $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em 1 mol L^{-1} de cloreto de potássio (KCl), utilizando a técnica eletroquímica de voltametria cíclica. Para isto, foi utilizado o EPC modificado com 20% de NFT e as medidas realizadas com velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

3.7.2. Avaliação Eletroquímica dos Biossensores

Com o propósito de estudar a transferência eletrônica direta da HRP imobilizada, a caracterização eletroquímica do biossensores foi realizada em solução 0,1

mol L⁻¹ PB (pH 7) utilizando a técnica de voltametria cíclica com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹. Também foi avaliada a resposta do biossensor em presença de 2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de H₂O₂ em PB (pH 7) e velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹.

3.8. Avaliação do Biossensor Impresso na Detecção do H₂O₂

3.8.1. Estudo da Reprodutibilidade

A reprodutibilidade de preparação do biossensor foi avaliada por meio da resposta amperométrica destes dispositivos através da técnica de voltametria cíclica. As análises foram feitas em solução 0,1 mol L⁻¹ PB (pH 7) na presença de 2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ H₂O₂, na velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹ em diferentes dias.

3.8.2. Estudo da Repetibilidade

As análises de repetibilidade de detecção do H₂O₂ pelo biossensor foram realizadas em uma série de 10 medidas consecutivas (n=10) numa mesma solução 0,1 mol L⁻¹ PB (pH 7) contendo 2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ H₂O₂. Para tanto, foi empregada a técnica eletroquímica de voltametria cíclica com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹.

3.8.3. Estudo da Estabilidade

Os testes de estabilidade têm por objetivo avaliar o tempo de vida útil do biossensor. Desta forma, foi realizado o monitoramento da resposta do biossensor por voltametria cíclica numa solução 0,1 mol L⁻¹ PB (pH 7) contendo 2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ H₂O₂, com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹. As medidas foram realizadas ao longo de 30 dias utilizando o mesmo biossensor. Durante esse tempo, o biossensor ficou armazenado a 4°C em solução 0,1 mol L⁻¹ PB (pH 7).

3.8.4. Curva Analítica

A curva analítica foi construída utilizando-se a técnica de cronoamperometria no potencial de trabalho de -0,98 V vs. eletrodo de Ag, em solução 0,1 mol L⁻¹ PB (pH 7) com adições sucessivas de 20 µL de solução 0,02 mol L⁻¹ de H₂O₂ e sob agitação

magnética. A curva analítica foi construída por meio da média das correntes de redução de cada adição *versus* a concentração de H₂O₂.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as normas previstas pela ANVISA, nas quais o limite de detecção (LD) é dado pela seguinte equação:

$$LD = \frac{3 \sigma_a}{IC} \quad \text{Equação 3.4}$$

Onde IC é a inclinação da curva de calibração e σ_a corresponde ao desvio padrão do coeficiente linear.

O limite de quantificação (LQ) também foi calculado baseando-se nas normas da ANVISA e consiste em:

$$LQ = \frac{10 \sigma_a}{IC} \quad \text{Equação 3.5}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do Dióxido de Titânio

A análise de difração de raios-X foi realizada com o objetivo de identificar as fases cristalinas do dióxido de titânio preparado. Analisando o difratograma do TiO_2 apresentado na Figura 4.1, observa-se que a síntese através da hidrólise lenta do isopropóxido de titânio permite a obtenção de um material com as fases anatásio e bruquita. Essas fases são identificadas no pico de maior intensidade em $25,3^\circ$ e nos picos em $37,8^\circ$; $48,2^\circ$; $55,0^\circ$; $62,7^\circ$ e $70,3^\circ$. Picos isolados são identificados para as fases bruquita e anatásio em $30,8^\circ$ e $75,0^\circ$, respectivamente.

Segundo ZHANG e BANFIELD (2000), anatásio é a fase mais estável para as nanopartículas abaixo de 11 nm, a fase bruquita é a mais estável para as nanopartículas na faixa de 11-35 nm e a fase rutilo é considerada a mais estável para partículas acima de 35 nm de tamanho. A forma anatásio também apresenta maior rendimento quântico, pois é formada a temperaturas menores que 600°C , o que favorece a formação de partículas com grande área específica.

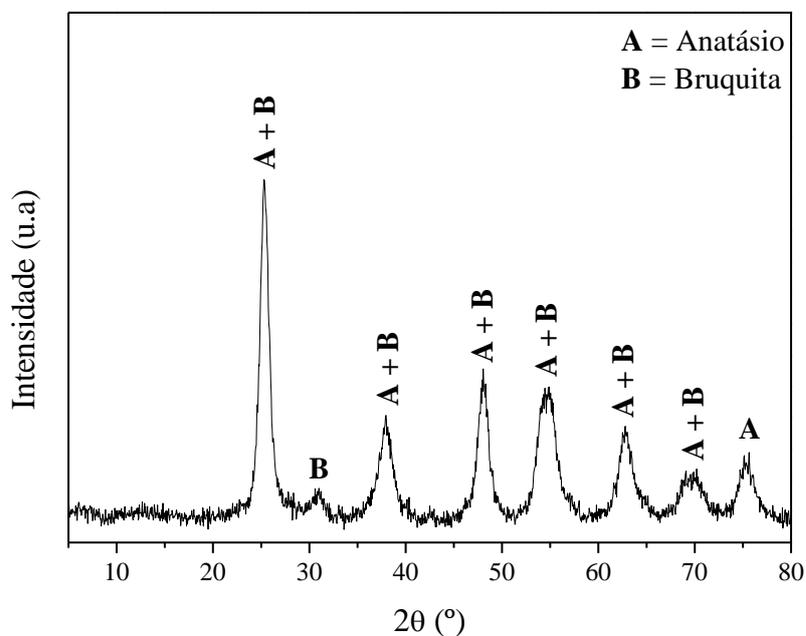


Figura 4.1. Difratograma do dióxido de titânio.

A área superficial também é influenciada pelo tamanho do cristalito da titânia precursora. YUAN e SU (2004) notaram que as titânias de menor cristalito e maior área também levam a nanotubos de titanato de maior área. A mesma relação foi observada por IDAKIEV *et al.* (2005) e ZHANG *et al.* (2002) que reportaram a dependência da área com o tipo de fase cristalina do TiO₂ de partida.

O TiO₂ comercial (P-25, Degussa) é constituído pelas fases cristalinas anatásio e rutilo e apresenta valor de área superficial de 49 m²/g. Já o TiO₂ sintetizado neste trabalho apresentou área superficial bastante superior, de 88 m²/g.

4.2. Caracterização dos NFT

A morfologia dos nanofios de titanato foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Como pode ser observado na Figura 4.2, as amostras são constituídas por nanoestruturas em forma de fio, com diâmetro da ordem de 20 nm.

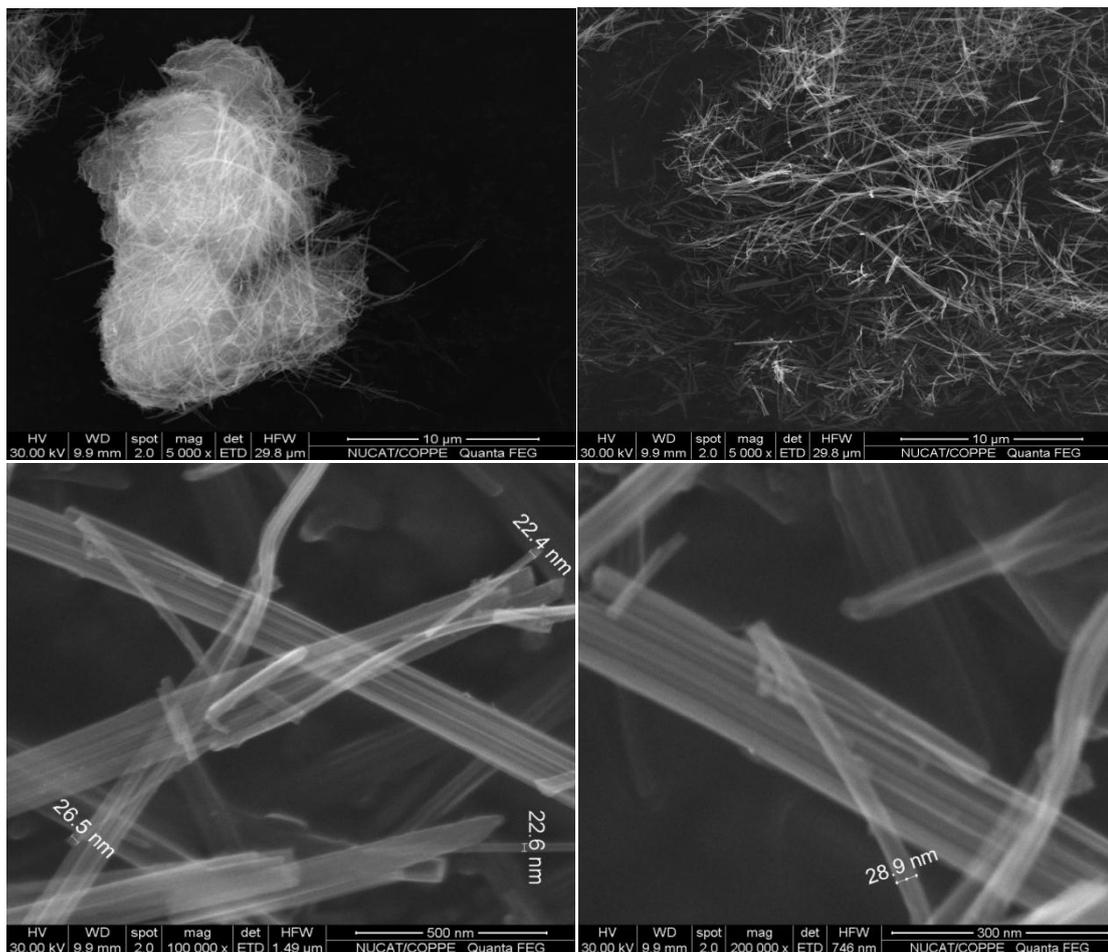


Figura 4.2. Micrografias dos NFT sintetizados.

A área superficial dos NFT sintetizados foi de 177 m²/g, valor condizente com a área de estruturas em forma de fios. A caracterização estrutural dos NFT também foi feita por difração de raios-X. O difratograma dos NFT, visualizado na Figura 4.3, apresenta picos em 25,3° e 48,5° referentes à fase anatásio (GAO *et al.*, 2008). O pico em 10° é típico de titanatos lamelares e pode ser atribuído à distância interlamelar em Na_xH_{2-x}Ti₃O₇.nH₂O. Esse pico também está relacionado com o conteúdo de sódio presente na estrutura, já que a presença do sódio aumenta a distância entre as camadas. Segundo MORGADO *et al.* (2007), as distâncias interlamelares em titanatos protônicos é de 0,79 nm, enquanto em titanatos sódicos aumenta para 0,84 nm. Ainda de acordo com este autor, a redução da intensidade do pico em 10° é observada quando a troca dos íons Na⁺ pelos íons H⁺ é quase completa (0,2-0,3% Na).

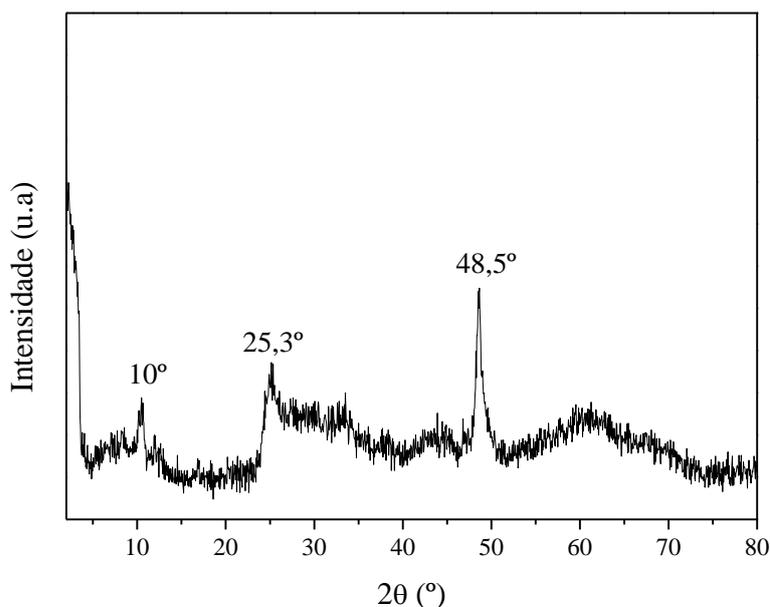


Figura 4.3. Difratograma dos nanofios de titanato.

A análise por espectroscopia Raman (Figura 4.4) mostra bandas em 146, 191, 275, 450 e 661 cm⁻¹. As bandas em 146 cm⁻¹ e 191 cm⁻¹, são atribuídas à fase anatásio, enquanto que as bandas em 275 cm⁻¹, 450 cm⁻¹ e 661 cm⁻¹ são atribuídas às vibrações das ligações Ti-O (TURKI *et al.*, 2013). Bandas referentes a ligações com sódio (em 670 e 910 cm⁻¹) não foram observadas, confirmando a eficiência do processo de lavagem dos nanofios para extração do sódio.

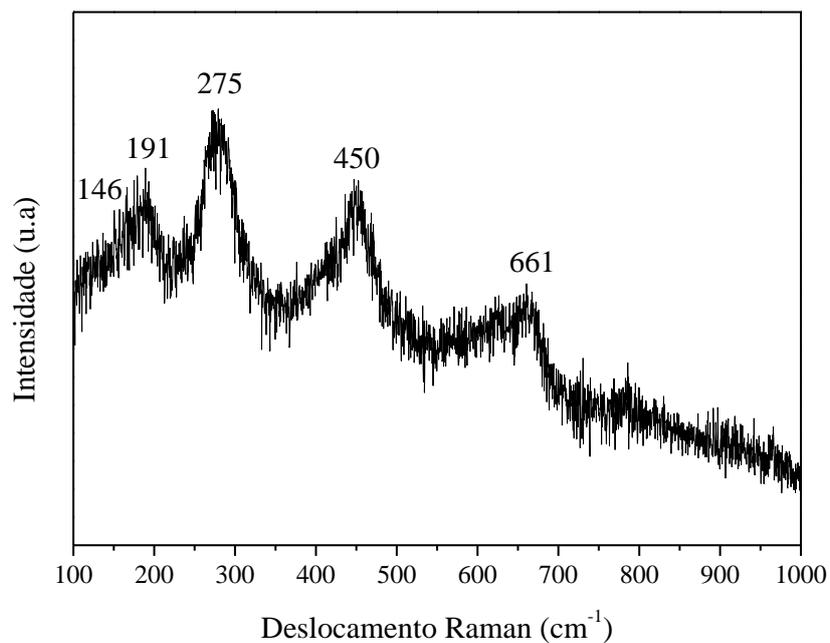


Figura 4.4. Espectro Raman dos nanofios de titanato.

Os resultados de fluorescência de raios-X (Tabela 4.1) corroboram a eficiência das etapas de lavagem na troca dos íons Na^+ por H^+ e, conseqüentemente, confirmam a formação de titanatos protônicos, com pureza de 99%.

Tabela 4.1. Resultado de FRX dos NFT.

Composto	Massa (%)
TiO ₂	99,052
Na ₂ O	0,218
CaO	0,385
SiO ₂	0,345

4.3. Imobilização da HRP nos NFT

4.3.1. Caracterização da Funcionalização e Imobilização

Para a imobilização da enzima HRP nos nanofios foi escolhido o método de imobilização covalente, no qual grupos presentes na superfície dos nanofios ligam-se a grupos específicos presentes na enzima. Primeiramente, os NFT foram funcionalizados com grupos NH_2 , através da ligação com o reagente bifuncional APTMS. O APTMS reage com a superfície formando a ligação Si-O-Ti, onde a funcionalidade amino se estende a partir da superfície, formando uma região de ligação com outras moléculas (WHITE e TRIPP, 2000). Em seguida, a HRP é ligada aos NFT utilizando o glutaraldeído como agente de acoplamento.

A reação do APTMS com os grupos OH presentes na superfície dos NFT ocorre de acordo com o seguinte mecanismo: (i) hidrólise dos grupos métoxi do APTMS, catalisada por $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_3\text{O}^+$, e formação de 3-aminopropil silanol $(\text{HO})_3\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$, (ii) ligação dos grupos OH presentes no silanol com os grupos Ti-OH presentes na superfície dos NFT, com conseqüente formação de ligações Ti-O-Si (SOVIC *et al.*, 2011).

