

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**



**UNICAMP**

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR  
AMPEROMÉTRICO PARA FENOL A BASE DE PEROXIDASE  
E SÍLICA MODIFICADA**

**Tese de Doutorado apresentada à Comissão de Pós-  
graduação do Instituto de Química como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.**

**Aluna: *Simone Soares Rosatto***

**Orientador: *Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota***

**Co-orientador: *Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto***

**Campinas-SP**

**Abril/2000**



*Aos meus pais Cidinha e José Carlos (in memoriam)*

*à Rosana, Zeca e Tamara.*

*dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de chegar até mais esta etapa.

Ao Prof. Lauro pela orientação desta tese, transmitindo não apenas seus conhecimentos, mas também sua dedicação e motivação para com o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof. Graciliano pela co-orientação e dicas importantes.

Ao Instituto de Química-Unicamp, que como um todo me recebeu muito bem.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Química pela disposição em colaborar e receber bem.

Aos funcionários da vidraria, Cláudio, Fontana e Marcos, que muito me ajudaram na confecção de eletrodos e celas para a realização dos experimentos.

Aos funcionários das oficinas que realizaram serviços de natureza diversa para a execução deste trabalho.

Aos funcionários da CPG pela atenção e colaboração.

Aos funcionários do Setor de xerox.

Aos colegas de grupo: Arnaldo, Beth, Eric, Karin, Jequié, Júlio, Laércio, Miyuki Percy, Tânia e Zana.

Aos demais companheiros de laboratório: Ane, Bete, Nidi, Jack, Paulo, Paulo Augusto, Marcelo e Eduardo.

As amigas Bete e Beth pela força no momento preciso e pela companhia nos almoços.

As amigas de república: Miyuki, Célia e Maria.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Obrigado!

## RESUMO

**Título:** “*Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e sílica modificada*”

**Autora:** Simone Soares Rosatto

**Orientador:** Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

**Co-orientador:** Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto

**Palavras chave:** horseradish peroxidase, sílica-titânio, eletrodo de pasta de carbono, determinação de fenol.

Esta tese refere-se à imobilização de peroxidase sobre sílica gel modificada com óxido de titânio e seu uso no desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol, a base de pasta de carbono. A transferência de elétrons direta entre a enzima e o eletrodo, durante a redução de peróxido de hidrogênio pela peroxidase, foi bloqueada quando esta foi imobilizada sobre sílica-titânio, obtendo-se um biossensor com melhores características em termos de sensibilidade, seletividade e intervalo operacional para a detecção de fenol. Este biossensor apresentou uma resposta bastante sensível para fenol em um potencial aplicado de 0 V vs ECS. As melhores condições foram conseguidas em tampão fosfato pH 6,8 e uma razão  $[H_2O_2]/[fenol]$  maior que 0,35. Nessas condições, o biossensor mostrou um intervalo de resposta linear entre 10 e 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de fenol ajustado pela equação  $j = -32,8(\pm 0,5) + 16,3(\pm 0,2) [fenol]$ , para  $n = 5$ , com um coeficiente de correlação de 0,9995. O tempo de resposta do biossensor foi cerca de 1,5 s. A sensibilidade do biossensor variou para diferentes compostos fenólicos, apresentando maior resposta para 2-amino-4-clorofenol e catecol. A estabilidade do biossensor foi baixa, porém, com a adição de DNA juntamente com a enzima peroxidase na etapa de imobilização sobre a sílica-titânio, tanto a estabilidade da pasta de carbono modificada com este material, estocada em geladeira, como a estabilidade operacional do biossensor e sensibilidade aumentaram consideravelmente, permitindo o uso do biossensor por um mês.

## ABSTRACT

**Title:** *“Development of an amperometric biosensor for phenol based on peroxidase and modified silica”*

**Author:** Simone Soares Rosatto

**Supervisor:** Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

**Co-supervisor:** Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto

**Key words:** horseradish peroxidase, silica-titanium, carbon paste electrode, determination of phenol

The development of an amperometric biosensor for phenol based on modified carbon paste electrode is ascribed. The peroxidase was immobilized on silica coated with titanium oxide and this material was employed to modify the carbon paste. The direct electron transfer between enzyme and electrode, during the hydrogen peroxide reduction by peroxidase, was blocked when the enzyme was immobilized on silica titanium. This property allowed the obtention of a biosensor with better sensitivity, selectivity and wider operational range for phenol, at an applied potential of 0 V vs SCE. The best conditions were obtained with phosphate buffer pH=6,8 and a ratio  $[H_2O_2]/[phenol]$  higher than 0.35. In this condition, the biosensor showed a linear response range of 10 up to 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of phenol, fit by the equation  $j = -32.8(\pm 0.5) + 16.3(\pm 0.2) [phenol]$ , for  $n=5$  with a correlation coefficient of 0.9995. The response time of the biosensor was about 1.5 s. The sensibility of the biosensor changed for different phenolics compounds, presenting higher response for 2-amino-4-chlorophenol and catechol. The stability of the biosensor was not good, but after DNA addition during the enzyme immobilization step, the stability as well as sensitivity improved drastically, allowing the use of the biosensor for a month.

# CURRICULUM VITAE

## 1. DADOS PESSOAIS

Nome: *Simone Soares Rosatto*

Filiação: José Carlos Rosatto e Maria Aparecida Soares Rosatto

Nacionalidade: Brasileira

Estado civil: Solteira

Nascimento: 29 de julho de 1971

Naturalidade: Itapira-São Paulo

Identidade: RG 19 768 740

CPF: 137479688 30

Título de Eleitor: 1787464501-24

## 2. FORMAÇÃO

2.1. Primeiro Grau -EEPG "Antonio Caio", concluído em 1985, Itapira-SP.

2.2. Segundo Grau -EEPSG "D. Elvira Santos de Oliveira", concluído em 1988, Itapira-SP.

2.3. Bacharel em Química - Curso de Química concluído em 1992, no Instituto de Química da Unesp, Araraquara-SP.

2.4. Licenciatura em Química - Curso de Licenciatura em Ciências com Habilitação em Química concluído em 1993, no Instituto de Química da Unesp, Araraquara-SP.

2.5. Mestre em Química - Curso de Pós-Graduação a nível de Mestrado (Área de concentração: Físico-Química) concluído em 24/08/1995, no Instituto de Química da Unesp, Campus de Araraquara, Araraquara-SP.

Título: "Ligas de Cu-Al-Ag: Preparação, Caracterização e Estudo Eletroquímico em Ácido Sulfúrico 0,5 M".

Orientador: Prof. Dr. Assis Vicente Benedetti.

Órgão financiador: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

## 3. TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS OU SUBMETIDOS

### 3.1. Publicações em revistas internacionais

1. Rocha, R.F., Rosatto, S.S., Bruns, R.E., Kubota, L.T.; "Factorial design optimization of redox properties of methylene blue adsorbed on a modified silica gel surface", *J. Electroanal. Chem.* 433 (1997) 73-76.

2. Rosatto, S.S. Kubota, L.T., Oliveira Neto, G.; "Biosensor for phenol based on the direct electron transfer blocking of peroxidase immobilising on silica-titanium", *Anal. Chim. Acta* 390 (1999) 65-72.

### 3.2. Trabalhos submetidos para publicação

1. Rosatto, S.S., Freire, R.S., Durán, N., Kubota, L.T.; "Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental", submetido para publicação na revista *Quim. Nova*.
2. Rosatto, S. S., Cabot, P. L., Sumodjo, P. T. A., Benedetti, A.V.; "Electrochemical studies of copper-aluminum-silver alloys in 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>", submetido para publicação na revista *Electrochim. Acta*.
3. Rosatto, S.S., Oliveira Neto, G., Kubota, L.T.; "Effect of DNA on the Peroxidase Based Biosensor for Phenol Determination in Waste Waters", submetido para publicação na revista *Electroanalysis*.

### 3.3. Patente requerida

Rosatto, S.S., Kubota, L.T., Oliveira Neto, G.; "Biossensor para fenol baseado no bloqueio da transferência de elétrons direta da peroxidase imobilizada sobre sílica titânio". PI0000761-7, data de depósito INPI: 22/02/00

## 4. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

- 1- Rosatto, S.S., Benedetti, A.V.; "Potencial de circuito aberto de uma liga Cu-Al-Ag em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M". IV Congresso de Iniciação Científica da Unesp, Araçatuba-SP, 1992.
- 2- Rosatto, S.S., Adorno, A.T., Beatrice, C.R.S., Sumodjo, P.T.A., Benedetti, A.V.; "Influência do Tratamento Térmico na microestrutura e no comportamento eletroquímico de uma liga Cu-Al-Ag (50% Ag – 40% Cu – 10% Al)". Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Águas de Lindóia-SP, 1992.
- 3- Rosatto, S.S., Sumodjo, P.T.A., Benedetti, A.V.; "Comportamento eletroquímico de uma liga Cu-10%Al-5%Ag em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M". 18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Caxambu-MG, 1995.
- 4- Rosatto, S.S., Sumodjo, P.T.A., Benedetti, A.V.; "Cu-Al-Ag Alloys: Preparation, Characterization and Electrochemical Studies in 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>". XII Congresso Iberoamericano de Eletroquímica, Merida, Venezuela, 1996.

- 5- Rocha, R.F., Rosatto, S.S., Bruns, R.E., Kubota, L.T.; "Planejamento fatorial para a otimização do processo redox do azul de metileno adsorvido sobre a superfície de sílica gel modificada". X Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, São Carlos, 1996.
- 6- Almeida, E., Rosatto, S.S., Kubota, L.T.; "Adsorção e estudo eletroquímico de alizarina sobre superfície de sílica gel modificada com titânio". X Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, São Carlos, 1996.
- 7- Rosatto, S.S., Kubota, L.T., Oliveira Neto, G.; "Biossensor para fenóis a base de peroxidase (HRP) imobilizada sobre sílica modificada". 20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas-MG, 1997.
- 8- Rosatto, S.S., Kubota, L.T., Oliveira Neto, G.; "Biossensor amperométrico para fenol baseado no bloqueio da transferência de elétrons direta da peroxidase pela imobilização em sílica-titânio". 21ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas-MG, 1998.
- 9- Rosatto, S.S., Kubota, L.T., Oliveira Neto, G.; "Influência dos aditivos BSA, PEI e DNA sobre o desempenho do biossensor para fenol a base de ST-HRP". XI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Maragogi, Alagoas, 1999.

  
**Simone Soares Rosatto**



# ÍNDICE

GLOSSÁRIO	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	v
<b><u>CAPÍTULO I</u></b>	
I. INTRODUÇÃO GERAL	1
<b><u>CAPÍTULO II</u></b>	
II. BIOSSENSORES	4
II.1. Enzimas	7
II.2. Imobilização de enzimas	8
II.2.1. Microencapsulação	9
II.2.2. Adsorção	10
II.2.3. Oclusão em gel ou filmes poliméricos	10
II.2.4. Ligação covalente cruzada	11
II.2.5. Ligação covalente	12
<b><u>CAPÍTULO III</u></b>	
III. BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS	15
III.1. Materiais eletródicos utilizados na construção de biossensores amperométricos	18
III.1.1. Eletrodos de pasta de carbono	18
III.1.2. Eletrodos de pasta de carbono modificados com sílica	19
<b><u>CAPÍTULO IV</u></b>	
IV. BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA FENÓIS	23
IV.1. Biossensores a base de peroxidase	27
IV.1.1. Peroxidases	27
IV.1.2. Ciclo catalítico das peroxidases	29
IV.1.3. Peroxidase imobilizada em eletrodos	31
IV.1.3.1. Transferência de elétrons direta	32
IV.1.3.2. Transferência de elétrons mediada	34
IV.1.3.4. Princípio da detecção de fenóis e biossensores desenvolvidos	35

## CAPÍTULO V

V. OBJETIVOS	38
--------------	----

## CAPÍTULO VI

VI. PARTE EXPERIMENTAL	39
VI.1. Reagentes	39
VI.2. Preparação da Sílica-Titânio	40
VI.3. Imobilização da enzima	41
VI.4. Preparação do eletrodo de pasta de carbono	42
VI.5. Célula eletroquímica e instrumentação	43
VI.6. Procedimento experimental para otimização do desempenho do biossensor para a determinação de fenol	44
VI.7. Resposta para diferentes substratos fenólicos	46
VI.8. Efeito de aditivos na pasta	47
VI.9. Aplicação em amostras reais	47

## CAPÍTULO VII

VII. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
VII.1. Característica do material	49
VII. 2. Mecanismo de transferência de elétrons da HRP na superfície ST	51
VII.3. Otimização da resposta do biossensor para fenol	53
<i>VII.3.1. Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio</i>	53
<i>VII.3.2. Efeito do pH da solução tampão</i>	55
<i>VII.3.3. Influência da solução tampão</i>	56
<i>VII.3.4. Efeito do potencial aplicado</i>	57
<i>VII.3.5. Quantidade de enzima na pasta</i>	58
<i>VII.3.6. Curva analítica para fenol</i>	59
<i>VII.3.7. Tempo de resposta</i>	61
<i>VII.3.8. Efeito de diferentes substratos fenólicos</i>	62
<i>VII.3.9. Efeito de aditivos na sensibilidade e estabilidade do biossensor</i>	65
<i>VII.3.10. Estabilidade da pasta e do biossensor contendo o aditivo DNA</i>	69
<i>VII.3.11. Aplicação do biossensor em análise de amostra real</i>	72

<u>CAPÍTULO VIII</u>	
VIII. CONCLUSÕES	75
<u>CAPÍTULO IX</u>	
IX. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	77
<u>CAPÍTULO X</u>	
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

## GLOSSÁRIO

- AH<sup>•</sup> - espécies radicalares
- AH<sub>2</sub> – doadores de elétrons/prótons
- BSA – (bovine serum albumine) albumina de soro bovino
- CF – composto fenólico
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- E – potencial (V)
- E<sup>o</sup> - potencial formal (V)
- E<sub>apl</sub> – potencial aplicado
- ECS – eletrodo de calomelano saturado
- E<sub>ox</sub> – enzima na forma oxidada
- EQM – eletrodo quimicamente modificado
- E<sub>red</sub> – enzima na forma reduzida
- FIA – análise por injeção em fluxo
- HRP - horseradish peroxidase
- I – corrente (A)
- I<sub>f</sub> – corrente de fundo ou corrente capacitiva
- j – densidade de corrente ( A cm<sup>-2</sup>)
- M<sub>ox</sub> – mediador na forma oxidada
- M<sub>red</sub> – mediador na forma reduzida
- PEI - polietilenoimina
- PIPES – ácido 1,4-piperazina-dietano sulfônico
- ST – sílica-titânio
- TED – transferência de elétrons direta
- Tris – Tris-hidroximetil-aminometano
- v - velocidade de varredura de potencial
- ε - absorvidade molar
- Δj - densidade de corrente descontado o valor do branco