A ligação das moléculas de APTMS na superfície dos NFT foi confirmada por espectroscopia no infravermelho. Em comparação ao espectro de infravermelho dos NFT (Figura 4.5a), que apresenta somente bandas devido à presença de grupos superficiais OH e moléculas de $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_3\text{O}^+$ (banda larga de $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ e banda intensa em 1630 cm^{-1}), o espectro dos NFT/APTMS (Figura 4.5b) exhibe novas bandas em torno de 2930 cm^{-1} e na faixa de $1500\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ referentes aos modos vibracionais dos grupos metileno (CH_2) presentes no segmento 3-aminopropil. Observam-se ainda as bandas em torno de 1120 e 1000 cm^{-1} , que são atribuídas às ligações Si-O-Si e Si-O-Ti, respectivamente. A presença dos grupos amino é indicada pelo aumento da banda larga em $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ (vibrações axiais NH), pela banda em 1566 cm^{-1} (vibração angular de NH) e pela banda de intensidade fraca em 1225 cm^{-1} (vibração axial CN).

Após a reação da matriz NFT/APTMS com glutaraldeído (Figura 4.5c), os espectros mostram apenas variações na intensidade das bandas. A intensidade das bandas em 1566 cm^{-1} e 1225 cm^{-1} decresce devido à perda do grupo NH_2 e acoplamento desse grupo com glutaraldeído, formando a ligação C=N. Já a intensidade da banda em

1630 cm^{-1} aumenta em razão da sobreposição com as bandas de vibração da ligação C=N (1690 - 1590 cm^{-1}).

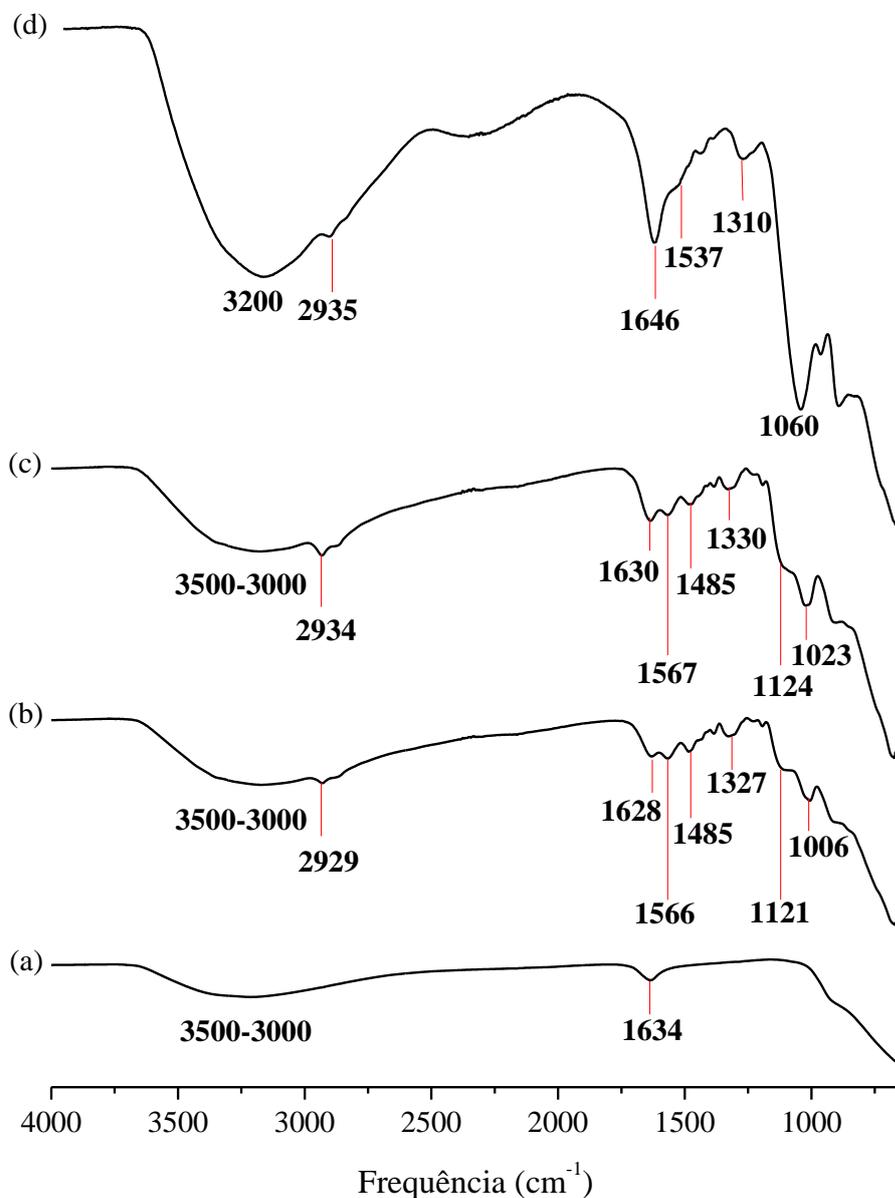


Figura 4.5. Espectros de infravermelho dos (a) NFT; (b) NFT/APTMS; (c) NFT/APTMS/GLU; (d) NFT/APTMS/GLU/HRP.

Após a adsorção da HRP, o espectro (Figura 4.5d) apresenta mudanças nas bandas em torno de 3500-3000 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} , além do aparecimento de novas bandas. Os picos em 1646, 1537 e 1310 cm^{-1} podem referir-se às vibrações axiais C=O de amida primária, às vibrações axiais C-N de amida secundária e ao estiramento do

grupo CNH de amida secundária. O pico em 1060 cm^{-1} é relativo ao estiramento da ligação C-O. A Tabela 4.2 apresenta um resumo das atribuições das bandas observadas nos espectros de infravermelho.

Tabela 4.2. Atribuições das bandas dos espectros de infravermelho.

Frequência (cm^{-1})	Atribuição
3500-3000	Vibrações axiais: OH, NH
2930	Vibrações axiais: CH_2
1690-1590	Vibração axial C=N
1646	Vibração axial C=O (amida 1 ^a)
1630	Vibração angular: OH
1566	Vibração angular: NH
1537	Vibração axial C-N (amida 2 ^a)
1500-1300	Vibração angular: CH
1310	Estiramento C-N-H
1225	Vibrações axiais: CN
1120	Estiramento Si-O-Si
1060	Estiramento C-O
1000	Estiramento Si-O-Ti

Referências: SILVERSTEIN *et al.*, 2006; COSTA NETO, 2004.

Na Figura 4.6, são apresentadas as medidas do potencial zeta dos NFT após cada etapa de modificação de sua superfície. Observa-se que em meio aquoso (pH 7), os NFT desenvolvem um potencial negativo de $-42,90 \pm 1,16\text{ mV}$ devido à presença de íons OH^- adsorvidos. Este potencial negativo também é coerente com o fato de que, em pH 7, os NFT estão em pH acima do pH de seu potencial isoelétrico, o qual ocorre em pH 3. O potencial da enzima livre também foi medido (Figura 4.6b). A HRP possui ponto isoelétrico próximo de 7 (XIALING e LIN, 2009), desenvolvendo um potencial levemente negativo de $-12,50 \pm 2,08\text{ mV}$.

Após a reação com APTMS (Figura 4.6c) verifica-se uma inversão de potencial dos NFT para $22,12 \pm 0,98$ mV. Isto ocorre devido à inserção dos grupos amino, que exibem um pKa em torno de 11, e portanto estão protonados em pH 7.

Após tratamento com glutaraldeído (Figura 4.6d), o potencial zeta da matriz NFT/ATPMS/GLU continua positivo em $14,48 \pm 0,81$ mV, porém com uma pequena redução do potencial, visto que os grupos amino foram substituídos por grupos imino, que são menos básicos (pKa ~9) e encontram-se menos protonados em pH 7. Os grupos aldeídos também inseridos nesta etapa não alteram significativamente a carga do material.

A imobilização da HRP na matriz NFT/APTMS/GLU inverte novamente o potencial para $-7,64 \pm 3,27$ mV. Este potencial é próximo do potencial da HRP livre ($-12,50$ mV), indicando que houve imobilização da enzima, com cobertura da matriz e neutralização parcial das cargas dos NFT funcionalizados.

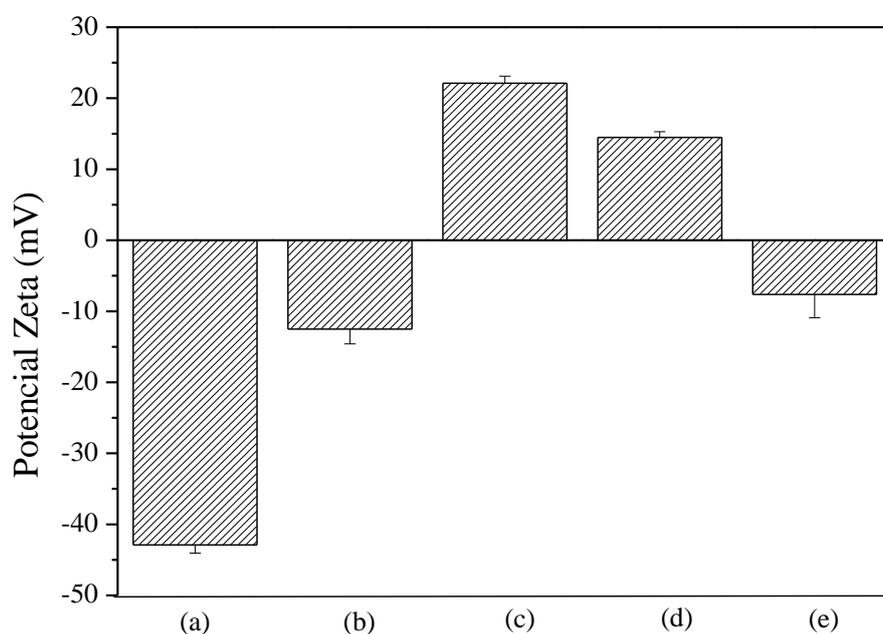


Figura 4.6. Medidas de potencial zeta para (a) NFT; (b) HRP; (c) NFT/APTMS; (d) NFT/APTMS/GLU; (e) NFT/APTMS/GLU/HRP.

Análises dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas após cada etapa de funcionalização e após a adsorção da enzima. Como pode ser observado na Tabela 4.3, os nanofios de titanato apresentam baixo teor de carbono (0,25%) e nitrogênio (0,17%), em virtude de possuírem majoritariamente em sua composição átomos de titânio, oxigênio e hidrogênio. Com a primeira etapa de funcionalização, o reagente APTMS ($\text{Si}(\text{OCH}_3)_3(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$) insere átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio à superfície dos NFT. A ligação do APTMS à estrutura dos nanofios é, então, confirmada pelo aumento dos teores desses elementos para 10,69%, 3,33% e 3,60%, respectivamente.

O agente de acoplamento glutaraldeído ($\text{CHO}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$) insere mais átomos de carbono e hidrogênio à matriz, fato comprovado novamente pelo aumento da quantidade de carbono para 16,52% e de hidrogênio para 3,64%.

Como as enzimas são proteínas, constituídas por cadeia polipeptídica, após a adsorção da enzima HRP nos nanofios também se observa elevação dos teores dos elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio para 18,10%, 4,12% e 3,18%, respectivamente.

Tabela 4.3. Teores de CHN após etapas de funcionalização e imobilização da HRP.

Amostra	%C (m/m)	%H (m/m)	%N (m/m)
NFT	0,25	1,83	0,17
NFT/APTMS	10,69	3,33	3,60
NFT/APTMS/GLU	16,52	3,64	2,92
NFT/APTMS/GLU/HRP	18,10	4,12	3,18

A Figura 4.7 apresenta as imagens de MEV após a imobilização da HRP nos NFT. Observa-se que, após a imobilização, os NFT preservam sua morfologia, porém apresentam-se mais aglomerados e com diâmetro aparentemente maior. A aglomeração dos NFT é consistente com o significativo decréscimo na área superficial após a reação com glutaraldeído, de $177 \text{ m}^2/\text{g}$ para $22 \text{ m}^2/\text{g}$. Devido à alta energia de superfície, os nanomateriais podem se aglomerar. Resultados semelhantes são reportados na literatura,

como os de SOVIC *et al.* (2011) que relataram decréscimo de 50% na área de nanotubos de titanato após funcionalização com APTMS.

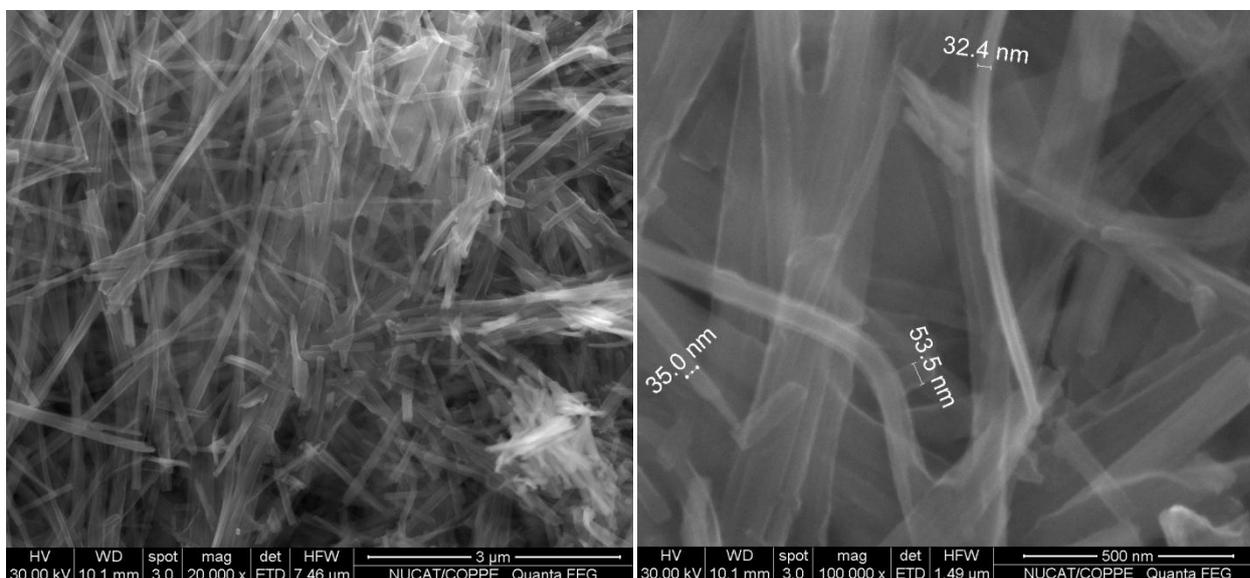


Figura 4.7. Micrografias da matriz NFT/APTMS/GLU após imobilização da HRP.

Os resultados apresentados confirmam a eficiência da inserção dos grupamentos funcionais e da imobilização da HRP. Esses resultados são coerentes com outros observados na literatura. LUECHINGER *et al.* (2005) estudaram a funcionalização de superfícies de sílica com o reagente APTMS e constataram que este fornece uma excelente âncora para a superfície e ativação de terminais amino. SOVIC *et al.* (2011), com a finalidade de imobilizar covalentemente a HRP, obtiveram sucesso em sua primeira etapa de funcionalização de nanotubos de titanato utilizando APTMS. Assim como neste trabalho, a metodologia adotada em seus estudos possibilitou uma eficiente inserção de grupos amino na superfície do nanomaterial.

4.3.2. Quantificação da Imobilização

Através do método de Bradford, estimou-se a quantidade de enzima imobilizada na matriz NFT/APTMS/GLU. O resultado foi de $1,62 \pm 0,46$ mg HRP/m² de matriz. Considerando a massa molar da HRP como 44 kDa (WELINDER, 1978) também foi possível estimar a área ocupada pelas moléculas de HRP, obtendo-se uma cobertura de

superfície de $2,21 \times 10^{12}$ moléculas por cm^2 . A Tabela 4.4 mostra a comparação com alguns resultados encontrados na literatura.

Tabela 4.4. Comparação da imobilização da HRP por diferentes estratégias.

Método	Enzima imobilizada ($\text{mg}_{\text{HRP}}/\text{m}^2$)	Enzima imobilizada ($\text{moléculas}_{\text{HRP}}/\text{cm}^2$)	Referência
NFT/APTMS/GLU/HRP	1,62	$2,21 \times 10^{12}$	Este trabalho
NFT/EDC/NHS/HRP	0,75	$1,03 \times 10^{12}$	NICOLINI <i>et al.</i> , 2013
NFT/HRP	1,70	$2,32 \times 10^{12}$	NICOLINI <i>et al.</i> , 2013
NFT/APTMS/1,4 BQ/HRP	1,05	$1,43 \times 10^{12}$	SOVIC <i>et al.</i> , 2011
Sílica mesoporosa/HRP	0,076	-	WAN <i>et al.</i> , 2012
Au/HRP	-	$2,0 \times 10^{12}$	RADI <i>et al.</i> , 2009
Nanocristais de diamante/HRP	-	$7,3 \times 10^{13}$	WANG <i>et al.</i> , 2012b

Observa-se que utilizando o glutaraldeído como agente de acoplamento, pode-se obter um valor superior de HRP imobilizada do que utilizando 1,4 benzoquinona. Como reportado por SOVIC *et al.* (2011), esta estratégia permite imobilizar $1,05 \text{ mg HRP}/\text{m}^2$ de matriz, o que corresponde $1,43 \times 10^{12}$ moléculas por cm^2 .

A estratégia de imobilização covalente através da inserção de grupos carboxílicos (NFT/EDC/NHS/HRP), estudada por NICOLINI *et al.* (2013), também resulta em valores inferiores de HRP imobilizada ($0,75 \text{ mg HRP}/\text{m}^2$ de matriz). Já a estratégia de adsorção física (NFT/HRP) permite imobilizações maiores, em contrapartida, observa-se maior dessorção devido à instabilidade das ligações fracas.

O valor encontrado é superior ao valor reportado por RADI *et al.* (2009) que, utilizando um eletrodo de ouro funcionalizado com ativação de grupos amino em

superfícies, obtiveram uma cobertura da superfície de $1,9 \times 10^{12}$ moléculas por cm^2 . WANG *et al.* (2012b) também conseguiram uma eficiente imobilização em nanocristais de diamante ($7,3 \times 10^{13}$ moléculas por cm^2). Estes resultados permitem concluir a eficácia da metodologia adotada de funcionalização da matriz para imobilização da HRP.

4.3.3. Atividade Residual

A atividade específica da HRP imobilizada é um parâmetro importante na eficiência do biossensor. Portanto, o efeito da adsorção sobre a atividade específica da HRP foi avaliado para a HRP imobilizada e comparada com a atividade específica exibida pela HRP livre. O resultado mostrou que a HRP livre apresenta atividade enzimática específica de $1014 \pm 150 \text{ U mg}^{-1}$, enquanto a HRP imobilizada apresenta atividade de $490 \pm 35 \text{ U mg}^{-1}$, ou seja, após a imobilização a enzima retém cerca de 48% de sua atividade específica. Este resultado é similar aos observados por CAMARONI *et al.* (2004), que reportaram perda de 60% da atividade enzimática da HRP após imobilização.

A imobilização covalente é a estratégia que resulta em menores perdas de atividade enzimática, o que viabiliza sua utilização na fabricação dos biossensores. A adsorção covalente permite uma ligação com orientação ordenada, não comprometendo sua estrutura conformacional. Já por adsorção física, a enzima é imobilizada por ligações fracas e apresenta um elevado grau de movimentação, o que resulta na quase anulação da sua atividade catalítica (NAKATA *et al.*, 1996).

FERANPOTOVA *et al.* (2002) observaram perda de 70% da atividade enzimática da HRP adsorvida de forma não específica em nanotubos de carbono. De acordo com outros estudos, a natureza hidrofóbica dos NFT pode forçar a enzima a orientar-se de forma que seu sítio ativo se torne indisponível para o substrato. As interações hidrofóbicas podem causar mudanças conformacionais em diversas regiões da enzima, levando a desnaturação ou inativação, bloqueio do sítio ativo, inibição da difusão do substrato para a enzima, dentre outros efeitos (ALLEN *et al.*, 2009; DI RISIO *et al.*, 2010).

A atividade enzimática residual também foi avaliada em função do tempo de armazenamento, visto que o tempo de vida útil e a durabilidade são características importantes no desenvolvimento de um biossensor. Para isso, os NFT contendo a HRP imobilizada foram armazenados a 4°C, imersos em solução 0,1 mol L⁻¹ PB (pH 7) e avaliados por 120 dias. Os resultados são apresentados na Figura 4.8.

Comparada à HRP livre, a HRP imobilizada mantém maior fração de sua atividade inicial. A HRP imobilizada (NFT/APTMS/GLU/HRP) mantém 56% da sua atividade inicial após 120 dias de estocagem. A HRP livre apresentou 25% de atividade inicial após o mesmo período.

Estes resultados podem ser explicados pela alta biocompatibilidade oferecida pelos NFT e pela estabilidade que a ligação covalente confere à proteína imobilizada em uma superfície sólida. A enzima imobilizada também apresenta maior estabilidade ao longo do tempo, preservando sua atividade, além de estabilidade em relação aos efeitos de variação de temperatura, pH, força iônica e solvente (VELDE *et al.*, 2002).

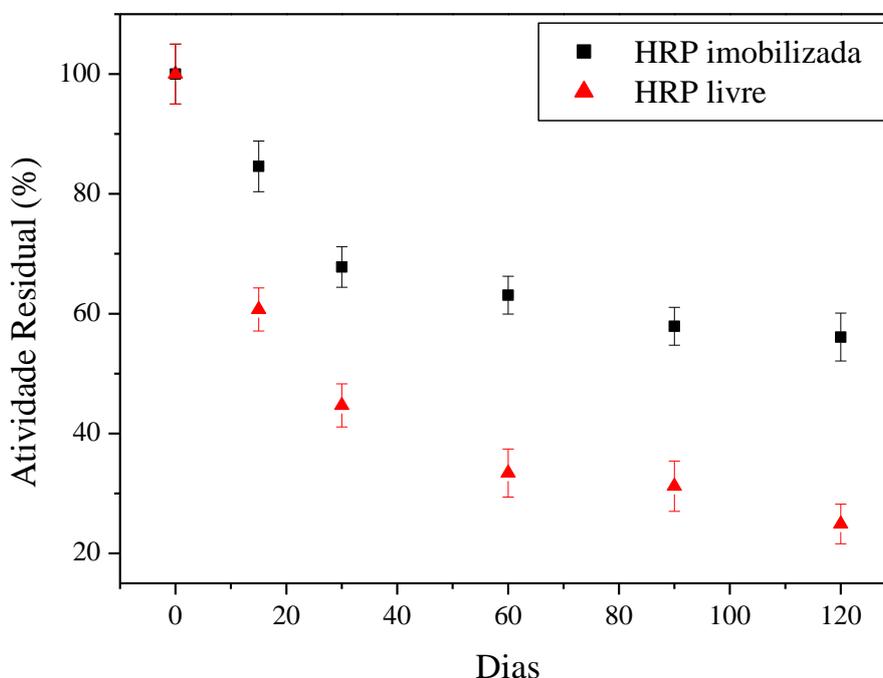


Figura 4.8. Atividade residual da HRP livre e imobilizada em função do tempo.

4.4. Caracterizações Eletroquímicas

4.4.1. Eletrodo de Pasta de Carbono

As primeiras caracterizações eletroquímicas foram realizadas com o biossensor construído em pasta de carbono. Como o eletrodo de pasta de carbono é facilmente preparado e apresenta boa atividade eletroquímica, este foi utilizado com o objetivo de caracterizar o caráter condutor dos NFT e verificar a manutenção da atividade electrocatalítica da enzima imobilizada.

4.4.1.1. Caracterização Eletroquímica dos NFT

A atividade eletroquímica do eletrodo de pasta de carbono foi estudada em solução de ferricianeto de potássio, do potencial de 0,8 V ao potencial de 0 V. A Figura 4.9 apresenta o resultado da voltametria cíclica do eletrodo de pasta de carbono (EPC) e do eletrodo de pasta de carbono modificado com 20% de NFT (EPC/NFT). Os voltamogramas cíclicos apresentados mostraram-se *quasi* - reversíveis e simétricos.

O eletrodo modificado com nanofios de titanato (Figura 4.9b) apresentou uma separação de picos ($\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}|$) de 70 mV, mostrando que os NFT são capazes de melhorar a reversibilidade do sistema quando comparado com EPC (Figura 4.9a), que apresentou um $\Delta E_p = 75$ mV.

O EPC/NFT apresentou correntes de pico anódica e catódica de 33,5 e 26,5 μ A, respectivamente. O EPC apresentou valores menores (15,2 e 14,6 μ A) para estes picos. Esse aumento em cerca de duas vezes no valor das correntes evidencia uma sensibilidade muito maior do EPC/NFT e também mostra que a presença dos NFT aumenta a área eletroativa do eletrodo e seu caráter condutor. Resultados similares foram obtidos para os nanomateriais de titanato em outros sistemas (TOKUDOME e MIYAUCHI, 2005).

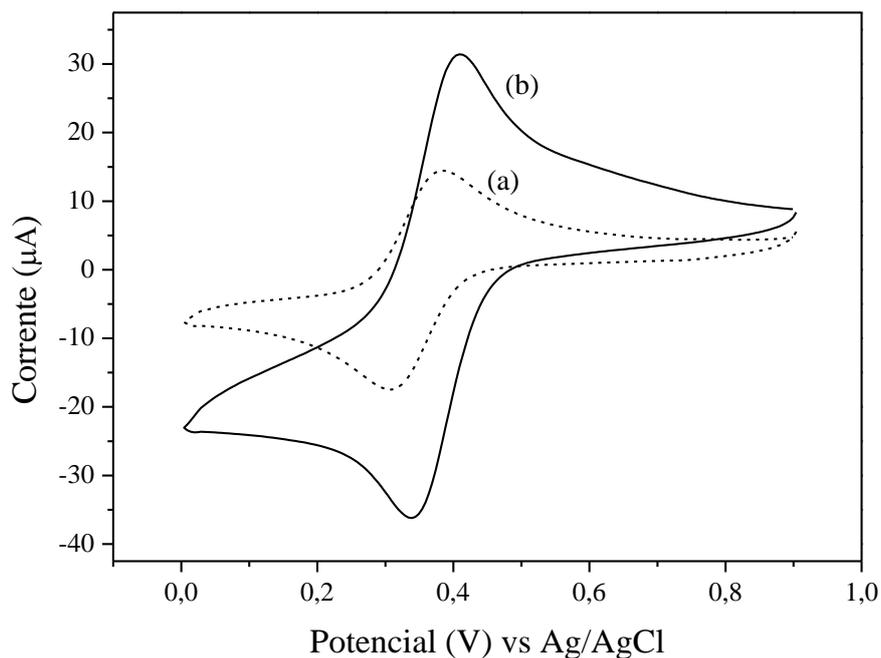


Figura 4.9. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos de (a) pasta de carbono e (b) pasta de carbono modificada com 20% de NFT, em solução 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e 1 mol L^{-1} de KCl na velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

4.4.1.2. Avaliação Eletroquímica do Biossensor

Foram realizadas análises de voltametria cíclica, em tampão PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7), na faixa de potencial de 0 a $-0,8 \text{ V}$ e com velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$, a fim de estudar a atividade enzimática da HRP no biossensor NFT/APTMS/GLU/HRP em pasta de carbono.

Na Figura 4.10, observa-se um pico de redução em torno de $-0,30 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ quando utilizado o biossensor, pico este que não apareceu para o eletrodo de pasta de carbono não modificado. O potencial de $-0,30 \text{ V}$ é um valor próximo a outros encontrados na literatura, como pode ser observado na Tabela 4.5. Sabe-se que quanto maior o potencial aplicado para redução do substrato, maiores serão as possibilidades de redução de espécies interferentes, o que não é desejado.

Tabela 4.5. Valores do potencial de redução da HRP imobilizada em diferentes substratos.

Substrato para imobilização da HRP	E (V) vs Ag/AgCl	Referência
NFT/APTMS/GLU	-0,30	Este trabalho
Eletrodo de grafite	0	LINDGREN <i>et al.</i> , 2000
Eletrodo de ouro	-0,05	GORTON <i>et al.</i> , 2003
SnO ₂ e TiO ₂ mesoporosos	-0,20	ASTUTI <i>et al.</i> , 2009
NFT	-0,24	ZHANG <i>et al.</i> , 2007
Nanotubos de carbono	-0,34	WANG <i>et al.</i> , 2012a
Nanopartículas de TiO ₂	-0,40	ZHANG <i>et al.</i> , 2004
Nanotubos de carbono	-0,64	ZHAO <i>et al.</i> , 2002

A mudança do potencial sugere a influência específica dos substratos sobre o potencial formal da proteína hemo, além do tipo de imobilização empregada, que afeta diretamente o sítio ativo da HRP e, conseqüentemente, seu potencial redox (ZHANG *et al.*, 2004). O valor do potencial encontrado neste trabalho mostrou-se mais negativo do que em materiais como eletrodo de ouro e eletrodo de grafite e mais positivo do que nanopartículas de TiO₂ e nanotubos de carbono.

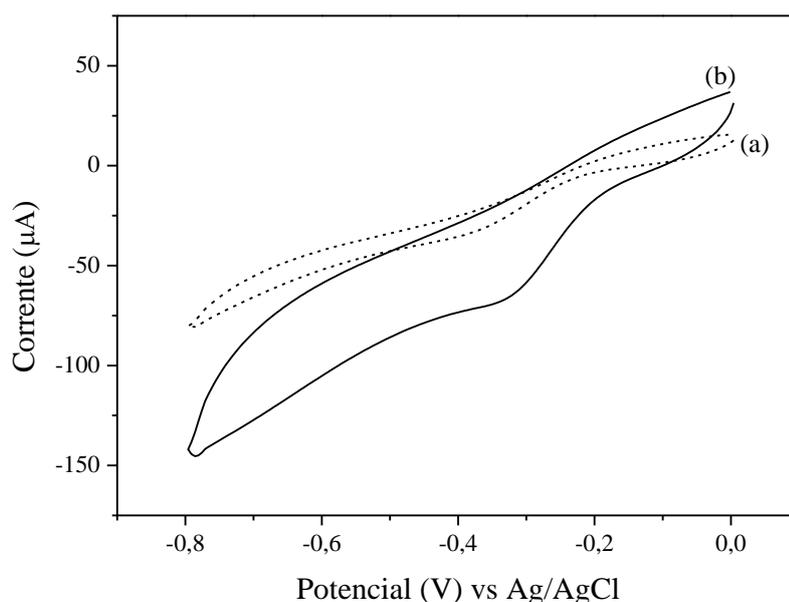


Figura 4.10. Voltamogramas cíclicos para (a) eletrodo de pasta de carbono e (b) biossensor de pasta de carbono em tampão PB 0,1 mol L⁻¹ (pH 7), velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹.

Como só houve o aparecimento do pico de corrente catódica, os resultados sugerem que a HRP immobilizada nos NFT sofre uma reação eletroquímica irreversível, similar a outros resultados observados na literatura (WU *et al.*, 2008). Conclui-se, portanto, que a HRP foi bem immobilizada nos NFT e sua atividade foi conservada.

A propriedade eletrocatalítica do biossensor em pasta de carbono também foi testada. A Figura 4.11 apresenta o ciclo voltamograma para o biossensor realizado em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PB (pH 7) em ausência (a) e em presença (b) de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 na velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$. Nota-se que o pico em torno de $-0,30 \text{ V}$, na presença de peróxido de hidrogênio, aumenta significativamente, comprovando que a redução do H_2O_2 tem origem na HRP immobilizada (KAFI *et al.*, 2008). Além disso, o pico foi deslocado para um potencial mais negativo ($-0,38 \text{ V}$), sugerindo que há a formação de algum novo composto durante o processo redox, como intermediário do processo eletrocatalítico da HRP (RUZGAS *et al.*, 1996).