## LISTA DE FIGURAS

- Figura II.1.** Ligação cruzada envolvendo a reação entre glutaraldeído e os grupos amina residuais livres de enzimas. 12
- Figura II.2.** Reação via carbodiimida usada para formação de ligação covalente entre a enzima e o suporte. 13
- Figura III.1.** Representação esquemática do mecanismo de resposta para as três gerações de biossensores amperométricos. 17
- Figura III.2.** Número de publicações por ano baseadas em eletrodos modificados com sílica. 20
- Figura IV.1.** Intervalo de potencial ótimo para a operação de biossensores amperométricos.  $E^0$  hidroquinona,  $E^0$  fenol e  $E^0$  4-clorofenol são os potenciais formais dos pares redox hidroquinona/quinona, fenol/radical fenoxi e 4-clorofenol/4-clorofenoxi, respectivamente. Eletrodo de grafite e meio aquoso. 23
- Figura IV.2.** Mecanismo das reações nos eletrodos modificados pelas enzimas para a determinação de compostos fenólicos.  $E_{red}$  e  $E_{ox}$  são as formas reduzida e oxidada, respectivamente das enzimas; CF = composto fenólico. 24
- Figura IV.3.** Estrutura da molécula protoporfirina que é o sítio ativo de muitas peroxidases. 27
- Figura IV.4.** Mecanismo proposto para a redução de HRP-I para HRP-II por um fenol [92]. B representa His 42. 30
- Figura IV.5.** Mecanismo proposto para a redução de HRP-II para HRP nativa por um fenol [92]. B representa His 42. 30
- Figura IV.6.** Mecanismo da transferência de elétrons direta entre HRP e o eletrodo a base de grafite.  $P^+$  é um cátion radical porfirínico. 33
- Figura VI.1.** Fluxograma do procedimento seguido para a reação de modificação da superfície da sílica gel. 41
- Figura VI.2.** Esquema do eletrodo de pasta de carbono modificado com ST-HRP. 42

- Figura VI.3.** (A) Fotografia da célula eletroquímica utilizada para realizar os experimentos. (B) Esquema da célula cuja tampa contém os orifícios para entrada (1) e saída (2) de gás e para adaptação do eletrodo de referência, ECS (3), do eletrodo de trabalho: biossensor (4), eletrodo auxiliar, espiral de Pt (5) e injeção do substrato (6). 43
- Figura VI.4.** Exemplo de um cronoamperograma e como foram calculadas as respostas do biossensor. 46
- Figura VII.1.** Voltamogramas de varredura linear obtidos para o eletrodo de pasta de carbono ST-HRP (1) em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,8, (2) na presença de  $35 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio, (3)  $35 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio e  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de fenol.  $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$ . 52
- Figura VII.2.** Mecanismo da transferência de elétrons mediada no eletrodo de pasta de carbono ST-HRP.  $M_{\text{ox}}$  e  $M_{\text{red}}$  são as formas oxidada e reduzida do mediador, respectivamente. 53
- Figura VII.3.** Influência da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre a resposta do biossensor para fenol, obtida em solução tampão fosfato pH 6,8 contendo  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de fenol.  $E_{\text{apl}} = 0 \text{ mV vs ECS}$ . 54
- Figura VII.4.** Dependência da resposta do biossensor obtida em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,8 na presença de diferentes razões entre peróxido de hidrogênio e fenol, com  $E_{\text{apl}} = 0 \text{ mV vs ECS}$ . 55
- Figura VII.5.** Dependência da resposta do biossensor para fenol em função do pH da solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .  $E_{\text{apl}} = 0 \text{ mV vs ECS}$  e  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . 56
- Figura VII.6.** Efeito da quantidade de enzima HRP na resposta do biossensor para fenol.  $E_{\text{apl}} = 0 \text{ mV vs ECS}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{fenol} = 0,7$ . 59
- Figura VII.7.** Curva analítica obtida para fenol usando o biossensor desenvolvido aplicando um potencial de  $0 \text{ mV vs ECS}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,8 com uma concentração fixa de peróxido de  $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . 60
- Figura VII.8.** Tempo de resposta obtido para o biossensor em um potencial aplicado de  $0 \text{ mV vs ECS}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $[\text{fenol}] = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . 61

- Figura VII.9.** Resposta relativa obtida para  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de diferentes substratos em um potencial aplicado de  $0 \text{ mV vs ECS}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{fenol} = 0,5$ . 62
- Figura VII.10.** Imobilização de enzima e albumina de soro bovino via glutaraldeído. 66
- Figura VII.11.** Curvas analíticas para fenol obtidas com os eletrodos de pasta de carbono ST-HRP sem e com aditivos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,8,  $E_{\text{apl}} = 0 \text{ mV vs ECS}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{fenol} = 0,5$ . 67
- Figura VII.12.** Comparação da estabilidade dos biossensores preparados sem e com aditivos. Resposta obtida para  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de fenol, nas mesmas condições mencionadas na Figura VII.11. 68
- Figura VII.13.** Curvas analíticas para fenol obtidas em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,8,  $E_{\text{apl}} = 0 \text{ mV vs ECS}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{fenol} = 0,5$ . 1A-biossensor contendo DNA no dia da preparação da pasta e 1B- após 30 dias. 2A- biossensor sem aditivo no dia da preparação da pasta e 2B- no dia seguinte de preparação da pasta. 69
- Figura VII.14.** Estabilidade do biossensor preparado com pasta de carbono modificada com HRP e DNA imobilizados na superfície da sílica-titânio. Resposta relativa para  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de fenol obtida por cronoamperometria em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com um  $E_{\text{apl}}$  de  $0 \text{ mV vs ECS}$ .  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{fenol}=0,5$ . 71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela II.1.</b> Componentes que podem ser usados para construir um biossensor.	<b>5</b>
<b>Tabela II.2.</b> Características desejáveis para um biossensor e os fatores que as afetam.	<b>14</b>
<b>Tabela IV.1.</b> Respostas relativa dos eletrodos modificados com diferentes enzimas para compostos fenólicos.	<b>26</b>
<b>Tabela IV.2.</b> Massas moleculares e grupo prostético de diferentes peroxidases.	<b>28</b>
<b>Tabela VII.1.</b> Efeito da solução tampão sobre a resposta do biossensor obtido em um potencial aplicado de 0 mV vs ECS e concentração de fenol e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A concentração da solução tampão foi 0,1 mol $\text{L}^{-1}$ e pH 6,8, contendo 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{H}_2\text{O}_2$ .	<b>57</b>
<b>Tabela VII.2.</b> Influência do potencial aplicado sobre a resposta do biossensor obtida em solução tampão fosfato, pH 6,8, com 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{H}_2\text{O}_2$ e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fenol.	<b>58</b>
<b>Tabela VII.3.</b> Sensibilidade do biossensor para fenol em função da Quantidade de enzima. $E_{\text{apl}} = 0 \text{ mV vs ECS}$ , $\text{H}_2\text{O}_2/\text{fenol} = 0,7$ .	<b>59</b>
<b>Tabela VII.4.</b> Comparação da resposta relativa para diferentes compostos fenólicos obtidas com eletrodos modificados com HRP.	<b>64</b>
<b>Tabela VII.5.</b> Determinação de fenol em amostras reais de influentes industriais.	<b>73</b>
<b>Tabela VII.6.</b> Resultados das análises de fenol em amostras de águas de rios da região de Cubatão obtidas com o biossensor amperométrico ST-HRP-DNA e porcentagens de recuperação das respostas do biossensor após adição de amostras de águas de rios da região de Cubatão.	<b>74</b>



***INTRODUÇÃO  
GERAL***

УРАНИЙ

## I. INTRODUÇÃO GERAL

A determinação de fenóis é de importância ambiental, uma vez que um número considerável de poluentes orgânicos, que se encontram largamente distribuídos no meio ambiente, possuem estrutura fenólica [1]. Fenóis e seus derivados, como clorofenóis e compostos aromáticos relacionados, são conhecidos devido a sua elevada toxicidade e por serem compostos comuns em efluentes industriais, oriundos das atividades de produção de plásticos, corantes, tintas, drogas, antioxidantes, polímeros sintéticos, resinas, pesticidas, detergentes, desinfetantes, refinaria de óleo e principalmente de papel e celulose [1-5].

Compostos fenólicos também estão largamente presentes na natureza como componentes naturais da madeira (lignina e tanino) e são responsáveis pelas propriedades organolépticas e cores de muitas frutas e flores [6]. Assim, a qualidade dos alimentos pode estar relacionada à presença de substâncias fenólicas em sua composição, principalmente em bebidas alcoólicas e sucos.

Vários fenóis substituídos, como cloro e nitrofenóis, são altamente tóxicos para o homem e organismos aquáticos [3, 5-7]. Estes dois grupos de fenóis substituídos, são os principais produtos de degradação de pesticidas organofosforados e fenoxi-ácidos clorados [1, 2]. Mesmo em pequenas concentrações (<1 ppm), os compostos fenólicos afetam o gosto e o odor de águas potáveis e peixes [5]. Muitos destes compostos possuem efeitos tóxicos em animais e plantas, pois penetram facilmente pela pele e membranas celulares, determinando um amplo espectro de genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos hepato-tóxicos, além de afetarem as velocidades das reações biocatalisadas nos processos de respiração e fotossíntese [3, 5]. Assim, fenóis e especialmente seus derivados clorados, nitrados e alquilados, devido a suas altas toxicidade e persistência no ambiente, estão presentes na lista de substâncias perigosas e poluentes prioritários da EC (Comissão Européia) [8] e da EPA (Agência de Proteção Ambiental Norte Americana) [2]. A diretiva (80/778 EEC) [1, 9] da Comunidade Económica Européia, por exemplo, determinou como concentração máxima permitida,

para todos os tipos de fenóis em meio aquoso, o valor de  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  para fenóis individuais. O Instituto Nacional Norte-Americano para Saúde e Segurança Ocupacional estabeleceu como limite de exposição, a concentração de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  para fenol e  $2,3 \mu\text{g L}^{-1}$  para isômeros de cresol. Assim, o desenvolvimento de procedimentos para a detecção e determinação simultânea destas espécies químicas em diferentes matrizes é de grande interesse [9].

Até o presente momento, análises tanto de fenol como de espécies fenólicas têm sido realizadas, principalmente, por meio de métodos espectrofotométricos e cromatográficos (cromatografia gasosa com ionização em chama ou acoplada com espectrometria de massa; ou ainda, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência) [10-12]. Entretanto, estas técnicas não permitem, facilmente, um monitoramento contínuo “*on site*”, pois são caras, lentas, necessitam de operadores bem treinados, e em alguns casos, requerem etapas de extração ou pré-concentração, que aumentam o risco de perda de amostra [2, 13].

A necessidade de sistemas de detecção mais versáteis para o monitoramento ambiental tem estimulado a produção de uma grande variedade de métodos analíticos. Os biossensores revelam grandes perspectivas quanto a sua utilização no monitoramento “*on-line*” de efluentes (e outras matrizes de interesse ambiental), possibilitando uma rápida adaptação nos processos de tratamento. A incorporação de moléculas com atividade biológica em metodologias analíticas tem aumentado sensivelmente nos últimos anos, obtendo sucesso nos mais variados procedimentos analíticos, inclusive nos que visam a área de controle ambiental [5, 10-15].

Os biossensores representam uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas existentes, devido às suas características únicas, tais como: seletividade, baixo custo relativo de construção e estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para uma rápida análise de monitoramento no campo “*on site*”. Entretanto, é necessário enfatizar que estas ferramentas não podem e não devem ser vistas como uma substituição das técnicas

analíticas clássicas, mas sim como um complemento a estas, pois alguns biossensores ainda podem apresentar problemas de estabilidade [1].

O Laboratório de Eletroquímica e Eletroanalítica para o Desenvolvimento de Sensores (LEEDS) tem em uma de suas linhas de atuação, a pesquisa de novos materiais para a construção de sensores e biossensores buscando melhorar a performance destes dispositivos para a detecção de substâncias de interesse clínico e ambiental. Dentre os materiais em estudo, o uso de sílica quimicamente modificada, em uma interface eletrodo-solução, tem atraído muita atenção, pois explora a versatilidade da sílica gel na imobilização de filmes de óxido, espécies eletroativas e enzimas. Além disto, tem sido reconhecido recentemente que materiais inorgânicos tais como carbono, sílica e ouro coloidal, oferecem grande perspectivas como matrizes suportes para enzimas, permitindo controlar ou manter sua atividade em microambientes fornecidos pela matriz de imobilização [16].

Esta tese descreve o desenvolvimento de um biossensor a base de horseradish peroxidase e sílica modificada para a detecção de fenol. Para facilitar o entendimento do leitor esse trabalho foi dividido em capítulos de forma que os capítulos II ao IV apresentam alguns fundamentos básicos sobre biossensores, principalmente sobre os amperométricos, no que diz respeito ao componente biológico, material de eletrodo e construção dos biossensores. Apresenta-se também o princípio de operação dos biossensores amperométricos para fenóis e em seguida descreve-se sobre biossensores a base de peroxidase, principalmente sobre aqueles desenvolvidos para a detecção de fenóis. No capítulo V encontram-se os objetivos deste trabalho. Em seguida, o capítulo VI descreve a parte experimental e no capítulo VII encontram-se os resultados e discussões. Os capítulos VIII e IX apresentam as principais conclusões, e as propostas para trabalhos futuros. Finalmente no capítulo X, apresentam-se as referências bibliográficas citadas no decorrer desta tese.

***BIOSENSORES***

И О Г С - И П Д А С

## II. BIOSSENSORES

A ciência dos biossensores é uma área multidisciplinar para a qual não existe uma forma de delimitação. A rápida proliferação dos biossensores e sua diversidade podem justificar as várias formas de definição de um biossensor que se encontram na literatura.

Biossensores podem ser considerados um subgrupo dos sensores químicos e estes apresentam definição e classificação estabelecidas [17], por isso, de alguma forma, muitas das definições de biossensor propostas estão relacionadas com a de um sensor químico. Um sensor químico é um dispositivo que transforma a informação química, oriunda de uma reação química ou de uma propriedade química do sistema investigado, em um sinal analítico útil. Este dispositivo contém duas unidades funcionais básicas: um receptor e um transdutor. No receptor de um sensor, ocorre um evento físico-químico que produz uma energia que é transformada pelo transdutor em uma forma de energia mensurável. Assim um transdutor é um dispositivo capaz de transformar a energia contendo a informação química da amostra em um sinal analítico útil. O receptor de um sensor químico pode ser baseado em três princípios: físico, químico e bioquímico. Os sensores químicos cujo receptor é um componente biológico ativo, o que significa que um processo bioquímico é a fonte do sinal analítico, são chamados de *biossensores* [17].

Uma característica dos biossensores que os diferencia dos sensores químicos é a especificidade da análise. As divisões de Química Analítica e Físico-Química da IUPAC propuseram uma definição para biossensor que apesar de não ser ainda definitiva, é bastante representativa: “Um biossensor é um dispositivo que é capaz de fornecer informação analítica “específica”, quantitativa ou semi-quantitativa usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) o qual está em contato espacial direto com um elemento de transdução” [18]. Então, da mesma forma que um sensor químico, um biossensor é formado de duas partes: o componente biológico e o transdutor. O componente biológico faz o reconhecimento da substância

procurada por meio de uma reação química gerando um sinal que pode resultar de uma variação na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança de estado de oxidação, etc. O transdutor converte este sinal em uma resposta mensurável tais como: corrente, potencial, variação de temperatura, etc. [19] Os diferentes componentes que podem ser usados para construir biossensores são mostrados na Tabela II.1. Em princípio, qualquer componente biológico pode ser combinado com algum transdutor adequado para produzir um biossensor operacional.