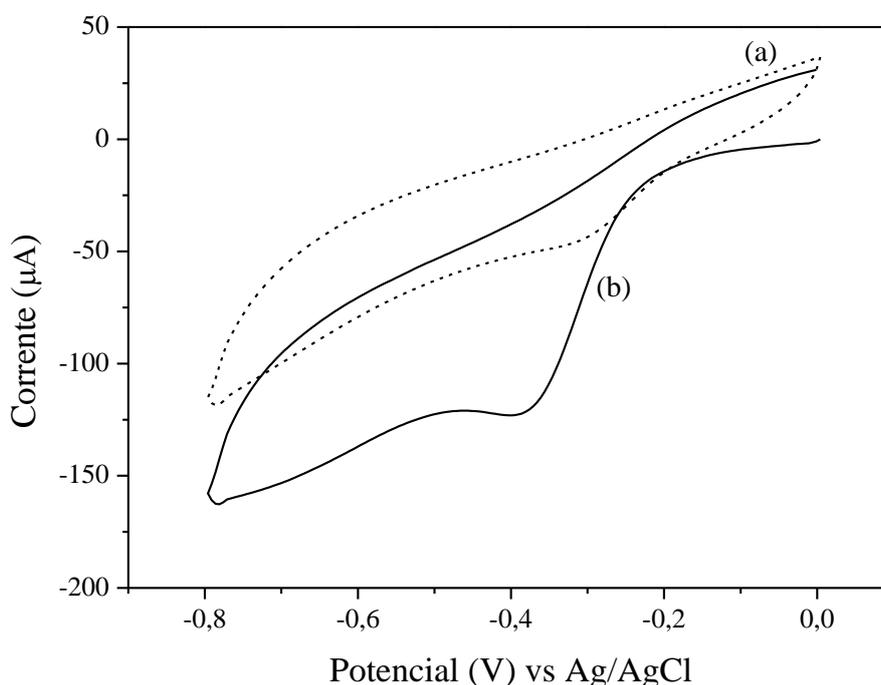


Figura 4.11. Voltamogramas cíclicos para o biossensor de pasta de carbono em (a) ausência de H_2O_2 e (b) presença de $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7), velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

4.4.2. Eletrodo de Tinta de Grafite

Após constatar que a HRP foi imobilizada nos NFT mantendo sua atividade electrocatalítica para redução do peróxido de hidrogênio, foram testadas outras plataformas de construção do biossensor visando a sua miniaturização.

4.4.2.1. Caracterização Eletroquímica do ETG

Com o objetivo de estudar a atividade eletroquímica do eletrodo de tinta de grafite, foi realizada a análise de voltametria cíclica em ferricianeto de potássio. Na Figura 4.12, observam-se novamente os picos característicos do sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$. A separação entre os picos ($\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}|$) foi de 455 mV e as correntes de pico anódica e catódica foram de 13,5 e 10,2 μA , respectivamente. Quando comparado com os voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de pasta de carbono e eletrodo de pasta de carbono modificado com NFT, constata-se que com o eletrodo de tinta de grafite o sistema se torna menos simétrico e reversível (maior valor de ΔE_p), e a corrente dos picos apresenta menor valor, o que demonstra menor sensibilidade do eletrodo de tinta de grafite. Apesar disso, os resultados permitem concluir que a tinta preparada é condutora e pode ser modificada para o preparo de biossensores.

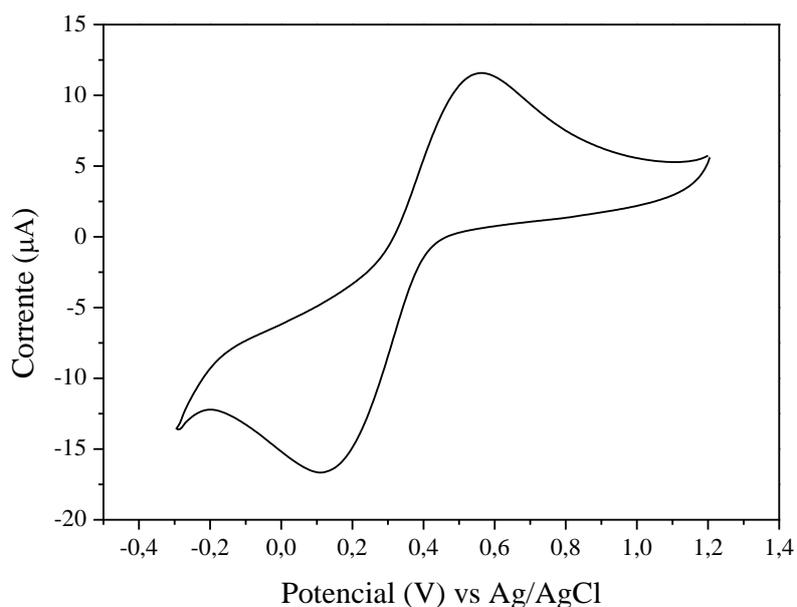


Figura 4.12. Voltamograma cíclico para o eletrodo de tinta de grafite em solução 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e 1 mol L^{-1} de KCl na velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

4.4.2.2. Avaliação Eletroquímica do Biossensor

O biossensor em tinta de grafite foi preparado através da modificação da tinta de grafite com 20% (m/v) de NFT/APTMS/GLU/HRP. Para estudar a atividade enzimática no novo biossensor, foram realizadas análises de voltametria cíclica, em tampão PB 0,1 mol L⁻¹ de PB (pH 7), na faixa de potencial de 0 a -0,8 V e com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹.

Na Figura 4.13 não se observa nenhum pico de redução para o biossensor nem para o eletrodo de tinta de grafite não modificado.

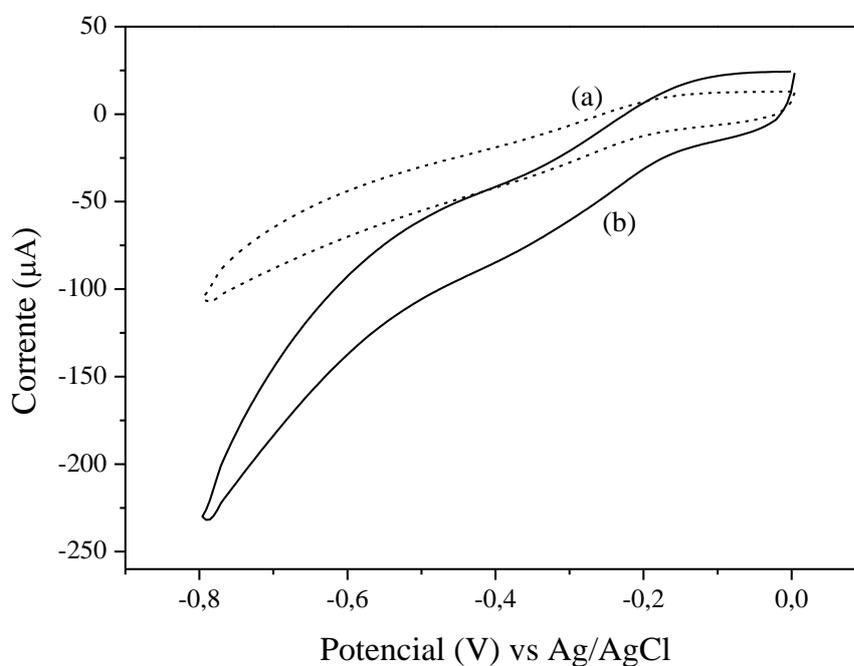


Figura 4.13. Voltamogramas cíclicos para (a) eletrodo de tinta de grafite e (b) biossensor de tinta de grafite em PB 0,1 mol L⁻¹ (pH 7), velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹.

Na Figura 4.14, nota-se que nem mesmo na presença de peróxido de hidrogênio houve resposta do biossensor. Esses resultados sugerem que, na presença dos solventes da tinta, a HRP perdeu sua atividade enzimática, podendo ter havido bloqueio do seu sítio ativo e impedimento da interação com peróxido de hidrogênio. Este resultado levou a outra estratégia, usando eletrodos impressos comerciais.

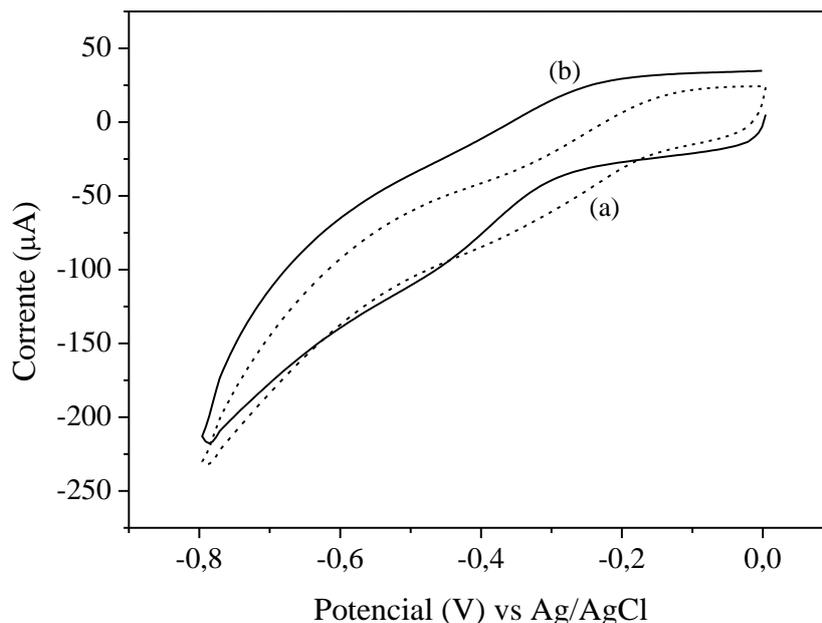


Figura 4.14. Voltamogramas cíclicos para o biossensor de tinta de grafite em (a) ausência de H_2O_2 e (b) presença de $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7), velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

4.4.3. Eletrodo Impresso

Realizou-se a modificação de eletrodos impressos comerciais, que contêm os eletrodos de trabalho, de referência e o contra eletrodo impressos no mesmo suporte.

4.4.3.1. Avaliação Eletroquímica do Biossensor

Com o propósito de estudar a transferência de elétrons da HRP no eletrodo impresso modificado com NFT/APTMS/GLU/HRP (biossensor), a técnica de voltametria cíclica foi empregada. As medições foram realizadas em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão PB (pH 7) na faixa de potencial de 0 a $-1,5 \text{ V}$ com velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Na Figura 4.15 é possível observar o aparecimento de um pico de redução em $-0,88 \text{ V vs. Ag}$ para o biossensor, pico este que não aparece no voltamograma do eletrodo impresso não modificado. Este pico refere-se à redução da HRP imobilizada, similar ao observado com o eletrodo de pasta de carbono.

O potencial de $-0,88\text{ V}$ *versus* o eletrodo de Ag do eletrodo impresso pode ser convertido para um potencial *versus* o eletrodo de Ag/AgCl. Considerando os potenciais do eletrodo de Ag como $0,799\text{ V}$ e o eletrodo de Ag/AgCl como $0,222\text{ V}$, obtém-se um potencial de $-0,30\text{ V vs Ag/AgCl}$, que é o mesmo valor encontrado para a redução da HRP usando o eletrodo de pasta de carbono.

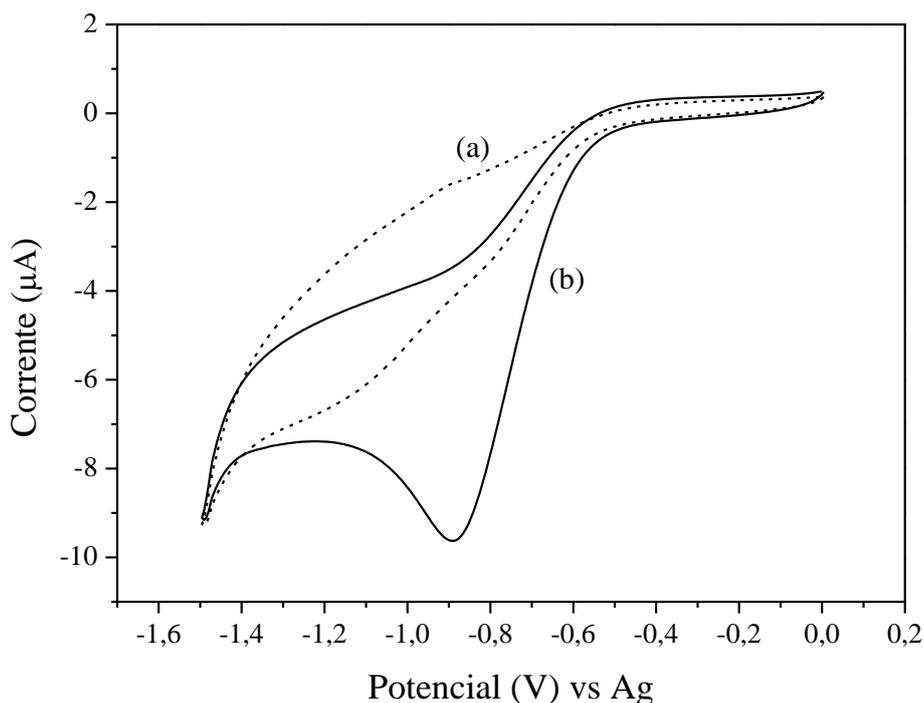


Figura 4.15. Voltamogramas cíclicos para (a) eletrodo impresso não modificado e (b) biossensor impresso em PB $0,1\text{ mol L}^{-1}$ (pH 7), velocidade de varredura de $0,1\text{ V s}^{-1}$.

A propriedade do biossensor impresso NFT/ATPMS/GLU/HRP para a redução do H_2O_2 foi estudada através da técnica de voltametria cíclica. A Figura 4.16 apresenta o ciclo voltamograma para o biossensor registrado em ausência e em presença de $2,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 na velocidade de varredura de $0,1\text{ V s}^{-1}$. Novamente, com H_2O_2 , o pico de redução em $-0,88\text{ V}$ aumenta e é deslocado para potencial mais negativo ($-0,98\text{ V}$), demonstrando que a HRP manteve sua propriedade bioeletrocatalítica de redução do H_2O_2 .

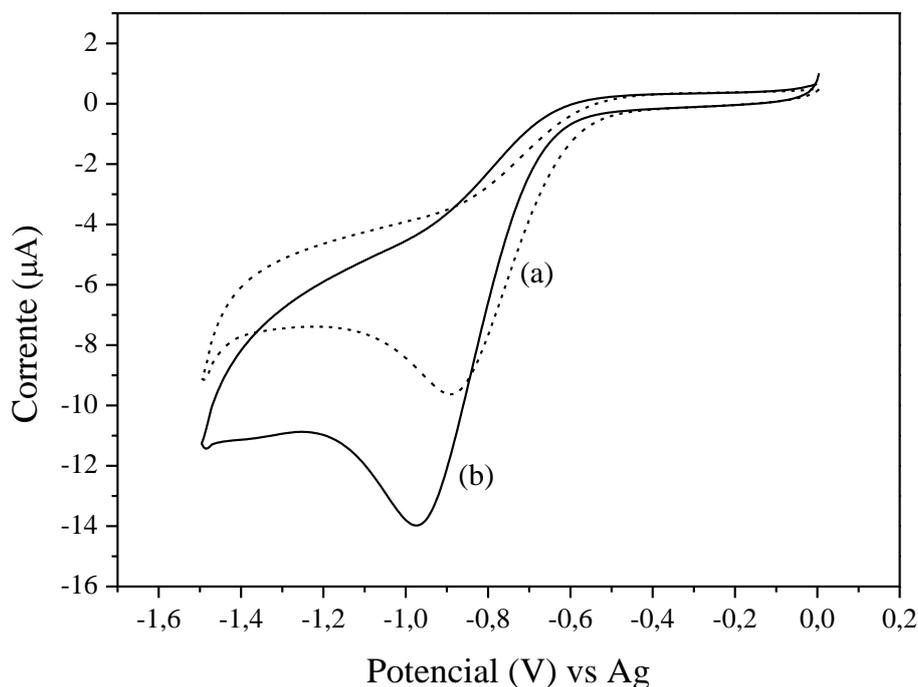


Figura 4.16. Voltamogramas cíclicos para o biossensor impresso em (a) ausência de H_2O_2 e (b) presença de $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7), velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

De acordo com a equação de Randles-Sevcik (Equação 4.1), a corrente do pico é diretamente proporcional à velocidade de varredura:

$$I_p = 2,686 \times 10^5 n^{3/2} A c D^{1/2} v^{1/2} \quad \text{Equação 4.1}$$

onde I_p é a corrente do pico, n é o número de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm^2), c é a concentração do analito (mol cm^{-3}), D é o coeficiente de difusão do analito ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}). Baseado nessa equação e através da técnica de voltametria cíclica, o efeito da velocidade de varredura foi estudado.

Na Figura 4.17, é apresentado o ciclo voltamograma do biossensor em tampão PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) com $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 , realizado em diferentes velocidades de varredura, que variaram de $0,01$ a $0,4 \text{ V s}^{-1}$. Constatase que em velocidades maiores de varredura, obtêm-se correntes catódicas de maior intensidade.