**Tabela II.1.** Componentes que podem ser usados para construir um biossensor [20].

Elementos biológicos	Transdutores
Organismos	Potenciométrico
Tecidos	Amperométrico
Células	Conduutométrico
Organela	Impedimétrico
Membranas	Óptico
Enzimas	Calorimétrico
Componentes de enzimas	Acústico
Receptores	Mecânico
Anticorpos	Molecular eletrônico
Ácidos nucleicos	
Moléculas orgânicas	

Dessa forma, devido ao recente avanço nas áreas de microeletrônica, biotecnologia, fibras óticas, etc., a definição de um biossensor evoluiu do conceito clássico de um eletrodo associado a uma enzima para uma variedade de métodos analíticos e dispositivos baseados em biocatálise ou bioafinidade [14].

Geralmente, biossensores podem ser classificados [18] conforme a natureza do transdutor físico: potenciométrico, amperométrico, calorimétrico, piezoelétrico ou ótico. Podem também ser classificados de acordo com o mecanismo conferindo a

especificidade biológica, ou ainda em relação às espécies ou reações que eles monitoram.

Entretanto, até recentemente, biossensores têm sido chamados de eletrodos enzimáticos quando uma enzima é o componente biológico e a transdução é baseada em princípios eletroquímicos [4]. Nesse caso, biossensor é um tipo de eletrodo quimicamente modificado, EQM, em que um processo de reconhecimento bioquímico está acoplado a um transdutor eletroquímico adequado. A superfície do eletrodo é modificada com um biocomponente que funciona como um receptor bioquímico [21]. Os EQMs compreendem uma aproximação relativamente moderna para sistemas de eletrodos que encontram utilidade em diversas áreas da eletroquímica, dentre estas o desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos e sistemas para aplicação em sensores químicos.

Em um biossensor baseado em detecção eletroquímica, a especificidade de uma enzima pode ser combinada ao baixo custo, à alta sensibilidade e, se apropriadamente planejado, à seletividade de um detector eletroquímico. Dentre os três tipos de biossensores eletroquímicos, os condutométricos são usualmente não específicos e tem uma pobre razão sinal/ruído [22], por isso os princípios potenciométrico e principalmente o amperométrico têm sido os mais utilizados. O sensor amperométrico é mais rápido, mais sensível e preciso que o potenciométrico, pois não é necessário esperar que o equilíbrio termodinâmico seja obtido e a resposta é linear em uma faixa relativamente ampla de concentração do analito.

A seletividade, habilidade para discriminar um entre diferentes substratos, que é uma das características mais importantes de um biossensor, é uma função principalmente do componente biológico, embora algumas vezes o transdutor também contribua para a seletividade [23]. Por isso, enzimas foram e continuam sendo o elemento biológico mais usado na construção de biossensores.



## II.1. Enzimas

Enzimas são, em sua maioria [24], proteínas de elevado peso molecular, com propriedades catalíticas específicas, presentes em todos os seres vivos. Elas consistem em uma estrutura tridimensional complexa de uma ou várias cadeias polipeptídicas. Muitas enzimas também contêm constituintes não-peptídicos, como por exemplo, uma considerável quantidade de resíduos de carboidratos. Como outros catalisadores elas aceleram as reações promovendo o alcance do equilíbrio sem alterá-las, através da diminuição da energia de ativação. Além da sua função catalítica, enzimas são caracterizadas por sua alta especificidade. Elas catalisam uma certa espécie de reação química com um único reagente ou um número de reagentes estruturalmente similares, sendo que esses reagentes são chamados substratos. Dessa forma, a razão principal para o amplo uso de enzimas em biossensores envolvem sua “especificidade” e propriedades catalíticas. As reações catalisadas por enzimas podem ser usadas para a determinação de substratos, ativadores, inibidores, e também da própria enzima [25].

A classificação de enzimas [25] envolve uma divisão em seis grupos principais de acordo com o tipo de reações que elas catalisam: 1-óxido-redutases, 2-transferases, 3-hidrolases, 4-liases, 5-isomerases, 6- ligases. Dentro de uma classe, por exemplo, as óxido-redutases, são subdivididas conforme o grupo prostético: flavina, quinona, heme ou cobre.

A classe de enzimas óxido-redutases é muito interessante e utilizada para a construção de biossensores amperométricos, pois elas catalisam uma reação química redox, envolvendo uma etapa de transferência de elétrons no ciclo natural da enzima. Os três grupos de óxido-redutases mais usados em configurações de biossensores são as oxidases, desidrogenases e peroxidases. As enzimas redox requerem a presença de um composto não peptídico chamado cofator para a atividade catalítica. O cofator pode ser uma molécula orgânica (coenzima) ou um íon metálico. O cofator pode ser/estar ligado à enzima (grupo prostético) ou pode ser adicionado ao sistema (NADH).

Um dos obstáculos que se encontra na construção de biossensores amperométricos é como otimizar a reação de transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo. Muitos estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de obter uma transferência de elétrons direta e eficiente entre o cofator da enzima redox e o eletrodo em um baixo sobrepotencial [26-29], mas muitas vezes esta transferência é impedida por barreiras cinéticas ou estéricas [30].

## II.2. Imobilização de enzimas

Uma etapa crítica na construção de um biossensor é a imobilização do componente biológico. O objetivo é conseguir um contato íntimo entre a enzima e o eletrodo, mantendo sua atividade, além de livre difusão de substratos e produtos para dentro e para fora da camada biocatalítica. As características atrativas de enzimas imobilizadas de um ponto de vista analítico são: a possibilidade de reutilização com diminuição no custo por análise, e potencialmente maior estabilidade e menor interferência de compostos indesejáveis [25]. Entretanto, o material suporte pode ter um efeito crítico sobre a estabilidade e a eficiência da imobilização da enzima. Os materiais suporte devem ser insolúveis em água, ter uma alta capacidade para ligar à enzima, ser quimicamente inerte e mecanicamente estável [31].

Enzimas têm sido imobilizadas sobre o transdutor ou matrizes suportes por métodos físicos e químicos. Os métodos físicos de imobilização de enzimas tais como oclusão [32] e adsorção [33] podem ser aplicados a muitas enzimas e provocam relativamente pouca perturbação sobre a estrutura nativa e função da enzima. Já, os métodos químicos de imobilização incluem ligação covalente e cruzada, e geralmente garantem ao biossensor melhor estabilidade operacional [34].

Um biossensor viável, apresentando estabilidade operacional, não depende somente da enzima, mas também da estabilidade do suporte, do procedimento de imobilização e do tipo de amostra, que pode conter diferentes ativadores e/ou inibidores [35]. Entretanto, não existe uma regra geral sobre o procedimento de

imobilização ótimo, e é sempre requerida uma aproximação empírica. Cada enzima é única em suas características e isso influenciará na escolha do procedimento de imobilização para uma enzima particular. O tipo de ligação, o material de suporte, e o método de imobilização podem ter efeitos pronunciados sobre a constante de ligação do substrato e velocidade máxima da reação, e também sobre o pH ótimo e sensibilidade frente à variação da força iônica.

Muitas vezes são usadas combinações das técnicas de imobilização para minimizar os problemas envolvidos nos métodos individuais. Um exemplo que ilustra esta prática é em estudos de biossensores a base de peroxidase [36], em que a enzima peroxidase é adsorvida sobre grafite em pó, submetido a um pré-tratamento térmico, antes da adição do aglutinante. Neste caso ocorre adsorção e oclusão na pasta de carbono. Entretanto, ainda falta estabilidade para o biossensor, pois a oclusão foi realizada em uma mistura e não em uma matriz polimérica. A estabilidade pode ser melhorada misturando a grafite em pó com carbodiimida, que facilita a formação de ligações covalentes aos grupos hidroxilas ou carboxilas sobre a superfície da grafite, podendo ainda adicionar glutaraldeído para formação de ligação cruzada.

A seguir apresentam-se algumas características de cada método de imobilização de enzimas que tem sido utilizado para o desenvolvimento de biossensores [23, 37, 38].

### *II.2.1. Microencapsulação [39]*

Microencapsulação foi o método usado na construção dos primeiros biossensores. Neste método, uma membrana inerte é usada para prender a enzima sobre o transdutor. Desta forma, a solução original contendo a enzima é inteiramente imobilizada, criando células artificiais que tem uma membrana similar às células naturais para controlar o tamanho das moléculas que podem difundir para dentro e para fora da membrana. Os principais tipos de membranas usadas são: acetato de celulose, policarbonato, colágeno, Teflon<sup>®</sup> e Nafion<sup>®</sup>.

### ***II.2.2. Adsorção***

Adsorção é o procedimento de imobilização mais simples. O método é baseado em colocar uma solução aquosa de uma enzima em contato com uma superfície adsorvente, permitir adsorver e depois lavar para remover a enzima não adsorvida. Enzimas podem ser adsorvidas diretamente sobre o material de eletrodo ou sobre suportes orgânicos ou inorgânicos tais como: alumina, carvão, argila, celulose, sílica gel, vidro e colágeno [40].

O mecanismo do processo de adsorção é muitas vezes complexo sendo difícil diferenciar claramente entre as várias possibilidades. Adsorção de enzimas pode ser atribuída a um mecanismo de troca iônica, a uma simples adsorção física usualmente fraca, ocorrendo via formação de ligações de van der Waals, como as ligações de hidrogênio, ou adsorção química envolvendo ligações covalentes.

A adsorção de uma enzima sobre um material insolúvel em água depende de algumas variáveis experimentais tais como: pH, natureza do solvente, força iônica, concentração de enzima e adsorvente, e temperatura. É extremamente importante conhecer e controlar esses fatores para conseguir imobilizar a enzima e mantê-la adsorvida com atividade.

Em geral, a simples adsorção da enzima a uma superfície de eletrodo leva a uma pobre estabilidade operacional do biossensor. Entretanto, tem sido demonstrado que a ligação cruzada com glutaraldeído aumenta a estabilidade do eletrodo enzimático [41]. Uma outra possibilidade é adicionar uma barreira tal como uma membrana ou filme para prevenir a perda da enzima adsorvida quando o biossensor é colocado em uma solução aquosa.

### ***II.2.3. Oclusão em gel ou filmes poliméricos***

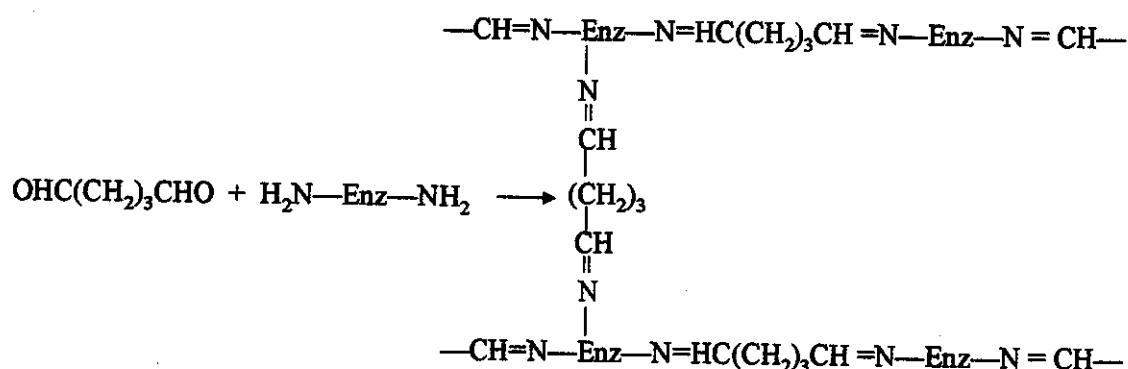
Uma solução de uma enzima é misturada com uma solução de um monômero, que é então polimerizado a um gel, prendendo a enzima. Estas podem ser ocluídas em

poliacrilamida, alginato de cálcio, ágar, agarose. As desvantagens desta técnica são: tamanho de poros irregular do gel, falta de rigidez e limitações difusionais para substratos e produtos.

Outra técnica de reter fisicamente enzimas sobre a superfície do eletrodo é através do uso de filmes poliméricos preparados eletroquimicamente. Estes filmes são obtidos através de polimerização eletroquímica de compostos orgânicos aromáticos tais como pirrol, tiofeno, fenilenodiamina, fenol, etc. [42, 43]. A imobilização em tais membranas é realizada por deposição de um filme polimérico sobre a superfície do eletrodo sobre a qual a enzima tenha sido previamente imobilizada por adsorção ou ligação cruzada [43], ou por oclusão da enzima como um contra-íon a partir de uma solução de enzima e monômero [42]. O conceito e potencialidades dos procedimentos eletroquímicos de imobilização de biomoléculas baseados em filmes eletropolimerizados foram revisados recentemente [44].

#### *II.2.4. Ligação covalente cruzada*

Neste método, reagentes bi ou multifuncionais (glutaraldeído, 2-isocianato-4-isotiocianato tolueno, hexametil-diisocianato etc.) são usados tanto para imobilização como para estabilização de enzimas imobilizadas por adsorção ou oclusão. O método baseia-se na formação de partículas macroscópicas (ou rede polimérica) em decorrência da formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzima e/ou moléculas do suporte com reagentes funcionais [45], Figura II.1. Esse método mantém a enzima num ambiente semelhante ao qual ela se encontra na natureza e devido a isto possui maior estabilidade frente aos efeitos de pH, força iônica, solventes e temperatura [46]. Neste caso também pode ocorrer limitações difusionais, provocada pela falta de rigidez e danos à enzima, mas apesar desses riscos, é um método relativamente simples e muito utilizado para estabilizar enzimas adsorvidas e em combinação com outros métodos.



**Figura II.1.** Ligação cruzada envolvendo a reação entre glutaraldeído e os grupos amina residuais livres de enzimas [48, 49].

Apesar de ser tão utilizado, o método de ligação cruzada é pouco entendido do ponto de vista molecular [34]. Muitos textos indicam que o dialdeído faz ligações iminas entre a matriz e o grupo amina, mas isto não é tão simples, pois glutaraldeído, a menos que recém preparado, consiste de polímeros. A complexidade de reações possíveis de ocorrer pode ser o fator principal para o problema freqüente que se encontra na imobilização com glutaraldeído que é a difícil reprodutibilidade. Não existe um procedimento para o uso de glutaraldeído que seja específico para uma dada enzima ou aplicação, mas, de uma forma geral, este reagente deve ser estocado em soluções diluídas em baixa temperatura e em pH 3-4 para prevenir a polimerização. A ativação do suporte deve ser conduzida em pH 6,8 enquanto que o acoplamento com a enzima deve ser realizado em pH mais elevado para promover o ataque nucleofílico e melhorar a imobilização [47].

### *II.2.5. Ligação covalente*

Este método envolve a formação de ligação covalente entre grupos funcionais da enzima e o suporte. É importante que os aminoácidos essenciais para a atividade catalítica da enzima não sejam envolvidos na ligação covalente ao suporte. Isto pode

ser difícil de conseguir e por isso quando este método de imobilização é utilizado, pode haver perda de atividade da enzima. Este problema pode ser prevenido se a enzima for imobilizada na presença do seu substrato. Antes da ligação covalente da enzima ao suporte, este deve ser ativado. Depois de ativado, o suporte pode então reagir com grupos particulares da enzima. Um exemplo desta técnica é a ligação covalente de uma enzima a um suporte via uma carbodiimida, como mostrado na Figura II.2. Um grupo carboxílico sobre o suporte reage com uma carbodiimida, este então acopla com um grupo amina sobre o biomaterial para formar uma ligação amida entre o suporte e a enzima.