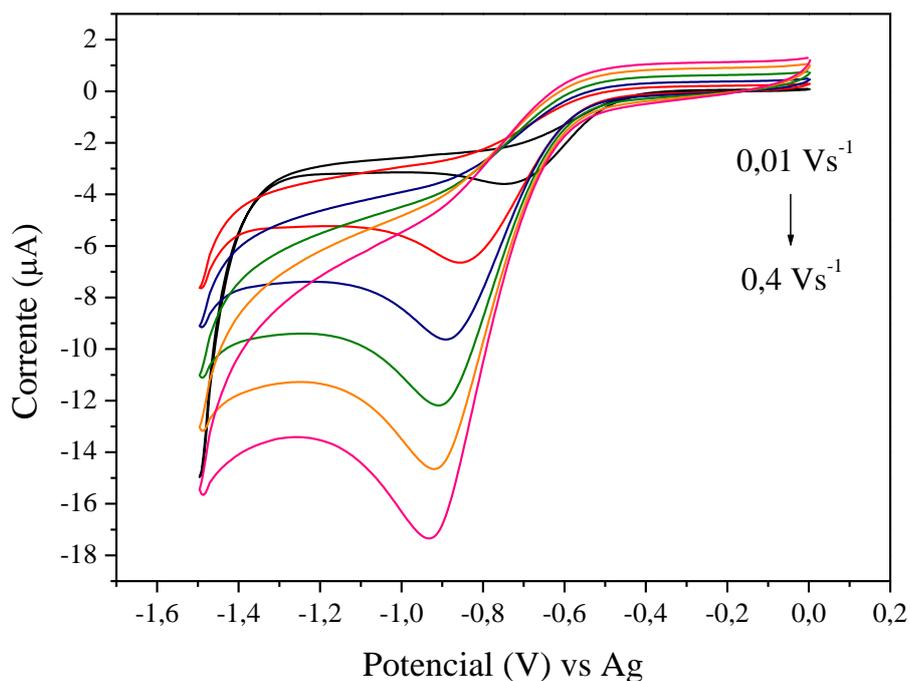


Figura 4.17. Voltamogramas cíclicos para o biossensor impresso em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) e $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 , com velocidade de varredura variando entre $0,01$ e $0,4 \text{ V s}^{-1}$.

A Tabela 4.6 apresenta os valores das correntes de pico catódico obtidos e a Figura 4.18 mostra a relação linear da corrente do pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura, conforme a Equação 4.1.

Tabela 4.6. Valores das correntes de pico catódico e velocidades de varredura.

Velocidade de varredura ($V s^{-1}$)	I_p (μA)
0,01	1,765
0,05	3,447
0,1	5,228
0,2	6,896
0,3	8,238
0,4	9,755

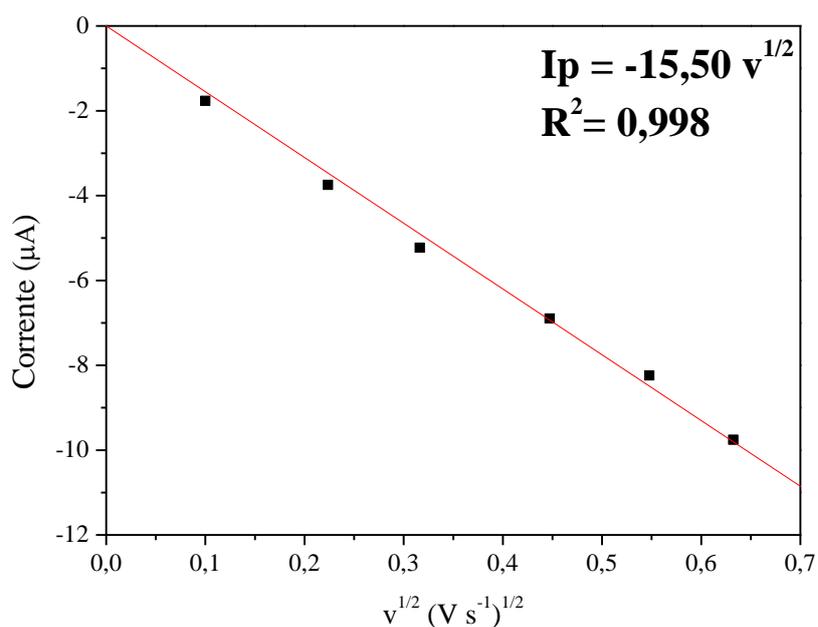


Figura 4.18. Dependência linear entre a corrente do pico catódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura.

Estes resultados sugerem que o processo é controlado pela reação na superfície do eletrodo, conforme processo irreversível (BARD e FAULKNER, 2001), também observado por outros trabalhos na literatura para a HRP imobilizada em nanomateriais (LI *et al.*, 2011, KAFI *et al.*, 2008, RAN *et al.*, 2011).

4.4.3.2. Características Analíticas

A resposta amperométrica do biossensor NFT/APTMS/GLU/HRP foi testada através da técnica de cronoamperometria, em uma célula de vidro contendo PB 0,1 mol L⁻¹ (pH 7), sob agitação, e no potencial de -0,98 V vs Ag.

A Figura 4.19 apresenta a resposta do biossensor a adições sucessivas de 20 µL de solução 0,02 mol L⁻¹ de H₂O₂. A curva analítica correspondente é apresentada na Figura 4.20.

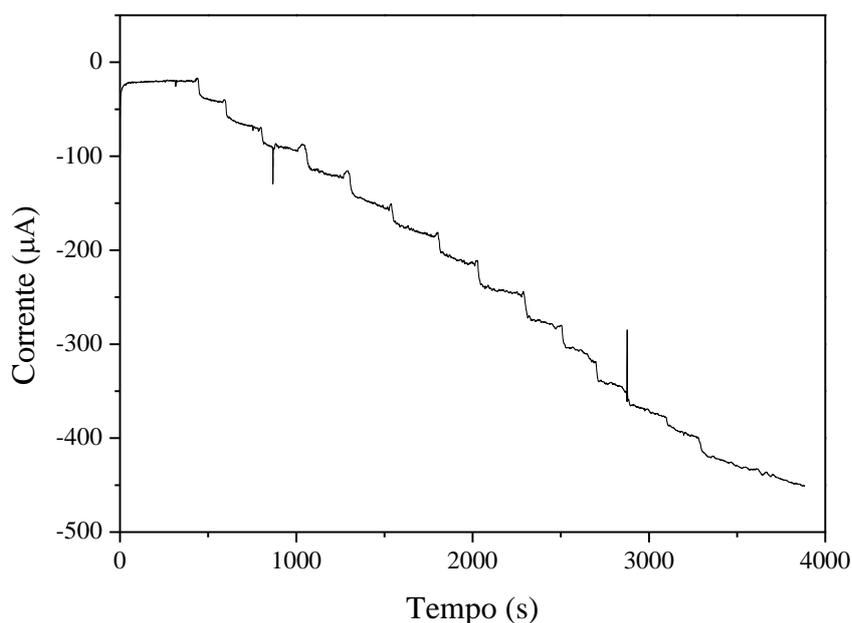


Figura 4.19. Resposta amperométrica do biossensor impresso NFT/APTMS/GLU/HRP a sucessivas adições de 20 µL de solução 0,02 mol L⁻¹ de H₂O₂ em potencial de -0,98 V.

O biossensor NFT/APTMS/GLU/HRP apresentou resposta linear na faixa de 40 a 560 µmol L⁻¹, com coeficiente de correlação de 0,998. O limite de detecção (LD), calculado de acordo com a Equação 3.5, foi de 10,7 µmol L⁻¹. Este valor encontra-se na mesma ordem de grandeza de outros biossensores impressos encontrados na literatura para detecção do peróxido de hidrogênio (Tabela 4.7). O limite de quantificação (LQ) encontrado foi de 35,6 µmol L⁻¹.

A partir dos dados obtidos por cronoamperometria, pôde-se determinar também a sensibilidade e o tempo de resposta de biossensor. O valor de sensibilidade foi de como $7,61 \mu\text{A L mmol}^{-1}$. O tempo de resposta – tempo que o biossensor leva para atingir o pico máximo de corrente após a adição de H_2O_2 – foi estimado em 15 segundos.

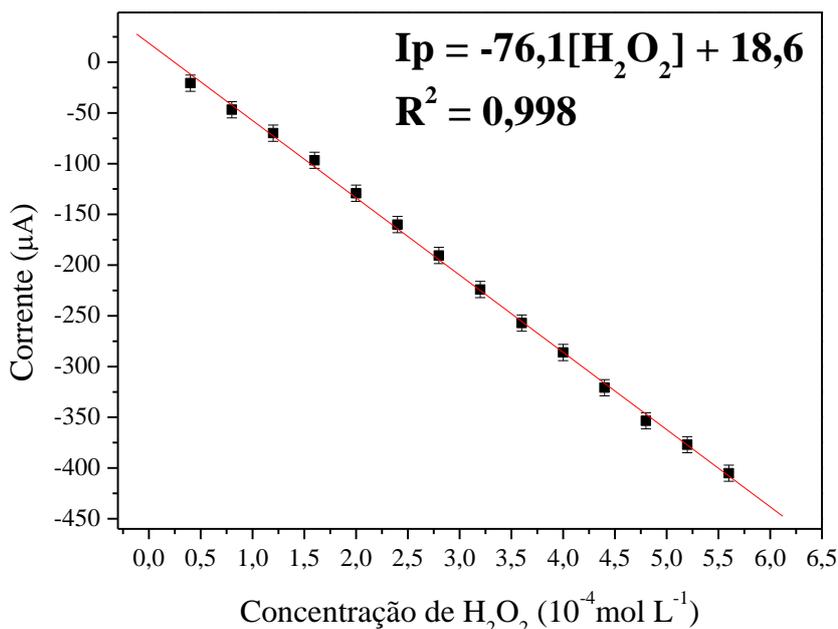


Figura 4.20. Curva analítica do biossensor impresso NFT/APTMS/GLU/HRP obtida a partir dos dados de cronoamperometria.

Além de baixo limite de detecção, é desejável que o biossensor apresente repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade. No estudo da repetibilidade foram realizadas dez medidas consecutivas de voltametria cíclica em uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PB (pH 7) contendo $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 . A repetibilidade do biossensor mediante os resultados de intensidade da corrente do pico foi avaliada através do cálculo do Desvio Padrão Relativo (RSD), cujo valor foi de 3,3%. O resultado é apresentado na Figura 4.21 e indica que o biossensor pode ser usado por mais de uma vez. As medidas de reprodutibilidade foram realizadas para três biossensores preparados em dias diferentes. As análises foram feitas sob as mesmas condições das análises de repetibilidade. Foi calculado o valor de RSD para as curvas obtidas (Figura 4.22) e o valor foi de 4,7%. Este valor indica que os biossensores impressos produzidos são reprodutíveis.

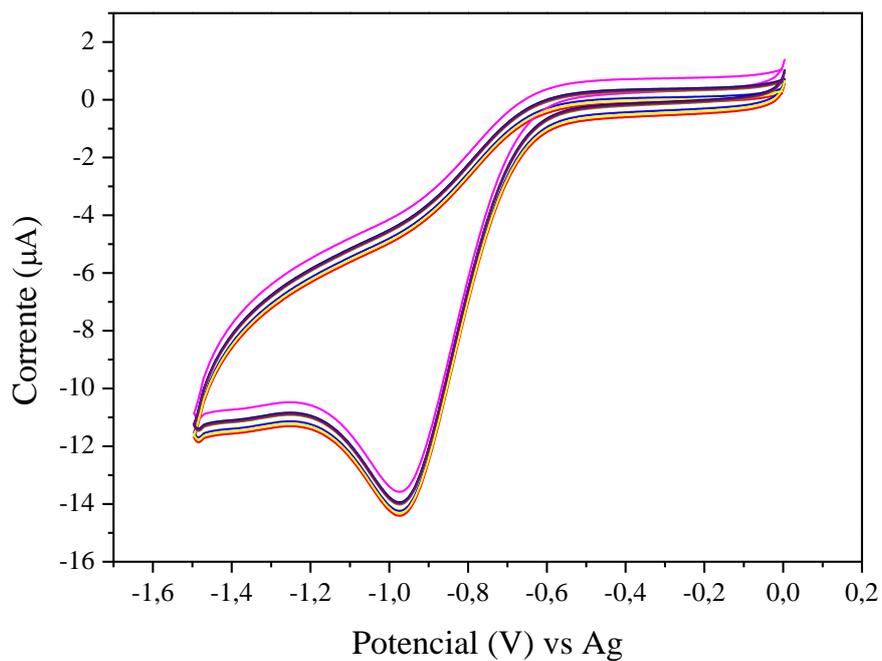


Figura 4.21. Medidas de repetibilidade do biossensor impresso em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) contendo $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 .

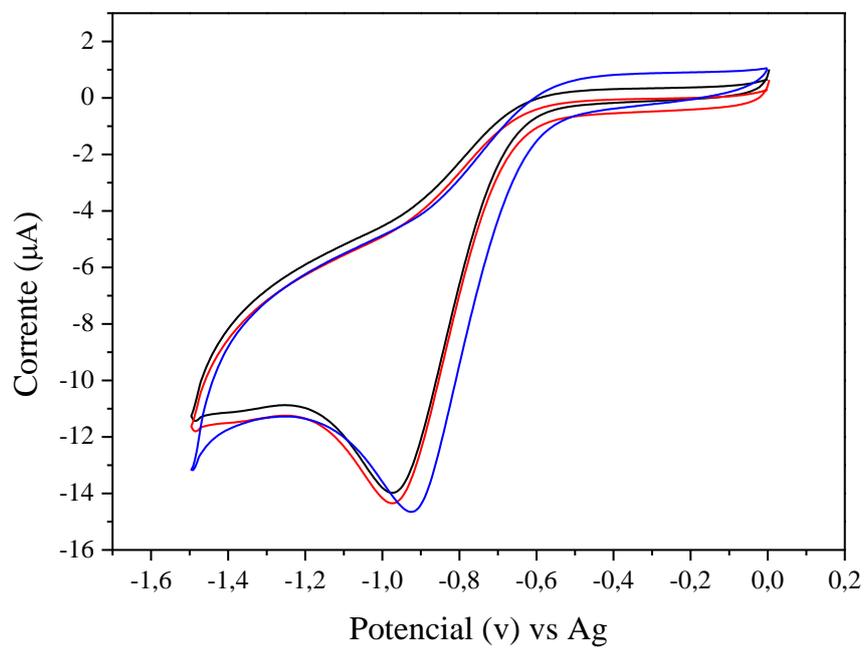


Figura 4.22. Medidas de reprodutibilidade do biossensor impresso em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) contendo $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 .

Para investigar a estabilidade do biossensor, a resposta da corrente catódica foi medida por um período de 30 dias. O biossensor preparado foi estocado a 4°C em tampão. Conforme mostra a Figura 4.23, no 15º dia o valor da corrente corresponde a um valor de 92% do valor inicial. Já no 30º dia a resposta do biossensor ainda é de 50% do valor inicial.

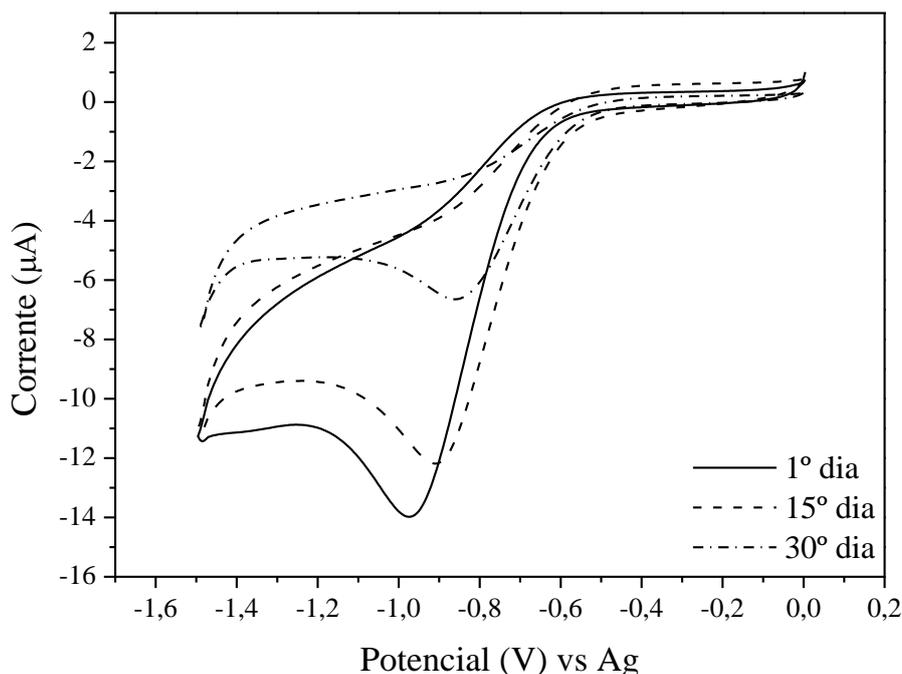


Figura 4.23. Avaliação da estabilidade do biossensor impresso em PB 0,1 mol L⁻¹ (pH 7) contendo 2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de H₂O₂.