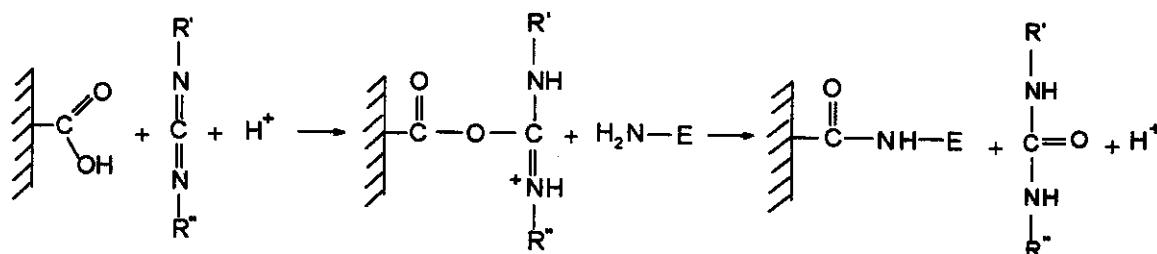


Figura II.2. Reação via carbodiimida usada para formação de ligação covalente entre a enzima e o suporte [50].

A escolha de um método de imobilização adequado é muito importante uma vez que este procedimento influi em muitas das características desejáveis para os biossensores. Os fatores que afetam o desempenho dos biossensores tem sido discutidos na literatura [51] e a Tabela II.2 mostra um sumário do que tem sido observado experimentalmente.

**Tabela II.2. Características desejáveis para um biossensor e os fatores que as afetam.**

<b>Características</b>	<b>Fatores que afetam</b>
<b>1- Estabilidade</b>	a) Tipo de imobilização b) Quantidade e pureza da enzima c) Condições operacionais ótimas para a enzima d) Estabilidade do transdutor e) Temperatura
<b>2- Tempo de resposta</b>	a) Velocidade de agitação da solução b) Concentração de substrato c) Concentração de enzima d) pH ótimo e) temperatura f) Espessura da camada biocatalítica (tipo de imobilização)
<b>3- Sensibilidade</b>	a) Sensibilidade do transdutor b) Concentração de enzima c) Tipo de imobilização
<b>4- Seletividade</b>	a) Componente biológico b) Tipo de imobilização c) Transdutor



***BIOSENSORES  
AMPEROMÉTRICOS***

III OTC-H-DN

### III. BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS [26, 52]

É muitas vezes observado que a cinética redox de um analito particular em uma superfície de eletrodo limpa (nua) é lenta, de forma que a oxidação ou a redução ocorre em potenciais mais positivos ou negativos, respectivamente, que o esperado a partir de dados termodinâmicos (isto é existe um sobrepotencial de ativação). Para muitos compostos/analitos biológicos com comportamento redox irreversível, é possível encontrar uma enzima redox capaz de catalisar sua oxidação ou redução. Após a imobilização de tal enzima sobre uma superfície de eletrodo, espera-se, pelo menos teoricamente, ser possível obter um fluxo de elétrons entre o analito e o eletrodo, provocando assim uma corrente mensurável proporcional à concentração do analito [53].

O primeiro biossensor amperométrico foi desenvolvido por Updike e Hicks em 1967 [54] para a detecção de glicose usando a enzima glicose oxidase acoplada a um eletrodo para oxigênio de Clark e desde então, enzimas têm sido usadas em conjunto com diferentes materiais de eletrodo para produzir biossensores amperométricos. Tanto a formação do produto quanto o consumo de reagente podem ser usados como uma medida da concentração do substrato (analito). Tais biossensores cuja junção eletrônica entre a enzima redox e o eletrodo está baseada na eletroatividade do substrato da enzima ou do produto são chamados *biossensores de primeira geração*.

As desvantagens dos biossensores de primeira geração, tais como o alto potencial aplicado, levou ao uso de mediadores redox que são substâncias redox de baixo peso molecular (tais como: ferroceno, hexacianoferrato, azul de metileno, quinonas, etc.), que facilitam a transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo, segundo o esquema:



onde  $M_{ox}$  e  $E_{ox}$  são as formas oxidadas e  $M_{red}$  e  $E_{red}$  são as formas reduzidas das moléculas de mediador e enzima respectivamente. O processo eletroquímico ocorrerá no potencial característico do mediador sendo este tal que a reação III.1b também ocorreria se não fosse cineticamente desfavorável. Como  $M_{ox}$  é regenerado próximo da superfície do eletrodo como uma consequência da reação III.1c, esta espécie não tem que difundir para que ocorra a transferência de elétrons. Por isso, um significativo aumento da corrente pode ser observado, para uma pequena quantidade de  $E_{ox}$  presente, se a reação química for rápida. Entretanto, deve-se levar em conta que as reações de  $M_{red}$  gerado eletroquimicamente não são muito específicas.

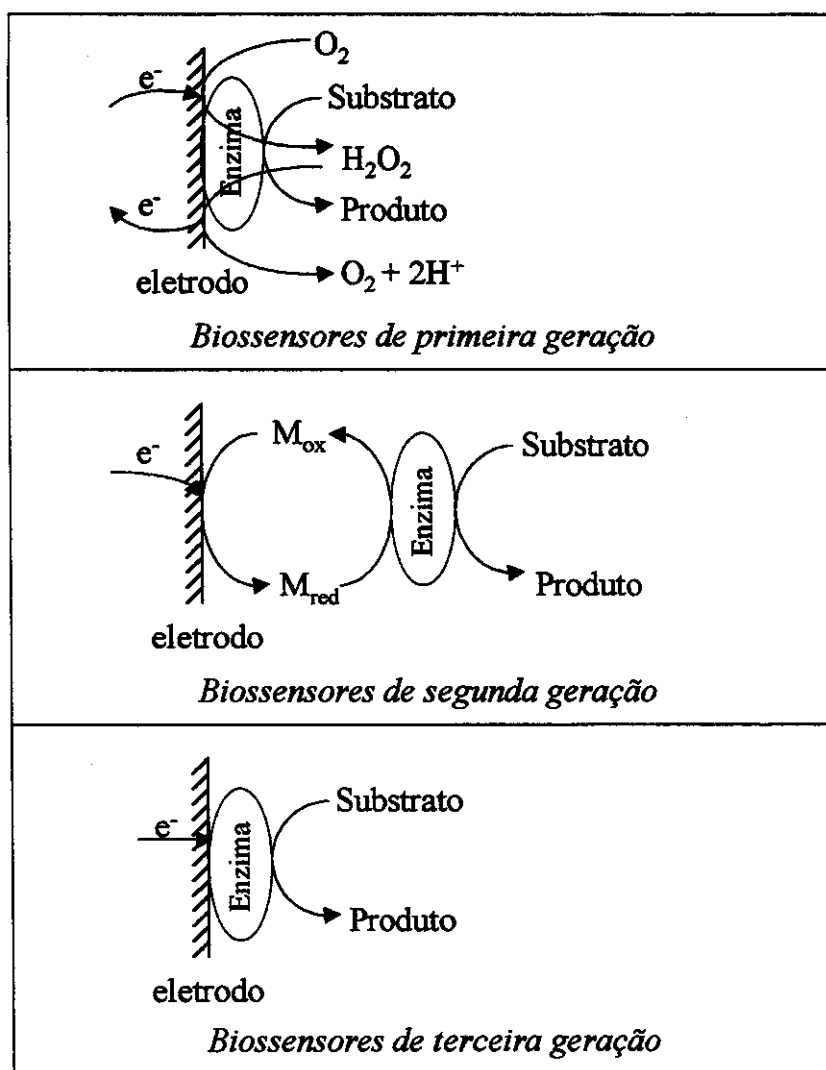
Biossensores amperométricos modificados com mediadores [55], *biossensores de segunda geração*, têm sido um dos campos principais de pesquisa com eletrodos enzimáticos, já que empregando-se mediadores, os eletrodos podem ser operados em um potencial menor em relação ao requerido sem a sua presença, reduzindo a possibilidade de interferências na resposta [36, 56]. Um grande interesse tem sido dado na construção e emprego destes eletrodos, principalmente, devido aos recentes desenvolvimentos nas técnicas de imobilização de ambos, mediadores e enzimas em eletrodos [57]. Os mediadores têm sido incorporados aos eletrodos por adsorção, oclusão em filme polimérico, ligação covalente ou misturados em pasta de carbono.

Entretanto, os mediadores redox usados em conjunto com enzimas redox não formam um caminho tão seletivo, podendo facilitar não somente a transferência de elétrons entre o eletrodo e a enzima mas também várias reações interferentes. A principal vantagem dos biossensores baseados em transferência de elétrons direta, *biossensores de terceira geração* [58], é a ausência de mediadores, fornecendo-lhes seletividade superior porque eles podem operar em um potencial mais próximo do potencial redox da própria enzima e por isso estão menos sujeitos a reações interferentes [57] e também devido à ausência de outros reagentes na seqüência da reação.

Entretanto, um aspecto que deve ser considerado em relação aos biossensores de terceira geração é que a transferência de elétrons depende da distância entre o centro

redox e o eletrodo. Esta representa um fator crítico quando se trata de enzimas redox que geralmente são proteínas de alta massa molar e tem um sítio ativo situado no interior da estrutura da proteína.

Os biossensores amperométricos tem encontrado aplicação na indústria, controle de processos, em medicina e monitoramento ambiental. A Figura III.1 apresenta uma representação esquemática para as três gerações de biossensores amperométricos.



**Figura III.1.** Representação esquemática do mecanismo de resposta para as três gerações de biossensores amperométricos.

### **III.1. Materiais eletródicos utilizados na construção de biossensores amperométricos**

Em princípio, os materiais eletródicos tais como ouro, platina, grafite sólido, carbono vítreo, pasta de carbono, etc. podem ser usados para a construção de biossensores amperométricos. Recentemente, a construção de eletrodos a base de carbono tem recebido grande atenção devido às características atrativas do carbono, tais como versatilidade, baixo custo, corrente residual e resistência elétrica baixas, e uma ampla faixa de potencial anódico [59]. O carbono é morfologicamente diverso, existindo em várias formas apropriadas para aplicações eletroquímicas, como fibras de carbono [60], carbono vítreo [61], pasta de carbono [62], compósitos [63] e filmes de carbono [64].

#### ***III.1.1. Eletrodos de pasta de carbono***

Os eletrodos preparados a base de pasta de carbono oferecem versatilidade, baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo, modificação conveniente, facilidade de renovação da superfície e possibilidade de miniaturização. Devido a essas propriedades, os eletrodos a base de pasta de carbono estão em extensivo uso em eletroanálise [57, 65, 66].

Pasta de carbono é uma mistura de grafite em pó e um líquido orgânico que é imiscível em contato com soluções aquosas. A superfície dos eletrodos de pasta de carbono é muito complexa com muitas possibilidades de interações. O líquido orgânico, aglutinante, serve para manter uma forma firme do eletrodo, preencher as cavidades entre as partículas de grafite e “isolar” a grafite do contato com soluções aquosas [67].

O primeiro trabalho reportado sobre eletrodos de pasta de carbono com uma enzima imobilizada na pasta apareceu em 1988 [68], em que glicose oxidase foi diretamente combinada com uma fase orgânica consistindo de grafite em pó e óleo de

silicona. Desde então, a imobilização de uma variedade de enzimas, principalmente óxido-redutases, em eletrodo de pasta de carbono tem sido um caminho cada vez mais utilizado para a construção de eletrodos enzimáticos. Uma revisão sobre o uso de eletrodos de pasta de carbono para propósitos eletroanalíticos, com a superfície ou “bulk” modificado com materiais biológicos tais como enzimas, tecidos e células, foi feita por Gorton [57].

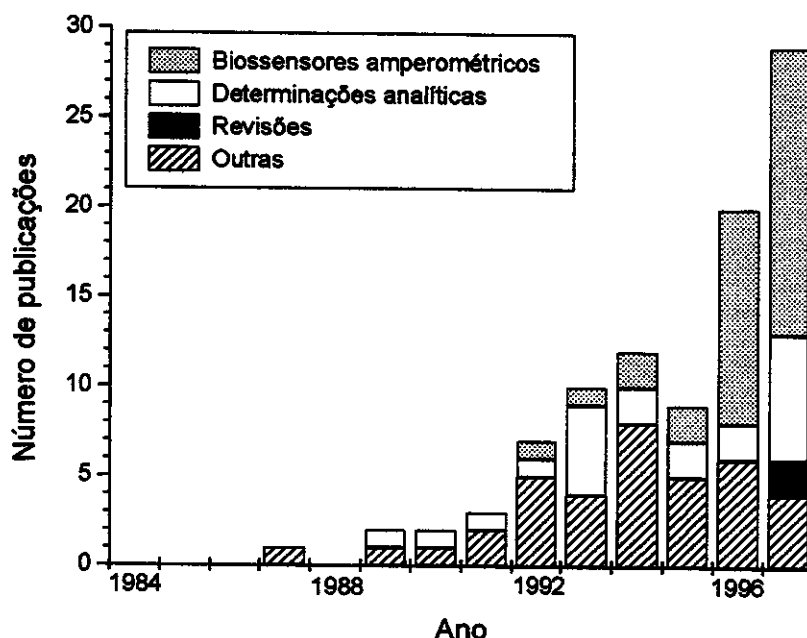
Uma das principais vantagens de pasta de carbono para a construção de biossensores é que esses eletrodos possibilitam a modificação do “bulk” do material de eletrodo, diferente do que ocorre com os eletrodos sólidos convencionais em que a modificação ocorre apenas na superfície. Isto significa que é possível a co-imobilização de enzimas, cofatores, mediadores, estabilizadores na pasta, resultando uma configuração de eletrodo sem a necessidade de adição de reagentes durante a determinação.

A principal desvantagem dos eletrodos de pasta de carbono é a falta de estabilidade estrutural do “bulk” e da superfície, especialmente quando eles são empregados por um longo período de tempo ou na presença de solventes orgânicos na solução. Um outro aspecto a considerar é que, em geral, os eletrodos de pasta de carbono são caracterizados pela sua falta de reprodutibilidade. Na maioria dos casos, o grafite e o aglutinante são misturados manualmente fornecendo muitas vezes um material não homogêneo, podendo ser difícil reproduzir as pastas. Tem sido verificado que pequenas diferenças no tempo usado para a secagem, temperatura, tipo de tampão, polimento da superfície, etc., pode ser crucial para o resultado final [57].

### *III.1.2. Eletrodos de pasta de carbono modificados com sílica*

Os eletrodos modificados com materiais inorgânicos praticamente formam uma nova categoria dos eletrodos quimicamente modificados. Várias matrizes inorgânicas têm sido usadas como agente modificador de eletrodos convencionais. Estas incluem: óxidos metálicos, ftalocianinas e porfirinas metálicas, fosfatos e fosfonatos,  $\gamma$ -alumina,

sílica gel, zeólitas, dentre outros. A sílica gel apresenta um grande potencial de aplicação em eletroquímica, entretanto essa é uma área de pesquisa relativamente recente e que tende a crescer como descreve Walcarius [69] na sua recente revisão sobre o uso de materiais a base de sílica em estudos sobre eletrodos modificados direcionados para aplicações eletroanalíticas. Segundo o seu levantamento, o campo dos eletrodos modificados com sílica começou lentamente em 1989/90 e então tem aumentado exponencialmente nos anos recentes, como pode ser verificado pela Figura III.2.