A boa estabilidade observada nos primeiros 15 dias pode ser atribuída às condições de imobilização da HRP nos NFT, que geram um microambiente favorável e permitem a manutenção da atividade da enzima. Outras formas de estocagem, como em outros tampões, podem ser estudadas a fim de prolongar a estabilidade do biossensor.

A Tabela 4.7 compara o desempenho do biossensor impresso NFT/APTMS/GLU/HRP proposto neste trabalho para detecção do peróxido de hidrogênio com biossensores reportados na literatura, mostrando o desempenho do biossensor em estudo em termos de potencial de redução, linearidade, limite de detecção e estabilidade. A partir desses resultados, conclui-se que o biossensor desenvolvido é adequado para uso com amostras reais.

Tabela 4.7. Biossensores impressos enzimáticos para detecção de H₂O₂.

Biossensor impresso	Potencial (V vs Ag/AgCl)	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade ($\mu\text{A L mmol}^{-1}$)	Estabilidade % resposta (dias)	Referência
SPCE/NFT/APTMS/GLU/HRP	-0,4	40-560	10,7	7,6	92% (15)	Este trabalho
SPCE/GS-Nafion/Fe ₃ O ₄ -Au- HRP	-0,3	20-2.500	12	4,8	90% (28)	XIN <i>et al.</i> , 2013
SPCE/ERGO-HRP	-0,26	9-195	-	17,6	-	PALANISAMY <i>et al.</i> , 2012
SPCE/HRP	0	10-250	-	-	-	LEDRU <i>et al.</i> , 2006
SPCE/Nafion/HRP	-0,33*	5,98 - 35,36	0,48	14,3	95% (30)	TENG <i>et al.</i> , 2009
SPCE/CHIT/NpAu/HRP	-0,4	10-11.300	0,65	-	95% (30)	TANGKUARAM <i>et al.</i> , 2007
SPCE/THI/GLU/HRP	-	5-65	0,5	-	92% (30)	GAO <i>et al.</i> , 2004
SPCE/Au/HRP	-0,338*	0,8-1000	0,4	27,6	90% (30)	JU <i>et al.</i> , 2003
SPCE/Au/Hb	-0,227*	10-320	5,5	-	90% (30)	XU <i>et al.</i> , 2004

*Potencial vs eletrodo de calomelano.

SPCE – Eletrodo impresso de carbono; ERGO – Óxido de grafeno reduzido; CHIT – Quitosana; NpAu – Nanopartículas de ouro; Hb – Hemoglobina; GS – Folhas de grafeno; THI – Tionina; GLU – Glutaraldeído.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1. Conclusões

O dióxido de titânio precursor dos NFT foi sintetizado através da hidrólise lenta do isopropóxido de titânio, o que permitiu a obtenção de um material com predominância das fases cristalinas anatásio e bruquita e alta área superficial.

O método alcalino hidrotérmico é uma metodologia simples de preparo dos nanofios de titanato que possibilitou a síntese de titanatos protônicos com 99% de pureza e alta área superficial. Essas características aliadas à biocompatibilidade tornam os NFT excelentes materiais para a imobilização de enzimas, com grande potencial de uso na fabricação de biossensores. Os NFT oferecem um ambiente favorável para manter a estabilidade da enzima e aumentar o desempenho dos dispositivos de detecção. A facilidade com que podem ser sintetizados em grandes quantidades e alta pureza, seu baixo custo e boa estabilidade, e a facilidade com que podem ser modificados fazem deles potencialmente vantajosos quando comparados com outros materiais empregados na fabricação de biossensores.

Nanofios de titanato modificados com APTMS podem ser eficientemente empregados para imobilização covalente da HRP usando GLU como agente de acoplamento. A estratégia resultou em grandes quantidades de HRP imobilizada e com retenção de sua atividade catalítica. A manutenção da atividade enzimática se deve à ligação de forma ordenada que esse método de imobilização permite.

Caracterizações eletroquímicas evidenciaram que a presença dos NFT aumenta a área eletroativa do eletrodo e melhora a sua atividade eletroquímica. O biossensor NFT/APTMS/GLU/HRP construído em pasta de carbono mostrou-se eficiente na detecção de peróxido de hidrogênio, com potencial de redução de $-0,38 \text{ V vs Ag/AgCl}$. O processo redox se mostrou irreversível, ou seja, controlado pela reação na superfície do eletrodo. Estas caracterizações eletroquímicas revelaram que a HRP imobilizada manteve sua atividade biológica. Já o biossensor em tinta de grafite não apresentou eficiência na detecção do peróxido de hidrogênio, indicando inativação biológica da HRP na presença dos componentes da tinta.

O biossensor impresso NFT/APTMS/GLU/HRP pôde ser facilmente preparado pela modificação de eletrodos impressos comerciais. O biossensor apresentou pico de redução do H_2O_2 em $-0,98 \text{ V vs Ag}$, resposta linear na faixa de 40 a $560 \mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de $10,7 \mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, mostrou boa reprodutibilidade, repetibilidade e estabilidade.

5.2. Sugestões para Futuros Trabalhos

Como sugestões para trabalhos futuros propõem-se:

- ✓ O teste do biossensor com amostras reais
- ✓ O estudo de possíveis interferentes nas amostras reais
- ✓ Novas formulações da tinta a fim de que a enzima não perca sua atividade biológica
- ✓ Novas formas de armazenamento do biossensor impresso de forma a prolongar sua estabilidade e, conseqüentemente, seu tempo de vida útil.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASS, A.K., HART, J.P., COWELL, D., 2000, “Development of an amperometric sulfite biosensor based on sulfite oxidase with cytochrome c, as electron acceptor, and a screen-printed transducer”, *Sensors and Actuators B*, v. 62, p. 148–153.

ALLEN, B.L., KOTCHEY, G.P., YANAMALA, N.V.K., KLEIN, S.J., KAGAN, V.E., STAR, A., 2009, “Mechanistic investigations of horseradish peroxidase catalyzed degradation of single-walled carbon nanotubes”, *Journal of the American Chemical Society*, v. 191, p. 17194-17205.

ALVES, D.C.B., 2009, *Nanotubos de Titanatos aplicados como Sensores de Gás*. Dissertação MSc., Departamento de Física/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

ANDERSSON, S., WADSLEY, A.D., 1961, “The crystal structure of $K_2Ti_2O_5$ ”, *Acta Chemica Scandinavica*, v.15, pp. 663-669.

ANSARI, S.A., HUSAIN, Q., 2012, “Potential Applications of Enzymes Immobilized on/in Nano Materials: A review”, *Biotechnology Advances*, v. 30, n.3, p. 512-523.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, D.O.U. 02/06/2003: guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

ARYA, S.K., SINGH, S.P., MALHOTRA, B.D., “Electrochemical Techniques in Biosensors”. In: Marks, R., Cullen, D. C., Karube, I., Lowe, C. R., Weetall, H. H., *Handbook of Biosensors and Biochips*, chapter 22, New Delhi, Índia, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.

ASTUTI, Y., TOPOGLIDIS, E., CASS, A.G., DURRANT, J.R., 2009, “Direct spectroelectrochemistry of peroxidases immobilised on mesoporous metal oxide electrodes: Towards reagentless hydrogen peroxide sensing”, *Analytica Chimica Acta*, v. 648, p. 2-6.

ATANASOV, P., YANG, S., SALEHI, C., GHINDILIS, A.L., WILKINS, E., SCHADE, D., 1997, “Implantation of a refillable glucose monitoring—telemetry device”, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 12, n. 7, p. 669–680.

BADELLINO, C., RODRIGUES, C.A., BERTAZZOLI, R., 2006, “Oxidation of pesticides by in situ electrogenerated hydrogen peroxide: study for the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid”, *Journal of Hazardous Materials*, v. 137, n. 2, p. 856-864.

BARD, A.J., FAULKNER, L.R., 2001, *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*. 2 ed. New York, USA, John Wiley & Sons, Inc.

BARREIROS, A.L.B.S., DAVID, J.P., DAVID, J., 2006, “Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo”, *Química Nova*, v. 29, n.1, p. 113-123.

BAKKER, E., QIN, Y., 2006, "Electrochemical Sensors", *Analytical Chemistry*, v. 78, n. 12, p. 3965-3983.

BAVYKIN, D.V., FRIEDRICH, J.M., WALSH, F.C., 2006, "Protonated Titanates and TiO₂ Nanostructured Materials: Synthesis, Properties, and Applications", *Advanced Materials*, v. 18, n. 21, p. 2807-2824.

BENITEZ, F. J., BELTRAN-HEREDIA, J., ACERO, J. L., RUBIO, F. J., 2000, "Contribution of free radicals to chlorophenols decomposition by several advanced oxidation processes", *Chemosphere*, v. 41, p. 1271.

BENVENUTO, P., KAFI, A.K.M., CHEN, A., 2009, "High performance glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase onto modified titania nanotube arrays", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 627, p. 76–81.

BONI, T.C., 2011, *Desenvolvimento e Aplicação de Sensor Biomimético Descartável para Detecção Seletiva de Hidroquinona*. Dissertação MSc., Instituto de Química/Universidade Estadual Paulista Física, SP, Brasil.

BRAHIM, S., NARINESINGH, D., GUISEPPI-ELIE, A., 2001, "Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole-hydrogel membrane", *Analytica Chimica Acta*, v. 448, p.27–36.

BRUCKNER-LEA, C.J., 2004, "Biosensor Systems for Homeland Security", *Interface*, v. 13, p. 36-41.

BUFFI, N., MERULLA, D., BEUTIER, J., BARBAUD, F., BEGGAH, S., VAN LINTEL, H., RENAUD, P., VAN DER MEER, R., 2011, "Miniaturized bacterial biosensor system for arsenic detection holds great promise for making integrated measurement device" *Bioengineered Bugs*, v. 11, p. 2369–2377.

CAMARONI, S.S., FERNANDES, K.F., 2004, "Covalent immobilization of horseradish peroxidase onto poly(ethylene terephthalate)-poly(aniline) composite", *Process Biochemistry*, v. 39, p. 883-888.

CAMPANELLA, L., ROVERSI, R., SAMMARTINO, M. P., TOMASSETTI, M., 1998, "Hydrogen peroxide determination in pharmaceutical formulations and cosmetics using a new catalase biosensor", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 18, p. 105-116.

CAMPUZANO, S., GALVEZ, R., PEDRERO, M., VILLENA, F.J.M., PINGARRON, J.M., 2003, "An integrated electrochemical fructose biosensor based on tetrathiafulvalene-modified self-assembled monolayers on gold electrodes", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 377, p. 600–607.

CAO, Z., JIANG, X., XIE, Q., *et al.*, 2008, "A third-generation Hydrogen Peroxide Biosensor based on Horseradish Peroxidase Immobilized in a *Tetrathiafulvalene*-

tetracyanoquinodimethane/multiwalled Carbon Nanotubes Film”, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n.2, p. 222-227.

CARP, O., HUISMAN, C.L., RELLER, A., 2004, “Photoinduced Reactivity of Titanium Dioxide”, *Progress in Solid State Chemistry*, v. 32, n. 1-2, p. 33-177.

CASTILHO, T.J., 2003, *Desenvolvimento e avaliação de um biossensor amperométrico à base de peroxidase para determinação de neurotransmissores*, Tese D.Sc., Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil.

CASTILLO, J., GÁSPÁR, S., LETH, S., *et al.*, 2004, “Biosensors for Life Quality Design, Development and Applications”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 102, n. 2, p. 179-194.

CAVALIERI, R.P., CORCUERA, I.R.D., 2003, “Biosensors”. *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering*, p. 119-123.

CHAMBERS, J. P., ARULANANDAM, B. P., MATTA, L. L., WEIS, A., VALDES, J. J., 2008, “Biosensor Recognition Elements”, *Current Issues in Molecular Biology*, v.10, p. 1-12.

CHATTOPADHYAY, K., MAZUMDAR, S., 2000, “Structural and Conformational Stability of Horseradish Peroxidase: Effect of Temperature and pH”, *Biochemistry*, v. 39, n. 1, p. 263-270.

CHAUBEY, A., MALHOTRA, B.D., 2002, “Mediated Biosensors”, *Biosensors and Bioelectronics*, v.17, n. 6-7, p. 441-456.

CHEN, H., ZHANG, Z., CAI, D., *et al.*, 2011, “A Hydrogen Peroxide Sensor based on Ag Nanoparticles Electrodeposited on Natural Nano-structure Attapulgite Modified Glassy Carbon Electrode”, *Talanta*, v. 86, p. 266-270.

CHEN, S., YUAN, R., CHAI, Y., YIN, B., LI, W., MIN, L., 2009, “Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase on core-shell organosilica-chitosan nanospheres and multiwall carbon nanotubes composite”, *Electrochimica Acta*, v. 54, p. 3039-3046.

CHEN, W., CAI, S., REN, Q.Q., *et al.*, 2012, “Recent Advances in Electrochemical Sensing for Hydrogen Peroxide: a Review”, *Analyst*, v. 137, n.1, p. 49-58.

CHEN, Y.F., LEE, C.Y., YENG, M.Y., CHIU, H.T., 2003, “Preparing titanium oxide with various morphologies”, *Materials Chemistry and Physics*, v. 81, p. 39-44.

CHOI, J.W., KIM, Y.K., LEE, I.H., MIN, J., LEE, W.H., 2001, “Optical organophosphorus biosensor consisting of acetylcholinesterase/viologen hetero Langmuir-Blodgett film”, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, p. 937-943.

- CHOI, M.M.F., YIU, T.P., 2004, "Immobilization of Beef liver Catalase on Eggshell Membrane for Fabrication of Hydrogen Peroxide Biosensor", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34, n. 1, p. 41-47.
- CIOLINO, H. P., LEVINE, R. L., 1997, "Modification of Proteins in Endothelial Cell Death during Oxidative Stress", *Free Radical Biology and Medicine*, v. 22, pp. 1277-1282.
- CLAPP, P.A., EVANS, D. F., SHERIFF, T.S.S., 1989, "Spectrophotometric Determination of Hydrogen Peroxide after Extraction with Ethyl Acetate", *Analytica Chimica Acta*, v. 218, p. 331-334.
- COOPER, W. J., ZIKA, R. G., PETASNE, R. G., PLANE, J. M. C., 1988, "Photochemical formation of hydrogen peroxide in natural waters exposed to sunlight", *Environmental Science and Technology*, v. 22, p. 1156-1160.
- COSTA NETO, CLAUDIO. "Análise Orgânica: Métodos e Procedimentos para Caracterização de Organoquímios", volume 1, editora UFRJ, 2004.
- DAVIS, F., COLLYER, S. D., HIGSON, S. P. J., "Overview of Modern Analytical Needs", *Handbook of Biosensors and Biochips*, chapter 2, New Delhi, Índia, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.
- DI RISIO, S., YAN, N., 2009, "Adsorption and inactivation behavior of horseradish peroxidase on cellulosic fiber surface", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 338, p. 410-419.
- DÍAZ, A. N., SANCHEZ, F. G., GARCIA, J. A. G., 1996, "Hydrogen peroxide assay by using enhanced chemiluminescence of the luminol-H₂O₂-horseradish peroxidase system: Comparative studies", *Analytica Chimica Acta*, v. 327, p. 161-165.
- ERDEM, A., PABUCCUOGLU, A., MERIC, B., *et al.*, 2000, "Electrochemical Biosensor Based on Horseradish Peroxidase for the Determination of Oxidizable Drugs", *Turkish Journal of Medical Sciences*, v. 30, n. 1, p. 349-354.
- ESCOBAR, R., GARCIA-DOMINGUEZ, S., GUIRAUM, A., MONTES, O., GALVAN, F., ROSA, F. F., 2000, "A flow injection chemiluminescence method using Cr(III) as a catalyst for determining hydrogen peroxide. Application to H₂O₂ determination in cultures of microalgae", *Luminescence*, v. 15, p. 131-135.
- EVERSE, J., EVERSE, K. E., GRISHAM, M. B., *Peroxidases in Chemistry and Biology*, CRC Press: New York, 1991.
- FEIST, T.P., DAVIES, P.K., 1992, "The soft chemical synthesis of TiO₂ (B) form layered titanate", *Journal of Solid State Chemistry*, v. 101, p. 275-295.
- FERANPOTOVA, E., PURGANOVA, E., 2002, "Effect of pH on direct electron transfer between graphite and horseradish peroxidase", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 518, p. 20-26.