**Figura III.2.** Número de publicações por ano baseadas em eletrodos modificados com sílica.

A variedade de materiais a base de sílica juntamente com a química de sua superfície implica num grande potencial para a aplicação dessas espécies em eletroquímica. Algumas das propriedades deste material tais como capacidade de adsorção, química ácido-base, estabilidade térmica, podem ser vantajosamente exploradas, por exemplo, no acúmulo de espécies eletroativas antes da sua detecção

eletroquímica. Além disso, a sílica pode ser enxertada com uma variedade de grupos funcionais levando a um considerável enriquecimento de suas propriedades de superfície. A alta área superficial de sílicas sintéticas, quando combinada à sua química de superfície, torna esse material útil como suportes para vários catalisadores.

Apesar da fórmula simples do dióxido de silício,  $\text{SiO}_2$ , a sílica existe como uma variedade de formas. Cada uma destas é caracterizada por uma estrutura (cristalina ou amorfa) e propriedades física e química tanto do “bulk” quanto de sua superfície. A química tanto do “bulk” como da superfície da sílica tem sido extensivamente revisada, estando disponíveis na literatura livros, monografias e revisões, tratando a respeito de sua síntese, caracterização, modificação química, reatividade de superfície e usos práticos [70-74]. Sílica tem sido aplicada em cromatografia, catálise e suporte para catalisadores, e mais recentemente como suporte para imobilização de enzima.

Apesar de ser bastante conhecida, a superfície da sílica está continuamente sendo investigada por novos métodos e técnicas, uma vez que a química deste material é principalmente governada pelas propriedades de superfície deste sólido. A superfície da sílica consiste de várias espécies de silanóis e siloxanos. Os grupos silanóis são considerados fortes sítios de adsorção [75] enquanto que os siloxanos são usualmente considerados como hidrofóbicos [76].

Sílicas quimicamente modificadas tem atraído considerável atenção devido a vantajosa combinação das propriedades intrínsecas da matriz inorgânica à reatividade particular dos modificadores. Do ponto de vista eletroquímico, sílicas quimicamente modificadas são modificadores atrativos (tipicamente para eletrodos de pasta de carbono) porque permite produzir na interface eletrodo-solução uma variedade de funcionalidades orgânicas que estão covalentemente ligadas à matriz condutora, prevenindo por isso seu desprendimento do eletrodo para a solução como ocorre muitas vezes para porções orgânicas adicionadas diretamente sobre o material de eletrodo [77].

Kubota e col. [78-83] tem realizado trabalhos explorando a versatilidade da sílica gel em imobilizar vários componentes tais como filmes de óxido ou espécies



eletroativas. Muitos dos estudos foram baseados na preparação de sílica gel modificada com óxidos metálicos e utilização dos materiais resultantes como suporte para imobilização de vários mediadores de transferência de elétrons que mostraram-se interessantes quando integrados a biossensores amperométricos. Por exemplo, eletrodos de pasta de carbono modificados com sílica gel contendo azul de metileno adsorvido foram usados para a determinação de frutose [84] e salicilato [85]. Em uma aproximação similar, foi construído um biossensor para glicose co-imobilizando a enzima e o mediador (ácido ferrocenomonocarboxílico) sobre sílica gel modificada com óxido de titânio, que foi então misturada na pasta de carbono [86]. As altas correntes electrocatalíticas observadas foram explicadas pela alta superfície específica das partículas de sílica, e a maior estabilidade do mediador foi conseguida devido a sua adsorção sobre a superfície da sílica.

***BIOSENSORES  
AMPEROMÉTRICOS  
PARA FENÓIS***

IV  
O  
L  
C  
H  
D  
A  
C

## IV. BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA FENÓIS

Fenóis podem ser determinados amperometricamente através de uma oxidação eletroquímica direta [87, 88]. Entretanto, este procedimento possui uma série de desvantagens, principalmente, devido a um alto sobrepotencial. O alto potencial que precisa ser aplicado torna o sistema de detecção acessível a reações interferentes, e é também acompanhado por um aumento na corrente de fundo e nível de ruído. Além disto, nas oxidações diretas de fenóis, um grande número de reações paralelas podem ocorrer levando, principalmente, a formação de produtos poliméricos que passivam a superfície do eletrodo.

A utilização de biossensores amperométricos pode minimizar estes obstáculos na determinação de fenóis, uma vez que estes operam com um baixo potencial aplicado, e mede-se a corrente gerada pela reação biocatalisada de oxidação ou redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo, que de um modo geral, processam-se em potenciais ao redor de 0 mV vs ECS. Neste potencial, a contribuição de espécies interferentes é minimizada, Figura IV.1 [13, 35, 36, 88].

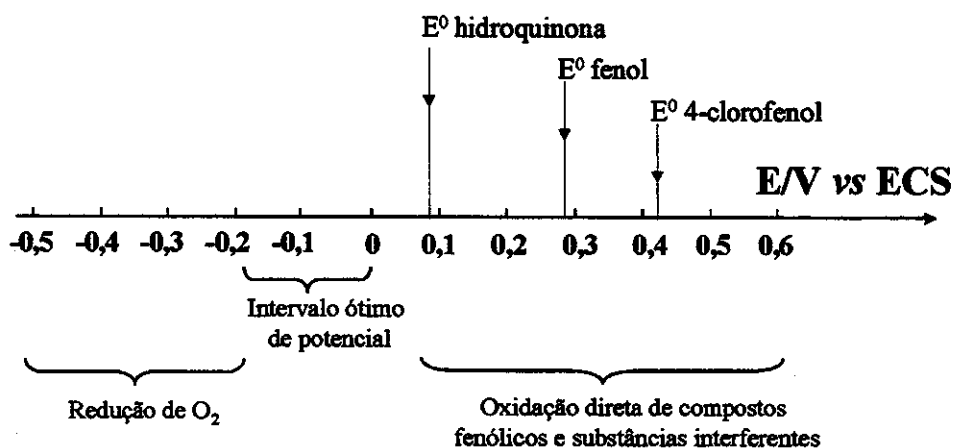
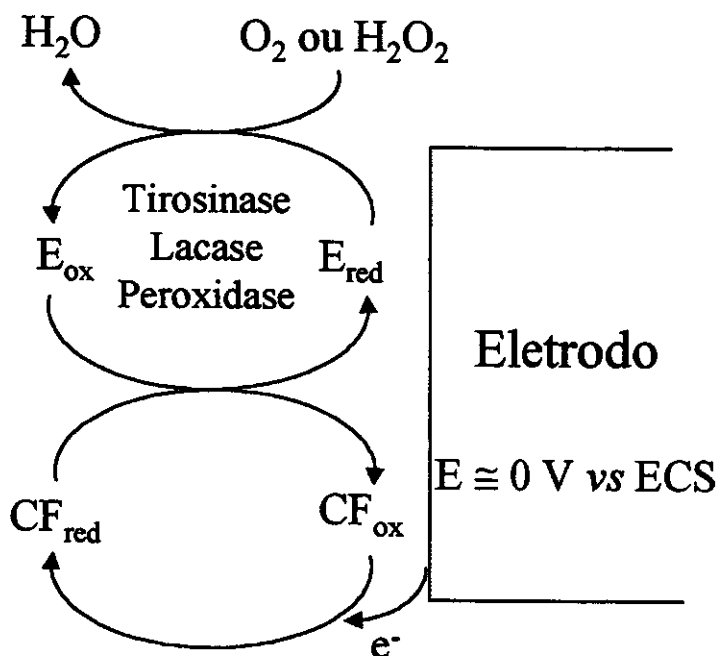


Figura IV.1. Intervalo de potencial ótimo para a operação de biossensores amperométricos.  $E^0$  hidroquinona,  $E^0$  fenol e  $E^0$  4-clorofenol são os potenciais formais dos pares redox hidroquinona/quinona, fenol/radical fenoxi e 4-clorofenol/4-clorofenoxi, respectivamente [13]. Eletrodo de grafite e meio aquoso.

Dentre os materiais de eletrodo que podem ser usados para a construção de biossensores amperométricos, os materiais carbonáceos têm sido os mais utilizados. Estes materiais podem ser divididos em carbono vítreo, grafite pirolítico, pasta de carbono e compósitos [64, 89].

As enzimas redox tirosinase, lacase e peroxidase são as mais utilizadas para a construção de biossensores amperométricos para fenóis. Apesar destas enzimas possuírem diferentes mecanismos de ação, suas atuações em biossensores amperométricos para a detecção de compostos fenólicos têm sido esquematizadas como uma seqüência de reações similares, conforme mostra a Figura IV.2 [13].



**Figura IV.2.** Mecanismo das reações nos eletrodos modificados pelas enzimas para a determinação de compostos fenólicos.  $E_{red}$  e  $E_{ox}$  são as formas reduzida e oxidada, respectivamente das enzimas; CF = composto fenólico.

As moléculas de enzima na superfície do eletrodo são oxidadas pelo oxigênio (no caso da tirosinase e lacase) ou peróxido de hidrogênio (no caso da peroxidase), sendo em seguida reduzidas por compostos fenólicos. Durante esta última reação, os fenóis são basicamente convertidos em quinonas e/ou radicais livres, e esses produtos,

usualmente eletroativos, podem ser reduzidos na superfície do eletrodo em potenciais próximos de 0 V vs ECS (Eletrodo de Calomelano Saturado). A corrente de redução medida é proporcional à concentração do composto fenólico na solução.

A detecção do consumo de  $O_2$  ou  $H_2O_2$  é uma outra possibilidade de se monitorar a concentração dos compostos fenólicos. Entretanto, o método de detecção dos fenóis baseado na redução dos produtos gerados pelas reações enzimáticas apresenta vantagens tais como: simplicidade de construção e manuseio; proteção do eletrodo contra o acúmulo de produtos poliméricos secundários sobre sua superfície (passivação), que usualmente são observados durante oxidação eletroquímica direta de fenóis; amplificação da resposta como uma consequência da redução de quinonas e/ou radicais fenoxi ao composto fenólico inicial, e o desempenho dos eletrodos se enquadra no intervalo de potenciais ótimo para medidas eletroquímicas [13] (Figura IV.1).

Os biossensores amperométricos para a determinação de compostos fenólicos tem sido construídos sobre a base de duas diferentes configurações principais [13]: 1) eletrodos de grafite sólido com a superfície modificada, onde a enzima é fisicamente adsorvida, covalentemente imobilizada ou retida com o auxílio de uma membrana, e 2) eletrodos compósitos com o material do eletrodo modificado, onde as partículas de grafite são modificadas com enzimas, por procedimentos semelhantes ao do eletrodo de grafite sólido, e em seguida misturada com óleos, resinas epoxi ou partículas de teflon.

Entretanto, a maior parte das investigações sobre os mecanismos dos biossensores enzimáticos foi realizada usando eletrodos de grafite sólido, devido a uma maior sensibilidade. A resposta relativa dos eletrodos de grafite modificados, com diferentes enzimas, para vários compostos fenólicos são apresentadas na Tabela IV.1 [13]. Pode-se observar que os eletrodos modificados com tirosinase usualmente apresentam melhores resultados para a detecção de catecol, embora também possam ser empregados para a análise de monofenóis e outros difenóis. A co-imobilização de lacase e tirosinase aumenta a resposta relativa de alguns compostos em relação àsquelas obtidas com estas enzimas separadas, permitindo a determinação de uma

gama maior de espécies fenólicas. Os eletrodos modificados com peroxidase possibilitam a determinação de um número maior de compostos fenólicos.

**Tabela IV.1.** Respostas relativa dos eletrodos modificados com diferentes enzimas para compostos fenólicos [13].

Composto fenólico	Resposta relativa (%)			
	Tirosinase	Lacase	Tirosinase/lacase	Peroxidase
p-cresol	100	100	100	100
Catecol	3500	560	900	100
Hidroquinona	2	560	143	
4-clorofenol	50	13	20	82
2-clorofenol	0,4	0	0	0
Resorcinol	1	3	0,5	33
Fenol	200	3	95	21
Terbutalina sulfato	0,4	1		
2-amino-4-clorofenol		94	111	532
2,4-diclorofenol				76
4-cloro-3-metilfenol				159
Vanilina				71
3,4-dihidroxibenzaldeído				39
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico				37
Tirosina				4

Para os eletrodos modificados com tirosinase, lacase e tirosinase coimobilizada com lacase, a concentração dos compostos fenólicos na solução tampão foi  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , enquanto que  $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$  dos fenóis foi usado para o eletrodo modificado com peroxidase.

Apesar da resposta satisfatória obtida com eletrodos sólidos, há necessidade de alternativas para melhorar sua estabilidade operacional e estocagem. Isto tem levado a um aumento nas pesquisas e desenvolvimento de eletrodos compósitos. O material compósito é barato, fácil de preparar e versátil, e apresenta como uma das principais vantagens a possibilidade de co-imobilização de enzimas, cofatores, mediadores, estabilizadores, etc.

## IV.1. Biossensores a base de peroxidase

### IV.1.1. Peroxidases

Peroxidases são enzimas que catalisam a oxidação de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos na presença de peróxido de hidrogênio ou peróxidos orgânicos de cadeia pequena. Constituem uma classe de enzimas extensivamente distribuída em plantas e podem ser extraídas de células e órgãos de muitas plantas [90]. Muitas peroxidases são hemeproteínas (sítio ativo:  $\text{Fe}^{+3}$  protoporfirínico), Figura IV.3.

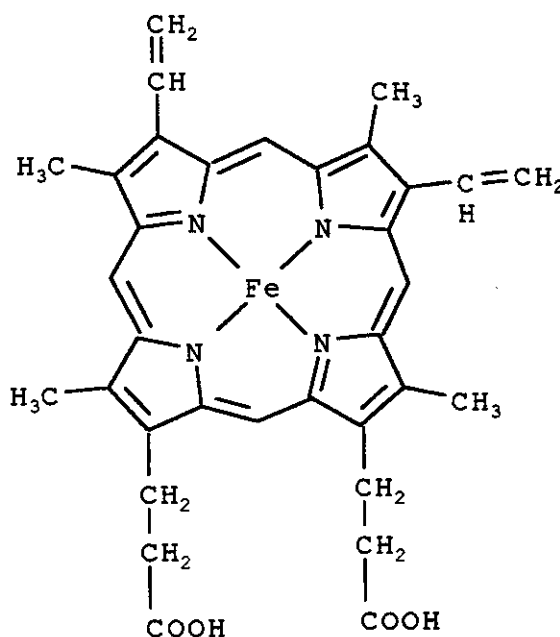


Figura IV.3. Estrutura da molécula protoporfirina que é o sítio ativo de muitas peroxidases.

Algumas das peroxidases mais importantes, suas massas molares e seu grupo prostético são listadas na Tabela IV.2.

**Tabela IV.2.** Massas molares e grupo prostético de diferentes peroxidases [35, 91].

Peroxidases	Abreviação	Massa Molar	Grupo prostético
Peroxidase de raiz forte	HRP	40 500	Ferriprotoporfirina IX
Citocromo c peroxidase	CcP	34 100	Ferriprotoporfirina IX
Cloroperoxidase	CIP	40 200	Ferriprotoporfirina IX
Lactoperoxidase	LP	76 500	Derivado de mesoheme IX
Peroxidase de tireóide	ThP	62 000	Não ferriprotoporfirina IX
Peroxidase de rabanete japonês a	JRP	55 700	Ferriprotoporfirina IX
Peroxidase de rabanete japonês c	JRP	41 500	Ferriprotoporfirina IX
Myeloperoxidase	MP	149 000	Dois átomos de Fe ligados à porfirina
NADH peroxidase		12 000	FAD
Turnip peroxidase A1 (nabo)	TuP	49 000	Ferriprotoporfirina IX
Glutathiona peroxidase		90 000	Um átomo de Se por sub-unidade
Peroxidase de fungo <i>Arthromyces ramosus</i>	ARP	42 000	Ferriprotoporfirina IX
Peroxidase de soja	SBP	37 000	Ferriprotoporfirina IX
Peroxidase de folha de tabaco	TOP	36 000	Ferriprotoporfirina IX

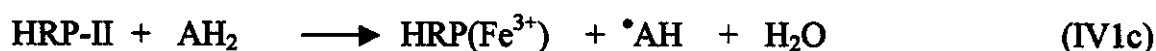
A peroxidase de “horseradish root”, HRP [92], tem sido amplamente estudada para a elucidação do mecanismo da peroxidase e é a mais usada em química analítica por ser estável por longos períodos de tempo à temperatura ambiente e em um amplo intervalo de pH, além de ser relativamente barata e disponível comercialmente em diferentes graus de pureza.

HRP é uma glicohemeproteína e consiste de 308 resíduos de amino ácidos, dois  $\text{Ca}^{2+}$ , e uma porção ferriprotoporfirina IX (heme), Figura IV.3, não covalentemente ligada à cadeia polipeptídica que forma o sítio ativo da enzima. O conteúdo de carboidrato é aproximadamente 18% da massa molar total, 42-45 kD, da HRP. As propriedades catalíticas, estruturais e eletroquímicas de peroxidases foram revisadas por Ruzgas e col. [91].

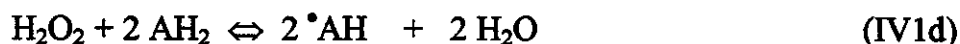


### IV.1.2. Ciclo catalítico das peroxidases

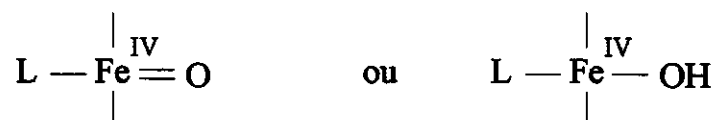
As enzimas peroxidases catalisam a redução de peróxidos oxidando o grupo heme do sítio ativo da enzima (grupo prostético). De uma forma simplificada, o ciclo normal da HRP pode ser representada pelas equações [91, 92]:



onde HRP-I e HRP-II são os intermediários oxidados da enzima,  $\text{AH}_2$  é o substrato redutor e  $\cdot\text{AH}$  é um radical livre. Na primeira etapa, a enzima reduz o peróxido de hidrogênio com a formação de um composto intermediário oxidado da enzima. A forma oxidada da enzima é reduzida à forma nativa em duas etapas monoelétrônicas. A soma das reações (IV1a) a (IV1c) é:

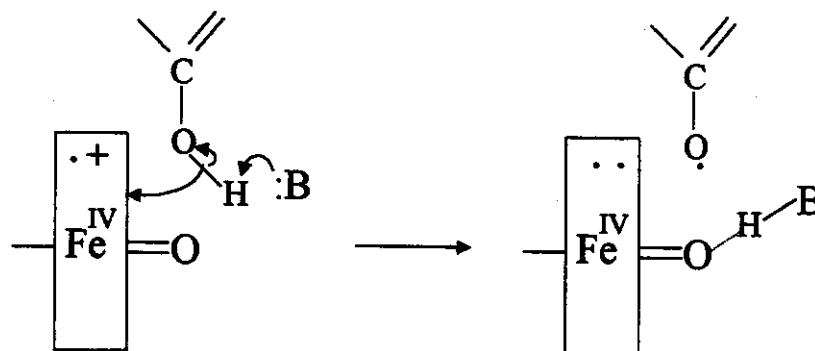


Os intermediários da HRP já foram isolados e estudados, tanto espectroscopicamente como cineticamente. HRP-I constitui-se numa espécie verde ( $\lambda_{\text{máx}} = 410, 655 \text{ nm}$ ) [93] encontrando-se o íon metálico com uma carga formal  $\text{Fe}(\text{V})$ . Outros estudos sugerem que seja preferencialmente um cátion radical porfirínico contendo  $\text{Fe}(\text{IV})$  [94-96], sendo esta última mais aceita na literatura. HRP-II é vermelho ( $\lambda_{\text{máx}} = 420, 527 \text{ e } 555 \text{ nm}$ ) [97], podendo ser representado como:



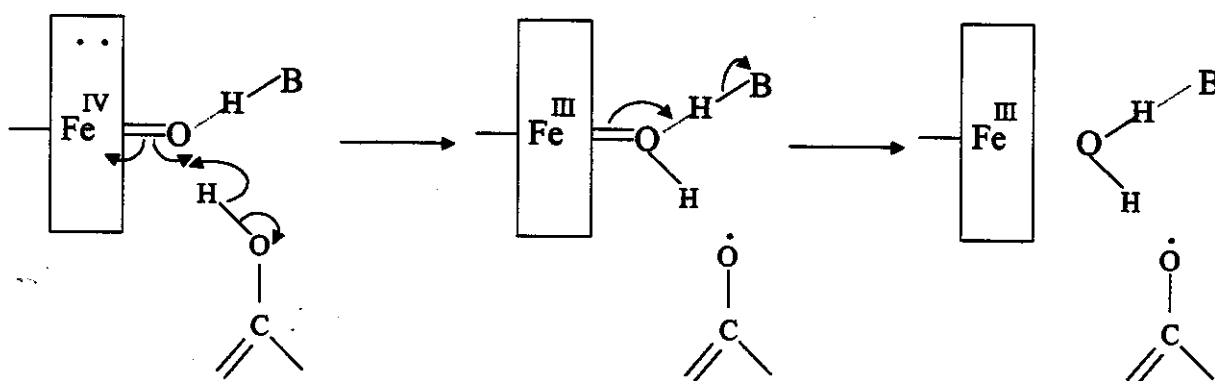
Dos dois elétrons requeridos para a redução de peróxido, um vem do  $\text{Fe}(\text{III})$ , enquanto o outro vem da porfirina, produzindo um cátion radical porfirínico. O

mecanismo proposto para a redução de um elétron de HRP-I para HRP-II por um fenol é esquematizado na Figura IV.4. O substrato redutor, um fenol, é considerado como um doador de hidrogênio enquanto que um grupo “distal” provavelmente o grupo imidazol de His 42 aceita um próton, e o elétron é transferido simultaneamente para o heme, de forma que o cátion radical desaparece, ou seja, as espécies  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$  permanecem intactas e a porfirina é reduzida.



**Figura IV.4.** Mecanismo proposto para a redução de HRP-I para HRP-II por um fenol [92]. B representa His 42.

Quando HRP-II é reduzido, água é o grupo de saída, com o átomo de oxigênio vindo do  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ . O mecanismo mais simples e plausível é o seguinte: um próton é fornecido por um grupo “distal”, provavelmente His 42, e o outro pelo substrato redutor doador de hidrogênio. A transferência de elétrons pode ocorrer através do grupo ferril como esquematizado na Figura IV.5.



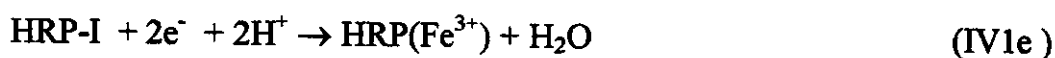
**Figura IV.5.** Mecanismo proposto para a redução de HRP-II para HRP nativa por um fenol [92]. B representa His 42.

### IV.1.3. Peroxidase imobilizada em eletrodos

Os eletrodos modificados com peroxidase tem sido amplamente explorados e desenvolvidos para a determinação de peróxidos, combinado com oxidases que fornecem peróxido de hidrogênio como um produto de reação, e também outros importantes analitos tais como aminas aromáticas, compostos fenólicos, etc, podem ser monitorados com esses biossensores sob condições especiais [91].

Quando a peroxidase é imobilizada sobre uma superfície de eletrodo, a forma oxidada da enzima, que é formada na reação com peróxido, pode ser reduzida à sua forma ativa por uma transferência de elétrons heterogênea diretamente do material de eletrodo ou por meio de mediadores redox.

A peroxidase oxidada pode ser reduzida por elétrons fornecidos pelo eletrodo, segundo a reação (IV1e):



Este processo é usualmente referido como transferência de elétrons direta, TED, isto é, quando um eletrodo substitui o substrato doador de elétrons em um ciclo de reação comum da peroxidase, reações (IV1a) –(IV1c).

Quando um doador de elétrons ( $\text{AH}_2$ ) está presente em um sistema peroxidase-eletrodo, os processos direto e mediado podem ocorrer simultaneamente, e o doador oxidado ( $\text{AH}^\bullet$ ) é reduzido eletroquimicamente pelo eletrodo segundo a reação (IV1f):



A seqüência de reações (reações (IV1a), (IV1b), (IV1c), (IV1f)) é conhecida como transferência de elétrons mediada, que usualmente é mais eficiente comparada à transferência de elétrons direta [58, 91, 98]. As duas aproximações resultam em uma corrente de redução relacionada à concentração de peróxido de hidrogênio. Entretanto,

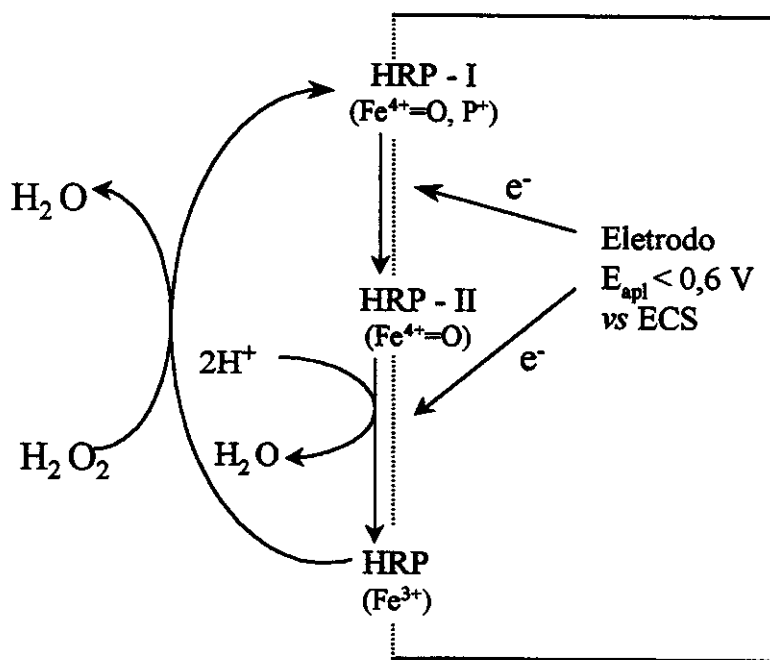
uma alta concentração de peróxido no meio pode levar à formação de peroxidase inativa [99].

#### *IV.1.3.1. Transferência de elétrons direta*

As primeiras publicações sobre transferência de elétrons direta com uma proteína redox apareceram em 1977 quando Eddows e Hill [100] e Yeh e Kuwana [101] independentemente mostraram que citocromo c sobre ouro e eletrodo de óxido de índio dopado com estanho, respectivamente, apresenta eletroquímica reversível revelada por voltametria cíclica. Citocromo c é uma pequena proteína redox que é ativa em transferência de elétrons biológica, mas não tem propriedades de enzima. Em seguida a esses trabalhos, estudos realizados por grupos da Rússia evidenciaram que a transferência de elétrons direta também é possível para proteínas redox maiores com atividade enzimática (óxido-redutases). Os autores mostraram que, eletrodos de carbono modificados com laccase [102] e peroxidase [103] na presença do substrato (oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, respectivamente) revelaram transferência de elétrons direta.

Reação de transferência de elétrons direta tem sido reportada para um número restrito de enzimas redox [27, 58, 104]. A grande maioria destas enzimas redox contém metalocentros e heme em particular. Heme é uma molécula que forma vários estados reduzidos e oxidados e, por si só, exibe várias propriedades catalíticas que mudam drasticamente quando incorporadas em ambientes proteináceos, o que cria excelentes oportunidades para aplicações bioeletroquímicas de heme-enzimas e heme-proteínas. Entretanto, nestes dois casos, o sítio ativo heme está rodeado por polipeptídeos, o que aumenta a distância para transferência de elétrons. Assim, a orientação de proteínas sobre a superfície do eletrodo torna-se importante para realizar transferência de elétrons direta eficiente já que muitas vezes os sítios ativos nas enzimas não estão localizados no centro da proteína, podendo estar expostos.

Materiais de eletrodo a base de carbono são comumente usados para a construção de eletrodos modificados com peroxidase por fornecerem correntes mais altas. Uma maior eficiência na redução bioeletrocatalítica de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é encontrada em eletrodos com funcionalidades de superfície ricas em oxigênio como, por exemplo, grafite pré-oxidada eletroquimicamente [89], grafite submetido a tratamento térmico [56], carbono ativado [105], grafite pirolítico com plano orientado [106-108] e também sobre superfícies contendo alta densidade de funcionalidades C-O [109]. Os grupos fenólicos e quinonas presentes na superfície da grafite parecem facilitar a transferência de elétrons entre esse material e as peroxidases. O mecanismo no caso da transferência de elétrons direta do eletrodo para restaurar a enzima está representado esquematicamente na Figura IV.6.



**Figura IV.6.** Mecanismo da transferência de elétrons direta entre HRP e o eletrodo a base de grafite.  $\text{P}^+$  é um cátion radical porfirínico.

Entretanto, a proposta da existência de grupos especiais sobre a superfície da grafite atuando como substratos da peroxidase, para explicar o fenômeno de

transferência de elétrons direta, foi recentemente substituída. Os autores demonstraram a verdadeira natureza da transferência de elétrons direta catalisada pela enzima na ausência de mediadores, uma vez que resultados obtidos com mutantes mostraram que a transferência de elétrons direta não depende da habilidade da enzima para oxidar substratos fenólicos [103]. Tendo sido estabelecido que a habilidade de participar em transferência de elétrons direta é uma propriedade intrínseca da proteína, as pesquisas futuras estão sendo direcionadas para o desenvolvimento de técnicas de ligação orientada para HRP [103].

#### *IV.1.3.2. Transferência de elétrons mediada*

A lenta transferência de elétrons direta das peroxidases tem sido superada pelo uso de mediadores (pequenas moléculas redox com uma alta velocidade de transferência de elétrons), para a construção de eletrodos modificados com peroxidase [55, 110]. Estes mediadores distribuem os elétrons da superfície do eletrodo para os compostos HRP-I e HRP-II.