FERANPOTOVA, E., 2004, “Direct Peroxidase Bioelectrocatalysis on a Variety of Electrode Materials”, *Electroanalysis*, v. 16, p. 1101-1112.

FRADEN, J., 2003, *Handbook of Modern Sensors- Physics, Designs and Applications*. 3 ed. New York, Springer – Verlag.

FREIRE, R.S., PELEGRINI, R., KUBOTA, L.T., *et al.*, 2000, “Novas Tendências para o Tratamento de Resíduos Industriais contendo Espécies Organocloradas”, *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 504-511.

GALLI, A., 2011, *Desenvolvimento de um Biossensor Bienzimático Imobilizado sobre Monocamadas Auto-organizadas para Determinação de Açúcares em Alimentos*. Tese de D.Sc., Instituto de Química/UFSCar, São Carlos, SP, Brasil.

GAO, Q., YANG, F., MA, Y., YANG, X., 2004, The Modification of Screen-Printed Carbon Electrodes with Amino Group and Its Application to Construct a H₂O₂ Biosensor”, *Electroanalysis*, v.16, p. 730-735.

GAO, T., FJELLVAG, H., NORBY, P., 2008, “Crystal Structures of Titanate Nanotubes: a Raman Scattering Study”, *Inorganic Chemistry*, v. 48, n. 4, p. 1423-1432.

GIANNOUDI, L., PILETSKA, E.V., SERGEY, A.P., “Development of Biosensors for the Detection of Hydrogen Peroxide”. In GIARD, M.T., PILETSKA, E.V., *Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices*, 1 ed., chapter 6, USA, Springer, 2006.

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

GILMARTIN, M. A. T., HART, J. P., 1994, “Novel, reagentless, amperometric biosensor for uric acid based on a chemically modified screen-printed carbon electrode coated with cellulose acetate and uricase”, *Analyst*, v. 119, p. 833-840.

GORTON, L., FERANPOTOVA, E., 2003, “Bioelectrocatalytical Detection of H₂O₂ with Different Forms of Horseradish Peroxidase Directly Adsorbed at Polycrystalline Silver and Gold”, *Electroanalysis*, v. 15, p. 484-491.

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

GUILBAULT, G. G., PALLESCHI, G., LUBRANO, G., 1995, “Non-invasive biosensors in clinical analysis”, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 10, p. 379–392.

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

- HART, J. P., WRING, S. A., BRACEY, L., BIRCH, B. J., 1990, "Development of screen-printed carbon electrodes, chemically modified with cobalt phthalocyanine, for electrochemical sensor applications", *Analytica Chimica Acta*, v. 231, p. 203-212.
- HOLM, T.R., GEORGE, G.K., BARCELONA, M.J., 1987, "Fluorometric Determination of Hydrogen Peroxide in Groundwater", *Analytical Chemistry*, v. 59, n. 4, p. 582-586.
- HORI, Y., TAKAHASHI, R., YOSHINAMI, Y., MURATA, A., 1997, "Electrochemical Reduction of CO at a Copper Electrode", *Journal of Physical Chemistry B*, v. 101, p. 7075-7081.
- HOWER, R. W., SHIN, J. H., CHA, G. S., MERUVA, R. K., MEYERHOFF, M. E., BROWN, R. B., 1996, "New solvent system for the improved electrochemical performance of screen-printed polyurethane membrane-based solid-state sensors", *Sensors and Actuators B*, v. 33, p. 168-172.
- HUA, M.Y., CHEN, H. C., CHUANG, C.K., *et al.*, 2011, "The Intrinsic Redox Reactions of Polyamic Acid Derivatives and their Application in Hydrogen Peroxide Sensor", *Biomaterials*, v. 32, n. 21, p. 4885-4895.
- HULANICKI, A., GLAB, S., INGMAN, F., 1991, "Chemical Sensors Definitions and Classification", *Pure and Applied Chemistry*, v. 63, n. 9, p. 1247-1250.
- IDAKIEV, V., YUAN, Z.Y., TABAKOVA, T., SU, B.L., 2005, "Titanium oxide nanotubes as supports of nano-sized gold catalysts for low temperature water-gas shift reaction", *Applied Catalysis A*, v.281, p. 149-155.
- JIA, J., GUAN, W., SIM, M., LI, Y., LI, H., 2008, "Carbon nanotubes based glucose needle-type biosensor", *Sensors*, v. 8, p. 1712-1718.
- JIA, J., WANG, B., WU, A., *et al.*, 2002, "A Method to Construct a Third-Generation Horseradish Peroxidase Biosensor: Self-Assembling Gold Nanoparticles to Three-Dimensional Sol-Gel", *Analytical Chemistry*, v. 74, n. 9, p. 2217-2223.
- JOSHI, U.A., LEE, J.S., 2005, "Template-Free Hydrothermal Synthesis of Single-Crystalline Barium Titanate and Strontium Titanate Nanowires", *Small*, v.1, p.1172-1176.
- JU, H., XU, X., LIU, S., 2003, "A Novel Hydrogen Peroxide Sensor via the Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase Immobilized on Colloidal Gold Modified Screen-printed Electrode", *Sensors*, v. 3, p. 350-360.
- KAFI, A.K.M., WU, G., BENVENUTO, P., CHEN, A., 2011, "Highly sensitive amperometric H₂O₂ biosensor based on hemoglobin modified TiO₂ nanotubes", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 662, n. 1, p. 64-69.

KAFI, A.K.M., WU, G., CHEN, A., 2008, "A novel hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase onto Au-modified titanium dioxide nanotube arrays", *Biosensors and bioelectronics*, v. 24, n. 4, p. 566-571.

KARYAKIN, A., "Chemical and biological sensors based on electroactive inorganic polycrystals". In: ZHANG, X., JU, H., WANG, J., *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*, 1 ed., chapter 13, USA, Elsevier Inc., 2008.

KASUGA, T., HIRAMATSU, M., HOSON, A., SEKINO, T., NIIHARA, K., 1999, "Titania Nanotubes Prepared by Chemical Processing", *Advanced Materials*, v. 11, n.15, p. 1307-1311.

KIM, E. J., HARUYAMA, T., YANAGIDA, Y., KOBATAKE, E., AIZAWA, M., 1999, "Disposable creatinine sensor based on thick-film hydrogen peroxide electrode system", *Analytica Chimica Acta*, v. 394, p. 225-231.

KIM, G.Y., LEE, K.B., CHO, S.H., *et al.*, 2005, "Electroenzymatic Degradation of azo dye using an Immobilized Peroxidase Enzyme". *Journal of Hazardous Materials*, v. 126, n. 1-3, p. 183-138.

KIM, J., GRATE, J.W., WANG, P., 2006, "Nanostructures for Enzyme Stabilization", *Chemical Engineering Science*, v. 61, n. 3, p. 1017-1026.

KULYS, J., 1992, "Flow-through amperometric sensor for hydrogen peroxide monitoring in gaseous media", *Sensors and Actuators B*, v.9, p. 143-147.

LARISCH, B.C., DUFF, S.J.B., 1997, "Effect of H₂O₂ and DTPA on the characteristics and treatment of TCF (totally chlorine-free) and ECF (elementally chlorinefree) kraft pulping effluents", *Water Science and Technology*, v. 35, n. 2-3, p. 163-171.

LAURENT, N., HADDOUB, R., FLITSCH, S.L., 2008, "Enzyme catalysis on solid surfaces", *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 6, p. 328-337.

LEDRU, S., RUILLE, N., BOUJTITA, M., 2006, "One-step screen-printed electrode modified in its bulk with HRP based on direct electron transfer for hydrogen peroxide detection in flow injection mode", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 21, p. 1591-1598.

LEE, Y. N., SHEN, J., KLOTZ, P. J., 1986, "Chemical composition of precipitation at Long Island, NY.", *Water, Air and Soil Pollution*, v. 30, p. 143.

LI, L., DU, Z., LIU, S., *et al.*, 2010, "A Novel Nonenzymatic Hydrogen Peroxide Sensor based on MnO₂/graphene Oxide Nanocomposite", *Talanta*, v. 82, n. 5, p. 1637-1641.

LI, M., LI, Y.T., LI, D.W., LONG, Y.T., 2012, "Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays-A review", *Analytica Chimica Acta*, v. 734, p. 31-44.

- LI, M., XU, S., TANG, M., *et al.*, 2011, “Direct electrochemistry of horseradish peroxidase on graphene-modified electrode for electrocatalytic reduction towards H₂O₂”, *Electrochimica Acta*, v. 56, n. 3, p. 1144-1149.
- LI, Z., CUI, X., ZHENG, J., *et al.*, 2007, “Effects of Microstructure of Carbon Nanofibers for Amperometric Detection of Hydrogen Peroxide”, *Analytica Chimica Acta*, v. 597, n. 2, p. 238-244.
- LIN, S.S., GUROL, M.D., 1996, “Heterogeneous catalytic oxidation of organic compounds by hydrogen peroxide”, *Water Science and Technology*, v. 34, n. 9, p. 57-64.
- LINDGREN, A., RUZGAS, T., GORTON, L., *et al.*, 2000, “Biosensors based on novel peroxidases with improved properties in direct and mediated electron transfer”, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 15, p. 491-497.
- LIU, A., WEI, M., HONMA, I., *et al.*, 2005, “Direct Electrochemistry of Myoglobin in Titanate Nanotubes Film contrast to the significant denaturation of Mb in TNP film”, *Analytical Chemistry*, v. 77, n. 24, p. 8068-8074.
- LIU G, LIN Y, OSTATNA V, WANG J., 2005, “Enzyme nanoparticles-based electronic biosensor”, *Chemical Communications*, p. 3481–3483.
- LIU, H., YING, T., SUNA, K., *et al.*, 1997, “Reagentless Amperometric Biosensors Highly Sensitive to Hydrogen Peroxide , Glucose and Lactose based on N-methyl Phenazine Methosulfate Incorporated in a Nafion Film as an Electron Transfer Mediator Between Horseradish Peroxidase and an Electrode”, *Analytical Chimica Acta*, v. 344, n. 97, p. 187-199.
- LIU, S., CHEN, A., 2005, “Coadsorption of Horseradish Peroxidase with Thionine on TiO₂ Nanotubes for Biosensing”, *Langmuir*, v.21, p. 8409-8413.
- LIU, W.N., DING, D., SONG, Z.L., BIAN, X., *et al.*, 2014, “Hollow graphitic nanocapsules as efficient electrode materials for sensitive Hydrogen peroxide detection”, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 52, p. 438–444.
- LIU, X., FENG, H., ZHAO, R., *et al.*, 2012, “A Novel Approach to Construct a Horseradish Peroxidase|hydrophilic Ionic Liquids|Au Nanoparticles Dotted Titanate Nanotubes Biosensor for Amperometric Sensing of Hydrogen Peroxide”, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 31, n. 1, p. 101-104.
- LIU, X., ZWEIER, J.L., 2001, “A real-time Electrochemical Technique for Measurement of Cellular Hydrogen Peroxide Generation and Consumption: Evaluation in Human Polymorphonuclear Leukocytes”, *Free Radical Biology and Medicine*, v. 31, n. 7, p. 894-901.
- LIU, Z., ZHANG, X., NISHIMOTO, S., *et al.*, 2007, “Anatase TiO₂ Nanoparticles on rutile TiO₂ Nanorods: a Heterogeneous Nanostructure via Layer-by-Layer Assembly”, *Langmuir*, v. 23, n. 22, p. 10916-10919.

- LOMILLO, M.A.A., RENEDO, O.D., MARTÍN, A.H., MARTÍNEZ, M.J.A., 2009, "Horseradish peroxidase covalent grafting onto screen-printed carbon electrodes for levetiracetam chronoamperometric determination", *Analytical Biochemistry*, v. 395, p. 86-90.
- LOMILLO, M.A.A., RENEDO, O.D., MARTÍN, A.H., ROMÁN, L.T., 2011, "Horseradish peroxidase-screen printed biosensors for determination of Ochratoxin A", *Analytica Chimica Acta*, v. 688, p. 49-53.
- LOWE, C.R., "Overview of Biosensor and Bioarray Technologies". In: Marks, R., Cullen, D. C., Karube, I., Lowe, C. R., Weetall, H. H., *Handbook of Biosensors and Biochips*, chapter 1, New Delhi, India, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.
- LUECHINGER, M., PRINS, R., PIRNGRUBER, G.D., 2005, "Functionalization of Silica Surfaces with Mixtures of 3-aminopropyl and Methyl Groups", *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 85, n. 1-2, p. 111-118.
- LUO, P., XIE, G., LIU, Y., XU, H., DENG, S., SONG, F., 2008, "Electrochemical detection of blood alcohol concentration using a disposable biosensor based on screen-printed electrode modified with Nafion and gold nanoparticles", *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 46, p. 1641-1647.
- LUO, X., MORRIN, A., KILLARD, A., SMYTH, M., 2006, "Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors", *Electroanalysis*, v.18, p. 319-326.
- LUO, Y., LIU, H., RUI, Q., *et al.*, 2009, "Detection of Extracellular H₂O₂ Released from Human Liver Cancer Cells based on TiO₂ Nanoneedles with Enhanced Electron Transfer of Cytochrome c", *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 8, p. 3035-3041.
- LUPPA, P.B., SOKOLL, L.J., CHAN, D.W., 2001, "Immunosensors- principles and applications to clinical chemistry", *Clinica Chimica Acta*, v. 314, p. 1-26.
- LYON, J.L., STEVENSON, K.J., 2008, "Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase based on halloysite nanotubes/chitosan nanocomposite film", *Electrochimica Acta*, v. 53, p. 6714-6721.
- MAAB, F., ELIAS, H., WANNOWIUS, K. J., 1999, Kinetics of the oxidation of hydrogen sulfite by hydrogen peroxide in aqueous solution: ionic strength effects and temperature dependency", *Atmospheric Environment*, v. 33, p. 4413-4420.
- MATEO, C., ABIAN, O., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M., 2000, "Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment", *Enzyme and Microbial Technology*, v.26, p. 509-515.
- MATHUR, S., ERDEM, A., CAVELIUS, C., BARTH, S., ALTMAYER, J., 2009, "Amplified electrochemical DNA-sensing of nanostructured metal oxide films deposited on disposable graphite electrodes functionalized by chemical vapor deposition", *Sensors Actuators B*, v. 136, p. 432-437.

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

MELLO, L.D; KUBOTA, L.T., 2007, “Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation”, *Talanta*, v. 72, p. 335–348.

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

MICHELINI, E., RODA, A., 2012, “Staying alive: new perspectives on cell immobilization for biosensing purposes”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, p. 1785–1797.

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

MOODY, G. J., SANGHERA, G. S., THOMAS, J. D. R., 1986, “Amperometric enzyme electrode system for the flow injection analysis of glucose”, *Analyst*, v. 111, p. 605-609.

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

NAKATA S., KIDO N., HAYASHI, M., HARA M., SASABE, H., SUGAWARA, T., MATSUDA, T., 1996, “Chemisorption of proteins and their thiol derivatives onto gold surfaces: characterization based on electrochemical nonlinearity”, *Biophysical Chemistry*, v. 62, p. 63-72.

NASCIMENTO, V.B., ANGNES, L., 1998, “Eletrodos fabricados por silk screen”, *Química Nova*, v. 21, p. 614-629.

NAVES, A.F., 2008, *Estudo da adsorção de horseradish peroxidase (HRP) sobre superfícies planas e de sua atividade catalítica*. Tese de D.Sc., Instituto de Química/USP, São Paulo, SP, Brasil.

NEWMAN, J. D., WHITE, S. F., TOTHILL, I. E., TURNER, A. P.F., 1995, “Catalytic Materials, Membranes, and Fabrication Technologies Suitable for the Construction of Amperometric Biosensors”, *Analytical Chemistry*, v. 67, p. 4594-4599.

NICELL, J.A., WRIGHT, H., 1997, “A Model of Peroxidase Activity with Inhibition by Hydrogen Peroxide”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, n. 97, p. 302-310.

NICOLINI, J.V., 2013, *Biossensores baseados em nanotubos de titanato e peroxidase para detecção de peróxido de hidrogênio*, Dissertação MSc., UFRJ/COPPE, Rio de Janeiro, Brasil.

- NORDE, W., 2008, "My voyage of Discovery to proteins in Flatland ...and Beyond", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 61, n. 1, p. 1-9.
- OSTUNI, E., GRZYBOWSKI, B.A., MRKSICH, M., *et al.*, 2003, "Adsorption of Proteins to Hydrophobic Sites on Mixed Self-Assembled Monolayers", *Langmuir*, v. 19, n. 1, p. 1861-1872.
- PALANISAMY, S., UNNIKRISHNAN, B., CHEN, S.M., 2012, "An Amperometric Biosensor Based on Direct Immobilization of Horseradish Peroxidase on Electrochemically Reduced Graphene Oxide Modified Screen Printed Carbon Electrode", *Internacional Journal of Electrochemical Science*, v. 7, p. 7935 – 7947.
- PEREZ, E.F., 2000, *Desenvolvimento de um Biossensor Amperométrico para Oxalato*. Dissertação de M.Sc., Instituto de Química/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- PIZZARIELLO, A., STREDANSKY, M., STREDANSKA, S., MIERTUS, S., 2001, "Urea biosensor based on amperometric pH-sensing with hematein as a pH-sensitive redox mediator", *Talanta*, v. 54, p. 763–772.
- PRADA, A.G.V., PENA, N., MENA, M.L., REVIEJO, A.J., PINGARRON, J.M., 2003, "Graphite-teflon composite bienzyme amperometric biosensors for monitoring of alcohols", *Biosensors and Bioelectronics*, v.18, p. 1279-1288.
- QIN, W., ZHANG, Z., LI, B., LIU, S., 1998, "Chemiluminescence Fow-sensing System for Hydrogen Peroxide with Immobilized Reagents", *Analytica Chimica Acta*, v. 372, n. 3, p. 357-363.
- QIU, J., ZHANG S., ZHAO, H., 2011, "Recent applications of TiO₂ nanomaterials in chemical sensing in aqueous media", *Sensors and Actuators B*, v. 160, p. 875– 890.
- RADI, A.E., BERBEL, X.M., PUIG, M.C., *et al.*, 2009, "Novel Protocol for Covalent Immobilization of Horseradish Peroxidase on Gold Electrode Surface", *Electroanalysis*, v. 21, n. 6, p. 696-700.
- RAN, Q., PENG, R., LIANG, C., *et al.*, 2011, "Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase Immobilized on Electrografted 4-ethynylphenyl Film via Click Chemistry", *Analytica Chimica Acta*, v. 697, n. 1-2, p. 27-31.
- RASMUSSEN, L.D., SORENSEN, S.J., TURNER, R.R., BARKAY, T., 2000, "Application of a mer-lux biosensor for estimating bioavailable mercury in soil", *Soil Biology and Biochemistry*, v. 32, p. 639–646.
- RIVERA, A.R., ANTONIO, J.A.T, JACOME, M.A.C., CHAVEZ, C.A., 2011, "Generation of highly reactive OH groups at the surface of TiO₂ nanotubes", *Catalysis Today*, v. 166, p.18–24
- ROHM, I., GENRICH, M., COLLIER, W., BILITEWSKI, U., 1996, "Development of ultraviolet-polymerizable enzyme pastes: bioprocess applications of screen-printed L-lactate sensors", *Analyst*, v. 121, p. 877- 881.

RUZGAS, T.I., CSREGIB, E., EMNÉUS, J., *et al.*, 1996, “Peroxidase-Modified Electrodes: Fundamentals and Application”, *Analytica Chimica Acta*, v. 330, n. 2-3, p. 123-138.

SALGADO, A.M., 2001, Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo. Tese de D.Sc., Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

SASSOLAS, A., BLUM, L.J., BOUVIER, B.D.L., 2012, “Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors”, *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 3, p. 489-511.

SEZGINTURK, M. K., DINCKAYA, E., 2003, “A novel amperometric biosensor based on spinach (*Spinacia oleracea*) tissue homogenate for urinary oxalate determination”, *Talanta*, v. 59, p. 545–551.

SIGNORI, C.A., FATIBELLO-FILHO, O., 1994, “Biossensor amperométrico de fenóis usando extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*)”, *Química Nova*, v. 17, n. 1, p. 38.

SILVA, J.S., 2011, *Biossensor Amperométrico à Base de Peroxidase em Matriz de Bastão de Grafite Comercial: Estudos Preliminares*. Dissertação M.Sc., Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SILVERSTEIN, R.M., FRANCIS, X., WEBSTER, D.J., *et al.*, 2006, *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7 ed. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.

SIRVENT, M.A., MERKOCI, A., ALEGRET, S., 2000, “Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review”, *Sensors and Actuators B*, v. 69, p. 153–163.

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R., 2009, “Princípios de Análise Instrumental”, Ed. Bookman, 6ª Edição.

SOTOMAYOR, M.D.P.T., KUBOTA, L.T., 2001, “Enzymeless Biosensors: Uma Nova Área para o Desenvolvimento de Sensores”, *Química Nova*, v. 25, n.1, p. 123-128.

SOUZA, M. F. B., 1997, “Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem”, *Química Nova*, v. 20, p. 191-195.

SOVIC, D., GAJOVIC, A., IVEKOVIC, D., 2011, “Bioelectrocatalytic and Biosensing Properties of Horseradish Peroxidase Covalently Immobilized on (3-aminopropyl) trimethoxysilane-modified Titanate Nanotubes”, *Electrochimica Acta*, v. 56, n. 26, p. 9953–9960.

STEINER, N., GEC, R., 1992, “Plant experience using hydrogen peroxide for enhanced fat flotation and bod removal”, *Environmental Progress*, v. 11, p. 261-264.

SUN, X., ZHANG, Y., SHEN, H., JIA, N., 2010, "Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase based on halloysite nanotubes/chitosan nanocomposite film", *Electrochimica Acta*, v.56, p.700-705.

SWEILEH, J. A., 1996, "Study of equilibria in cyanide systems by gas-diffusion measurement of hydrogen cyanide" *Analytica Chimica Acta*, v. 336, p. 131-140.

TANG, H., YAN, F., TAI, Q., CHAN, H.L.W., 2010, "The improvement of glucose bioelectrocatalytic properties of platinum electrodes modified with electrospun TiO₂ nanofibers", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 25, p. 1646–1651.

TANGKUARAM, T., PONCHIO, C., KANGKASOMBOON, T., et al, 2007, "Design and development of a highly stable hydrogen peroxide biosensor on screen printed carbon electrode based on horseradish peroxidase bound with gold nanoparticles in the matrix of chitosan", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, p. 2071–2078.

TENG, Y.J., ZUO, S.H., LAN, M.B., 2009, "Direct electron transfer of Horseradish peroxidase on porous structure of screen-printed electrode", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, p.1353–1357.

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

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

TOWNSHEND, A., 1990, "Solution chemiluminescence - some recent analytical developments", *Analyst*, v. 115, p. 495-500.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2012. Disponível em: <http://www.transparencymarketresearch.com/biosensor-analytical-devices.html>. Acesso em dezembro de 2013.

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

TURKI, A., KOCHKAR, H., GUILLARD, C., BERHAULT, G., GHORBEL, A., 2013, "Effect of Na content and thermal treatment of titanate nanotubes on the photocatalytic degradation of formic acid", *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 138-139, p. 401-415.

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

VELDE, F., LOURENÇO, N.D., PINHEIRO, H.M., et al., 2002, "Carrageenan: A Food-Grade and Biocompatible Support for Immobilisation Techniques", *Advanced Synthesis and Catalysis*, v. 344, n. 8, p. 815-835.

VIEIRA, I.C., LUPETTI, K.O., FILHO, O.F., 2003, “Determinação de Paracetamol em Produtos Farmacêuticos usando um Biossensor de Pasta de Carbono Modificado com Extrato Bruto de Abobrinha (*Cucurbita pepo*)”, *Química Nova*, v. 26, n.1, p. 39-43.

VILLALONGA, R., DIEZ, P., YANEZ-SEDENO, P., PINGARRON, J.M., 2011, “Wiring horseradish peroxidase on gold nanoparticles-based nanostructured polymeric network for the construction of mediatorless hydrogen peroxide biosensor”, *Electrochimica Acta*, v. 56, p. 4672-4677.

VITICOLI, M., CURULLI, A., CUSMA A., KACIULIS, S., PADELETTI, G., PANDOLFI, L., VALENTINI, F., 2006, “Immobilization of GOD and HRP enzymes on nanostructured substrates”, *Surface and Interface Analysis*, v. 38, p. 478-481.

WAN, M.M., LIN, W.G., GAO, L., *et al.*, 2012, “Promoting Immobilization and Catalytic Activity of Horseradish Peroxidase on Mesoporous Silica through Template Micelles”, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 377, n. 1, p. 497-503.

WANEKAYA, A.K., CHEN, W., MYUNG, N.V., *et al.*, “Conducting Polymer Nanowire-Based Biosensors”. In: Marks, R., Cullen, D. C., Karube, I., Lowe, C. R., Weetall, H. H., *Handbook of Biosensors and Biochips*, chapter 51, New Delhi, Índia, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.

WANG, J., 2001, “Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges”, *Electroanalysis*, v. 13, n. 12, p. 983-988.

WANG, J., 2005, “Nanomaterial-based Electrochemical Biosensors”, *The Analyst*, v. 130, n. 4, p. 421-426.

WANG, J., MUSAMEH, M., 2005, “Carbon-nanotubes doped polypyrrole glucose biosensor”, *Analytical Chimica Acta*, v. 539, p. 209–213.

WANG, J., WANG, L., DI, J., TU, Y., 2009, “Electrodeposition of gold nanoparticles on indium/tin oxide electrode for fabrication of a disposable hydrogen peroxide biosensor”, *Talanta*, v.77, p. 1454–1459.

WANG, Q., KROMKA, A., HOUDKOVA, J., *et al.*, 2012, “Nanomolar Hydrogen Peroxide Detection using Horseradish Peroxidase Covalently Linked to Undoped Nanocrystalline Diamond Surfaces”, *Langmuir*, v. 28, n. 1, p. 587-592.

WANG, Y., HASEBE, Y., 2012, “Uricase-adsorbed Carbon-felt Reactor coupled with a Peroxidase-modified Carbon-felt-based H₂O₂ Detector for Highly Sensitive Amperometric flow determination of Uric Acid”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 57, p. 125-32.

WELCH, C.M., COMPTON, R.G., 2006, “The Use of Nanoparticles in Electroanalysis: A Review”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 384, n. 3, p. 601-619.

WELINDER, K.G., 1976, “Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase”, *FEBS Letters*, v. 72, p. 19–23.

- WELINDER, K.G., 1978, "Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase", *European Journal of Biochemistry*, v. 96, p. 483-502.
- WHITE, L., TRIPP, C., 2000, "Reaction of (3-Aminopropyl)dimethylethoxysilane with Amine Catalysts on Silica Surfaces", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 232, n. 2, p. 400-407.
- WILSON, M. S., Nie, W., 2006, "Electrochemical Multianalyte Immunoassays Using an Array-Based Sensor", *Analytical Chemistry*, v. 78, n. 8, p. 2507-2513.
- WRING, S. A., HART, J. P., 1992, "Chemically modified, screen-printed carbon electrodes", *Analyst*, v. 117, p. 1281-1286.
- WU, F., XU, J., TIAN, Y., *et al.*, 2008, "Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase on TiO₂ Nanotube Arrays via Seeded-growth Synthesis", *Biosensors & Bioelectronics*, v. 24, n. 2, p. 198-203.
- XIALING, C., LIN, M., 2009, "Horseradish Peroxidase Catalyzed Free Radical Cannot Free Move in Reaction Solution", *Journal of Biochemical Technology*, v. 1, n. 4, p. 92-95.
- XIAO, P., GARCIA, B.B., GUO, Q., *et al.*, 2007, "TiO₂ Nanotube Arrays Fabricated by Anodization in Different Electrolytes for Biosensing", *Electrochemistry Communications*, v. 9, n. 9, p. 2441-2447.
- XIN, Y., FU, X., HONG, L., 2013, "A novel H₂O₂ biosensor based on Fe₃O₄-Au magnetic nanoparticles coated horseradish peroxidase and graphene sheets-Nafion film modified screen-printed carbon electrode", *Electrochimica Acta*, v. 109, p. 750-755.
- XU, X., LIU, S., JU, H., 2004, "Disposable Biosensor Based on a Hemoglobin Colloidal Gold-Modified Screen-Printed Electrode for Determination of Hydrogen Peroxide", *IEEE Sensors Journal*, v. 4, p. 390-394.
- XUE, H., SUN, W., HE, B., SHEN, Z., 2003, "Single-wall carbon nanotubes as immobilization material for glucose biosensor", *Synthetic Metals*, v. 135, p. 831-832.
- YABUKI, S., MIZUTANI, F., HIRATA, Y., 2000, "Hydrogen peroxide determination based on a glassy carbon electrode covered with polyion complex membrane containing peroxidase and mediator", *Sensors and Actuators B*, v. 65, p. 49-51.
- YAO, T., YANO, T., NANJYO, Y., NISHINO, H., 2003, "Simultaneous determination of glucose and lactate in rat brain by an electrochemical in vivo flow-injection system with an on-line microdialysis sampling", *Analytical Sciences*, v. 19, p. 61-65.
- YIN, H.S., ZHOU, Y.L., MA, Q., *et al.*, "Electrochemical oxidation behavior of guanine and adenine on graphene-Nafion composite film modified glassy carbon electrode and the simultaneous determination", *Process Biochemistry*, v.45, p. 1707-1712.

- YOGESWARAN, U., CHEN, S.M., 2008, "A Review on the Electrochemical Sensors and Biosensors Composed of Nanowires as Sensing Material", *Sensors*, v. 8, n. 1, p. 290-313.
- YU, J., LIU, S., JU, H., 2003, "Mediator-free phenol sensor based on titania sol-gel encapsulation matrix for immobilization of tyrosinase by a vapor deposition method", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 19, p. 509-514.
- YU, L., ZHANG, X., 2004, "Hydrothermal synthesis and characterization of vanadium oxide/titanate composite nanorods", *Materials Chemistry and Physics*, v. 87, p. 168-172.
- YU, X., CHATTOPADHYAY, D., GALESKA, I., PAPADIMITRAKOPOULOS, F., RUSLING, J.F., 2003, "Peroxidase activity of enzymes bound to the ends of single-wall carbon nanotube forest electrodes", *Electrochemistry Communications*, v.5, p. 408-411.
- YUAN, J., SHILLER, A. M., 2000, "The variation of hydrogen peroxide in rainwater over the South and Central Atlantic Ocean", *Atmospheric Environment*, v. 34, p. 3973-3980.
- YUAN, Z.Y., SU, B.L., 2004, "Titanium oxide nanotubes, nanofibers and nanowires", *Colloids and Surfaces A*, v. 241, p. 273-283.
- ZAIA, D.A.M., ZAIA, C.T.B.V, LICHTIG, J., 1998, "Determinação de Proteínas Totais vis Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes", *Química Nova*, v. 21, n. 6, p. 787-793.
- ZANIN, G. M., 1989, *Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglucosidade imobilizada*. Tese de D. Sc., Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- ZHANG, Q., GAO, L., SUN, L., ZHENG, S., 2002, "Preparation of long TiO₂ nanotube from ultrafine rutile nanocrystals", *Chemical Letters*, p. 226.
- ZHANG, Y., HE, P., HU, N., 2004, "Horseradish Peroxidase Immobilized in TiO₂ Nanoparticle Films on Pyrolytic Graphite Electrodes: Direct Electrochemistry and Bioelectrocatalysis", *Electrochimica Acta*, v. 49, n. 12, p. 1981-1988.
- ZHANG, L., ZHANG, Q., LU, X., *et al.*, 2007, "Direct Electrochemistry and Electrocatalysis based on Film of Horseradish Peroxidase Intercalated into Layered Titanate Nano-Sheets", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 23, n. 1, p. 102-106.
- ZHANG, H., BANFIELD, J. F., 2000, "Understanding Polymorphic Phase Transformation Behavior during Growth of Nanocrystalline Aggregates Insights from TiO₂", *Journal Physical Chemistry B*, v. 104, p. 3481-3487.
- ZHAO, Y.D., ZHANG, W.D., CHEN, H., *et al.*, 2002, "Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase at Carbon Nanotube Powder Microelectrode", *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 87, n. 1, p. 168-172.