O mediador escolhido tem que reagir rapidamente com a peroxidase oxidada. Uma variedade de moléculas doadora de elétrons pode reagir rapidamente com o HRP-I e HRP-II. Para a HRP pode-se usar como mediadores de elétrons: fenóis, aminas aromáticas, ácido ascórbico, hexacianoferrato(II), iodeto, etc. [111, 112]. Podem ser usados mediadores de um ou dois elétrons. Os mediadores de um elétron usados para a redução bioeletrocatalítica de peróxidos com eletrodos modificados por peroxidase são ferrocenos [113], hexacianoferrato(II) [114], etc.. Nestes casos, os prótons necessários para reação da peroxidase são consumidos da solução similarmente como ocorre com transferência de elétrons direta. Os mediadores de dois elétrons não requerem prótons adicionais para o ciclo de reação da peroxidase.

#### *IV.1.3.4. Princípio da detecção de fenóis e biossensores desenvolvidos*

O mecanismo enzimático envolvido em biossensores a base de peroxidase para a detecção de fenóis, consiste na oxidação da molécula de enzima na presença de peróxido de hidrogênio, seguida da sua redução pelo composto fenólico. Esta última reação converte fenóis em quinonas e/ou radicais livres, que são eletroativos e podem ser reduzidos sobre a superfície do eletrodo. A corrente de redução é proporcional à concentração do composto fenólico na solução [91, 115]. Os fenóis atuam como mediadores de elétrons no sistema e baseado neste princípio, foram desenvolvidos biossensores para compostos fenólicos nos quais a enzima HRP foi imobilizada na superfície de um eletrodo de grafite [98, 115-117] ou em pasta de carbono [115].

Ruzgas e col. [115] demonstraram a possibilidade de utilizar os eletrodos de grafite sólida e de pasta de carbono modificados com HRP para a determinação de fenóis e compostos relacionados. Os autores observaram que os compostos fenólicos oxidados pela peroxidase na presença de peróxido podem ser eletroquimicamente reduzidos em eletrodos de grafite sólida e em pasta de carbono. Entretanto, a redução eletroquímica dos radicais na superfície da pasta não foi efetiva. Uma rápida redução eletroquímica dos radicais é muito importante para a obtenção de eletrodos estáveis e sensíveis. Nesse sentido, a adsorção de peroxidase sobre eletrodos de grafite sólida promoveu um melhor desempenho. Entre os 20 compostos fenólicos testados por estes autores, o biossensor a base de peroxidase apresentou uma maior sensibilidade para os compostos 2-amino-4-clorofenol ( $85 \text{ nA cm}^{-2} \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$ ) e 4-cloro-3-metilfenol ( $14 \text{ nA cm}^{-2} \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$ ).

O mecanismo de ação direta e mediada de um biossensor a base de HRP, foi também estudado por Ruzgas e col. [98], empregando compostos fenólicos tais como p-cresol, fenol e p-clorofenol. Os autores observaram que a transferência de elétrons direta entre a peroxidase e a grafite é um processo lento e reafirmaram a eficiência do processo mediado. Analisando a redução dos HRP-I e -II por ambos os mecanismos simultaneamente, os autores concluíram que as moléculas de HRP sobre a superfície de

grafite não estão igualmente envolvidas nos dois processos, e calcularam que somente 40 % das moléculas de HRP adsorvidas são capazes de participar na redução bioeletrocatalítica direta de  $H_2O_2$ .

Tem sido verificado que durante a determinação de compostos fenólicos, em análises em fluxo (FLA), com eletrodos modificados com HRP, uma fonte contínua de  $H_2O_2$  resulta em uma corrente de estado-estacionário devido à redução eletroquímica direta da peroxidase, aparecendo um pequeno pico sobre o topo da corrente de “background”, quando um composto fenólico é injetado, devido à redução mediada da peroxidase. Esse comportamento sugere que uma fração de moléculas de HRP está adsorvida ou ligada de uma forma que proporciona uma transferência de elétrons direta efetiva, enquanto que outras moléculas HRP estão mais distantes ou orientadas de modo que as tornem disponíveis apenas para a transferência de elétrons mediada [116, 117].

Na busca de eletrodos modificados com peroxidase, com maior sensibilidade e melhor limite de detecção, Lindgren e col. [116] estudaram diferentes técnicas de imobilização da enzima na superfície de grafite sólida, incluindo adsorção e ligação covalente. Neste estudo, os autores verificaram que os biossensores preparados com grafite previamente submetida a tratamento térmico, apresentaram um menor ruído e melhores limite de detecção e sensibilidade. O tratamento térmico ativa a superfície para redução bioeletroquímica direta de  $H_2O_2$  [56]. Quando os eletrodos foram preparados usando glutaraldeído, a detecção de  $H_2O_2$  foi mais efetiva do que a de fenol. A estabilidade dos eletrodos com a enzima acoplada covalentemente (com carbodiimida) foi igual a dos eletrodos com a enzima adsorvida. Independente do método de preparação, os eletrodos apresentaram inicialmente um rápido decréscimo na corrente de estado estacionário para  $H_2O_2$ , e a resposta para p-cresol foi aproximadamente constante por duas semanas.

Lindgren e col. [116] também investigaram a utilização de peroxidases de diferentes origens para a construção dos eletrodos para a detecção de compostos fenólicos. Foram utilizadas peroxidase de raiz forte (HRP), peroxidase de *Arthromyces*



*ramosus* (ARP), peroxidase de soja (SBP), cloroperoxidase de fungo *Caldariomyces* (ChlP), lactoperoxidase de leite de vaca (LP) e peroxidase de tabaco, *Nicotiana Sylvestris* (TOP). Foi observado que a relação entre a resposta para p-cresol e a corrente de estado estacionário para  $H_2O_2$  difere significativamente entre as diferentes peroxidases, o que indica diferenças na habilidade em receber elétrons das substâncias doadoras de elétrons. Estes biossensores mostraram resposta em fluxo para vários compostos fenólicos, entretanto o perfil de seletividade varia significativamente entre as peroxidases de diferentes origens biológica.

Munteanu e col. [117] usaram HRP, TOP e peroxidase de amendoim (PNP) na construção de eletrodos para a detecção de fenóis e aminas aromáticas. Foi verificado que a estrutura do substrato afeta a reatividade da enzima, indicando que peroxidases de origens diferentes apresentam diferenças significativas na sensibilidade. Os limites de detecção de  $10 \text{ nmol L}^{-1}$  para determinação de o-aminofenol e o- e p-fenilendiamina conseguidos com o eletrodo modificado com a peroxidase de tabaco, prometem progressos na aplicação destes biossensores para determinação de poluentes. Neste sentido, os esforços futuros estão sendo focados sobre arranjos de biossensores, usando diferentes peroxidases que possibilitem discriminar as estruturas dos diferentes poluentes.

A sensibilidade dos biossensores a base de peroxidase para a detecção de fenol é limitada pela corrente produzida pela transferência de elétrons direta entre a enzima e o eletrodo na presença apenas de peróxido [116, 117], sendo interessante uma diminuição neste processo para aumentar a sensibilidade do biossensor para fenol.

# ***OBJETIVOS***

УРАДИСЛО

## V. OBJETIVOS

A importância da determinação de fenol e seus derivados é reconhecida mundialmente. Deve ser considerado o interesse ambiental, alimentício e clínico, já que espécies fenólicas podem ter ações diferentes dependendo da sua concentração. Devido a complexidade das amostras e a baixa concentração dos analitos em análises ambiental e clínica, os biossensores se destacam como um sistema de detecção potencialmente sensível, seletivo, rápido e barato.

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um biossensor a base de peroxidase e sílica-titânio para detecção de fenol. Para isso, foram cumpridas as seguintes etapas:

Modificar a superfície da sílica gel com óxido de titânio, conforme procedimento descrito na literatura [118].

Imobilizar a enzima horseradish peroxidase (HRP) sobre a superfície da sílica gel modificada com óxido de titânio, utilizando glutaraldeído como reagente para formação de ligação covalente cruzada entre as moléculas de enzima.

Preparar uma pasta de carbono utilizando a ST com a enzima HRP imobilizada, grafite em pó e nujol.

Investigar o mecanismo de transferência de elétrons direta e mediada da peroxidase na superfície do biossensor construído, em solução contendo apenas peróxido e na presença de peróxido e fenol.

Avaliar as condições de melhor resposta resultante da transferência de elétrons mediada por fenol, para obter a curva analítica.

Testar a eficiência de diferentes substratos fenólicos, nessa configuração de biossensor desenvolvida.

Estudar a influência de aditivos na sensibilidade e estabilidade do biossensor desenvolvido.

Investigar a possibilidade de utilização deste biossensor para análise de fenol em amostras reais.

*PARTE  
EXPERIMENTAL*

VI  
OFC  
H  
DAN

## VI. PARTE EXPERIMENTAL

### VI.1. Reagentes

- Sílica gel Fluka (Suíça) com diâmetro médio de poros de 6 nm, área superficial específica de  $500 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$  e tamanho de partícula de 0,05-0,2 mm foi usada sem nenhum tratamento.

- Grafite em pó 99,9 % da BDH (Inglaterra) e óleo mineral (nujol) foram usados para preparar a pasta de carbono.

#### *Enzima*

- Horseradish peroxidase, HRP (E.C. 1.11.1.7), adquirida da Boehringer Mannheim GmbH (Alemanha), 2500 U/98 mg liofilizada, foi gentilmente fornecida pelo Prof. Lo Gorton da Universidade de Lund. Foi preparada uma solução aquosa  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  e esta foi estocada em geladeira.

#### *Reagente de imobilização*

- Glutaraldeído 50 % (m/v), foi adquirido da Sigma (EUA). Solução de glutaraldeído 5 % (v/v) foi preparada e mantida na geladeira.

#### *Substratos da enzima*

- Peróxido de hidrogênio 30 %, foi adquirido da Synth (Brasil). Uma solução estoque  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada e estocada em geladeira, e a partir desta foram feitas diluições diárias para obter as concentrações desejadas. A solução estoque não foi estocada por longos períodos.

- Compostos fenólicos: Fenol 99 % e resorcinol 99 % foram adquiridos da Synth (Brasil). Catecol 99 % foi adquirido da Adrich (EUA). Hidroquinona 99 %, 2-amino-4-clorofenol 98 % e 4-cloro-3-metilfenol 99 % foram adquiridos da Merck (Alemanha).

Vanilina 99 % foi adquirida da Fluka (Suíça). P-cresol 98 % e 4-clorofenol 99 % foram adquiridos da Carlo Erba (Milão).

#### *Aditivos/estabilizadores*

- Albumina de soro bovino (BSA), DNA (D1626 de testículos de salmão) e polietilenoimina (PEI) foram adquiridos da Sigma (EUA).

#### *Tampões*

- Tris-hidroximetil-aminometano (Tris) e ácido 1,4-piperazina-dietano sulfônico (Pipes) foram adquiridos da Sigma (EUA). Fosfato de sódio foi adquirido da Synth (Brasil). O pH foi ajustado com o auxílio de um eletrodo de vidro combinado e um pHmetro da Corning. Todas as soluções foram preparadas com água purificada em sistema Milli-Q.

## **VI.2. Preparação da Sílica-Titânio (ST)**

A superfície da sílica gel foi modificada com óxido de titânio conforme o procedimento descrito por Kubota e col. [118], seguindo-se as etapas apresentadas no fluxograma mostrado na Figura VI.1. A reação de modificação ocorre através dos grupos silanóis da superfície da sílica, previamente ativada a 150° C, com tetracloreto de titânio em meio de tetracloreto de carbono sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, o material seco foi cuidadosamente hidrolisado para remover os íons cloreto, e seco a 150° C em estufa.

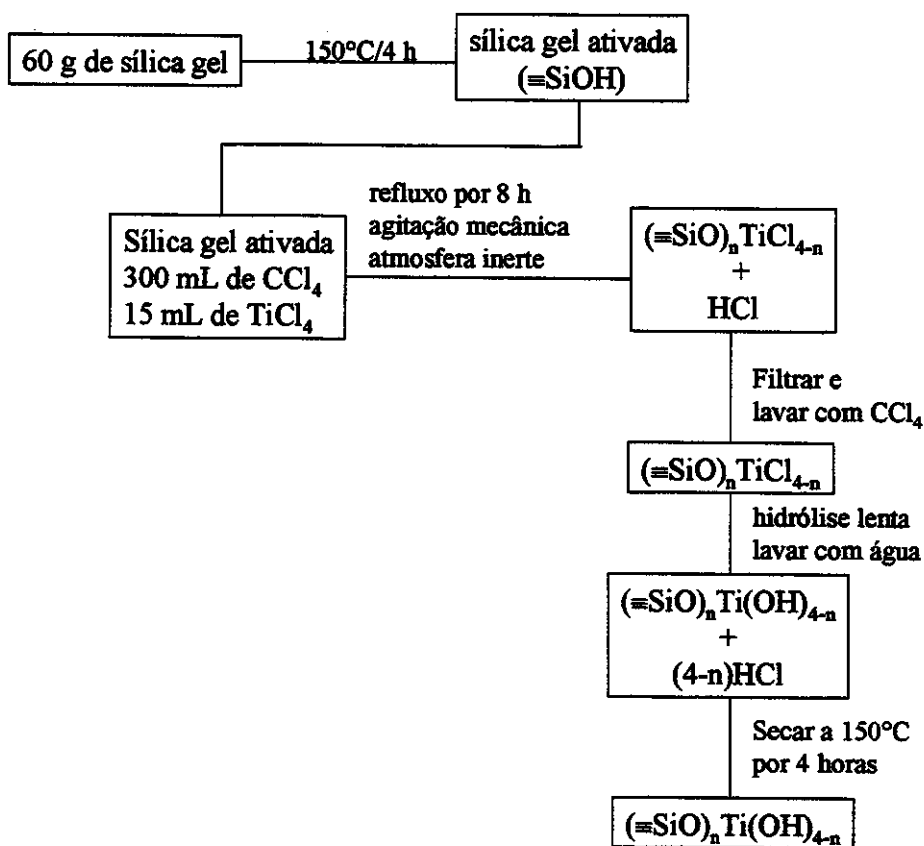


Figura VI.1. Fluxograma do procedimento seguido para a reação de modificação da superfície da sílica gel.

### VI.3. Imobilização da enzima

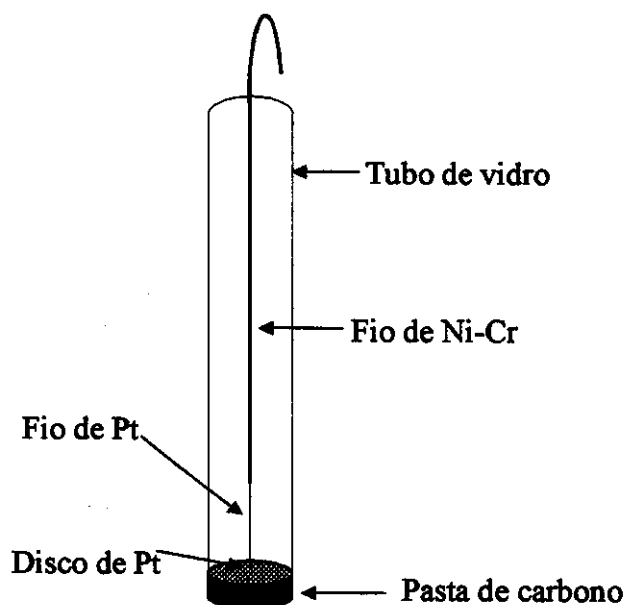
A enzima HRP foi imobilizada sobre a superfície da sílica gel modificada por adsorção, usando glutaraldeído 5 % (v/v) para formação de ligação cruzada. Inicialmente, para uma quantidade de 25 mg de ST, foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de solução de HRP 1  $\text{mg mL}^{-1}$  e 5  $\mu\text{L}$  de glutaraldeído. Essa mistura foi agitada mecanicamente por 30 min e seca em um dessecador à temperatura ambiente.

Entretanto, uma alteração na ordem de adição dos reagentes que consistiu em primeiramente ativar a superfície da sílica-titânio com glutaraldeído e tampão fosfato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  pH 6,8, secar e depois adicionar a solução de enzima, garantiu melhor

reprodutibilidade ao método de imobilização, que foi verificado pela confecção e desempenho dos biossensores. Essa observação experimental comprova que não existe um roteiro estabelecido sobre qual o melhor procedimento a ser seguido no método de imobilização de enzima com glutaraldeído, como foi descrito no capítulo II.2.4.

#### VI.4. Preparação do eletrodo de pasta de carbono

Para preparar a pasta de carbono modificada adicionou-se 25 mg de grafite em pó à 25 mg de sílica-titânio com a enzima imobilizada, e gotas de óleo mineral misturando-se bem até obter uma pasta homogênea. Esta pasta foi colocada em uma cavidade na extremidade de um tubo de vidro (4 mm de diâmetro interno) com uma profundidade de 1 mm e pressionada para conseguir uma superfície lisa. O formato do eletrodo, representado na Figura VI.2 garantiu melhor reprodutibilidade na quantidade de pasta usada para os diferentes estudos.

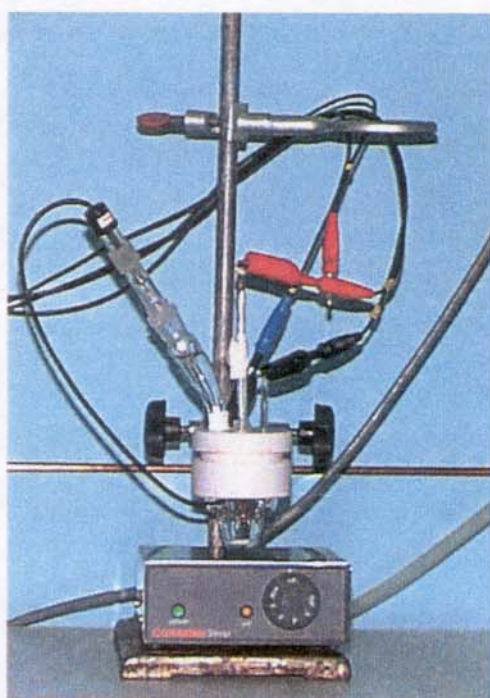


**Figura VI.2.** Esquema do eletrodo de pasta de carbono modificado com ST-HRP.

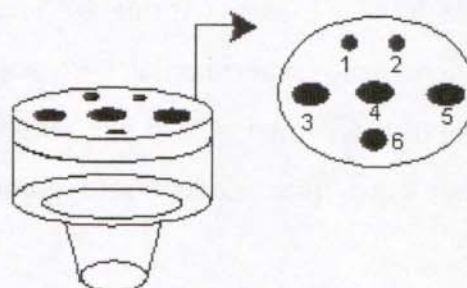


### VI.5. Célula eletroquímica e instrumentação

As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula de três eletrodos típica usando um eletrodo de pasta de carbono modificado como trabalho, espiral de platina como auxiliar e eletrodo de calomelano saturado como referência como mostra a Figura VI.3A. A Figura VI.3B mostra a disposição dos eletrodos na célula. As medidas foram feitas em potenciostato da PAR modelo 273A e da AUTOLAB® modelo PGSTAT20 (*EcoChemie*) interfaceado a um microcomputador para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados.



A



B

**Figura VI.3.** (A) Fotografia da célula eletroquímica utilizada para realizar os experimentos. (B) Esquema da célula cuja tampa contém os orifícios para entrada (1) e saída (2) de gás e para adaptação do eletrodo de referência, ECS (3), do eletrodo de trabalho: biossensor (4), eletrodo auxiliar, espiral de Pt (5) e injeção do substrato (6).

## **VI.6. Procedimento experimental para otimização do desempenho do biossensor para a determinação de fenol.**

Após a imobilização da enzima peroxidase sobre a superfície de ST, foi preparada a pasta de carbono e esta colocada na cavidade do corpo do eletrodo, pressionando para obter uma superfície lisa. Duas etapas fundamentais na construção do biossensor desenvolvido foram a etapa de imobilização de HRP sobre ST e a preparação da pasta. No caso da imobilização da enzima, foi observado que a ordem de adição da solução de glutaraldeído, antes em vez de juntamente com a solução de enzima, sobre ST, tem uma influência no resultado final, que foi verificada através da facilidade em preparar e reproduzir a pasta de carbono modificada com esse material. A preparação da pasta de carbono é conhecida como uma etapa crítica influenciando a resposta do eletrodo. Uma condição adotada para o preparo do biossensor a base de pasta de carbono foi usar uma quantidade (não medida) de nujol suficiente para misturar ST-HRP e a grafite em pó formando uma pasta de boa liga. Dessa forma foi necessária uma adaptação inicial que envolveu muita percepção experimental para acertar a quantidade de nujol adequada, sendo que quantidades menores desse reagente resultam em um aumento de ruído do sistema e uma quantidade muito grande dificulta a reação na interface eletrodo-solução.

Os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar foram posicionados na célula eletroquímica contendo 5 mL de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,8 e o comportamento do sistema foi estudado através de técnicas eletroquímicas como voltametria de varredura linear e principalmente cronoamperometria. Alguns fatores como a concentração de peróxido de hidrogênio, pH e composição da solução tampão, bem como o potencial aplicado e quantidade de enzima, influenciam na resposta do biossensor e foram por isso investigadas as melhores condições de resposta para fenol.

Com as melhores condições estabelecidas, a próxima etapa de caracterização da resposta do biossensor foi a obtenção da curva de calibração, a qual fornece informações tais como: sensibilidade, intervalo de resposta linear, limite de detecção e tempo de resposta [119]. A calibração do biossensor foi feita pela adição de soluções padrão de analito e medindo-se a resposta de corrente de estado estacionário. Cada experimento iniciou com o registro da corrente em função do tempo, num dado potencial aplicado, na presença apenas de tampão até esta alcançar um valor constante. Esta corrente foi chamada de corrente de fundo,  $I_f$ , ou corrente capacitiva do sistema. Nesse ponto, o substrato foi adicionado e com o auxílio de um agitador magnético fez-se a homogeneização da solução por 10 s (essa etapa com o aparelho aplicando potencial sem registrar a corrente), e após esse tempo registrou-se a variação de corrente em função do tempo. O peróxido de hidrogênio, substrato específico da peroxidase, pode ser adicionado em uma etapa separada à do analito fenol, ou simultaneamente com este. Para facilidade operacional, na maioria dos experimentos, foram utilizadas soluções de fenol e peróxido de hidrogênio preparadas numa relação adequada.

As respostas foram calculadas comparando-se cada corrente de estado estacionário com a corrente de fundo na ausência de substrato ou com a corrente de estado estacionário correspondente à adição prévia como mostra a Figura VI.4. Foram feitas adições sucessivas de substrato, sendo que cada adição corresponde a uma concentração de fenol de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , que fornece um valor de  $\Delta j$ . Dessa forma, somado-se as variações em densidade de corrente para as demais adições, foram construídos os gráficos de  $\Delta I$  vs  $C$ .

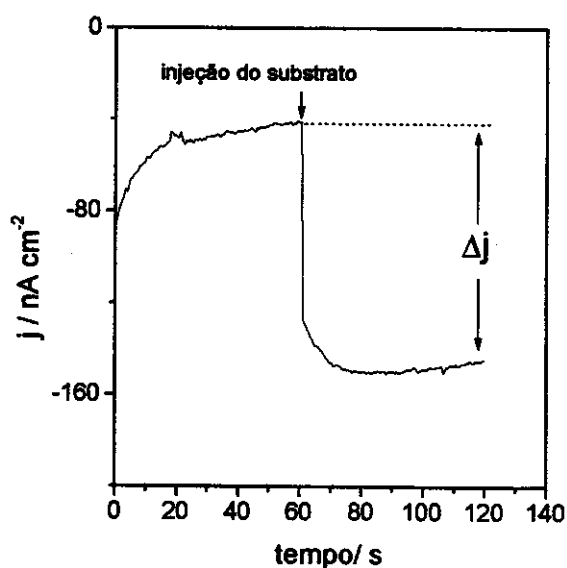


Figura VI.4. Exemplo de um cronoamperograma e como foram calculadas as respostas do biossensor.

### VI.7. Resposta para diferentes substratos fenólicos

A resposta para diferentes substratos fenólicos foi investigada para adições sucessivas de 50  $\mu\text{L}$  de uma solução 1  $\text{mmol L}^{-1}$  de um dado substrato (composto fenólico). Para evitar influência de um substrato na resposta de outro devido à possibilidade de adsorção de compostos fenólicos na superfície da pasta, e também devido à concentração de saturação ser diferente para cada composto, foi trocada a solução e a pasta após o teste de cada composto. Com esse tipo de experimento pode-se prever o comportamento do biossensor no que diz respeito à seletividade para fins de aplicação do biossensor em análise de amostras reais.

### **VI.8. Efeito de aditivos na pasta**

Os seguintes aditivos foram incorporados na pasta de carbono: albumina de soro bovino (BSA) e Polietilenoimina (PEI) dissolvidos em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,8 e DNA dissolvido em tampão acetato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,7. Para essas preparações procedeu-se da maneira descrita para o caso da pasta sem aditivos exceto que no momento da adição da enzima foi acrescentado também uma solução de um dado aditivo de forma que a sua quantidade na pasta fosse 0,1 mg. O eletrodo contendo PEI foi preparado sem a adição prévia de glutaraldeído, pois este procedimento resultou em um aumento de ruído do sistema e do tempo de resposta do biossensor.

Para avaliar o efeito dos aditivos na sensibilidade do biossensor para fenol foram obtidas as curvas analíticas para as diferentes preparações, em tampão fosfato pH 6,8 em um  $E_{\text{apl}} = 0 \text{ mV vs ECS}$ . A estabilidade dos biossensores foi avaliada a partir da variação da resposta para uma concentração fixa de fenol em função do número de determinações com o mesmo biossensor.

### **VI.9. Aplicação em amostras reais**

Foram realizados alguns testes para verificar a possibilidade de aplicação do biossensor em amostras reais. Duas amostras foram analisadas, sendo uma delas oriunda de indústria papeleira e a outra de uma indústria química. As duas amostras não necessitaram de tratamento prévio, e apenas no caso da amostra oriunda de indústria de papel, o pH foi ajustado para 7. A quantidade de fenol nas amostras foi calculada em relação à resposta do biossensor para soluções de concentração conhecida de fenol. A resposta obtida com o biossensor foi comparada à obtida por um método espectrofotométrico.

O método espectrofotométrico utilizado [120] consiste em adicionar 250  $\mu\text{L}$  de solução carbonato-tartarato (200 g de carbonato de sódio, 12 g de taratarato de sódio dihidratado, diluído a 1000 mL) e 25  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu (ácidos tungstofosfórico e molibdofosfórico) em 1 mL de amostra. Deixar a solução em repouso por 30 minutos a 20 °C e ler a absorbância a 700 nm. Os grupos hidroxilas aromáticos reagem com o reagente de Folin formando uma cor azul adequada para estimar suas concentrações. Esta metodologia para a determinação de fenóis totais tem sido aplicada em estudos sobre degradação de efluente papelheiro [121].

Além das duas amostras de efluentes, também foi testada a aplicação do biossensor para 5 amostras de águas de rios da região de Cubatão que foram fornecidas pela CETESB. As amostras ( $\text{pH}\approx 2$ ) foram neutralizadas com solução de NaOH. O método espectrofotométrico adotado por esse órgão de fiscalização para análise de fenol é baseado no uso do reagente 4-aminoantipirina [122]. Os fenóis reagem com 4-aminoantipirina em pH 8 na presença de ferricianeto de potássio formando um corante amarelo claro. Quando este corante é mantido em solução aquosa, a absorbância é medida a 500 nm, e para uma maior sensibilidade, o corante formado pode ser extraído com clorofórmio e a absorbância é medida a 460 nm.

***RESULTADOS  
E  
DISCUSSÃO***

УДК 62-73  
VII

## VII. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### VII.1. Características do material

Um fator chave na construção de um biossensor é o desenvolvimento de tecnologias de imobilização para estabilizar biomoléculas e fixá-las sobre superfícies e, a seleção do material usado como suporte na imobilização influi no resultado final [16]. Sílica é um material inorgânico, “não tóxico”, rígido, com uma alta área superficial, e pode ser usada como matriz para imobilização de enzima, podendo aumentar a estabilidade (de estocagem) que é uma característica desejável para aplicações de enzimas imobilizadas, como por exemplo, na construção de biossensores amperométricos. Entretanto, tem sido demonstrado que a imobilização em sílica gel aumenta a estabilidade de glicose oxidase, enquanto que procedimento idêntico causa perda de atividade para lactato oxidase e glicolato oxidase. Contudo, quando as duas últimas enzimas são co-imobilizadas na sílica gel com polímeros contracarregados que formam adutos eletrostáticos com as enzimas, a estabilidade dessas enzimas também aumenta [123, 124].

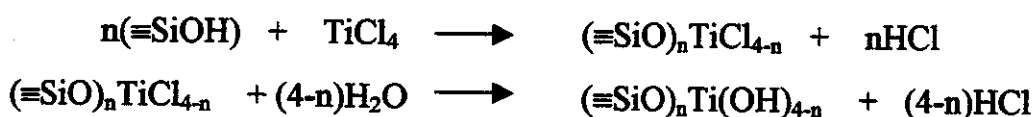
Kennedy e Cabral [125, 126] descreveram sobre as vantagens de imobilizar enzimas sobre várias matrizes cobertas por óxido de metal de transição hidratado. Kennedy e Kay [127] foram os primeiros a utilizar óxido de titânio hidratado como uma matriz suporte para imobilização de enzimas. A enzima HRP foi imobilizada sobre o composto óxido de titânio (IV)/celulose e os autores observaram que a atividade da enzima imobilizada diminuiu, provavelmente devido à sua interação com a superfície de óxido, porém é mantida por cerca de dois meses, mostrando uma pequena diminuição em atividade nos primeiros dias e então permanece em um nível constante [128].

Sílica modificada com óxido de titânio é um material bem conhecido por sua estabilidade térmica e química em meio neutro e ácido [79]. As características gerais da sílica gel tais como porosidade, área superficial, tamanho de poro e partícula, não



são afetadas de forma significativa pela imobilização do óxido de titânio [118]. O óxido de titânio oferece uma boa possibilidade para imobilizar enzimas devido a sua afinidade pelos grupos carboxílicos dos resíduos de aminoácidos terminais das moléculas de enzima [128]. Muitos trabalhos têm usado sílica-titânio para incorporação de espécies mediadoras de elétrons e construção de eletrodos de pasta de carbono modificados com este material, que tem sido aplicado em eletrocatalise [83,129] e no desenvolvimento de biossensores [84-86].

Neste trabalho foi seguido o procedimento descrito na literatura para a preparação da sílica-titânio [118]. O processo de modificação da superfície da sílica gel pode ser representado pelas seguintes equações [79]:



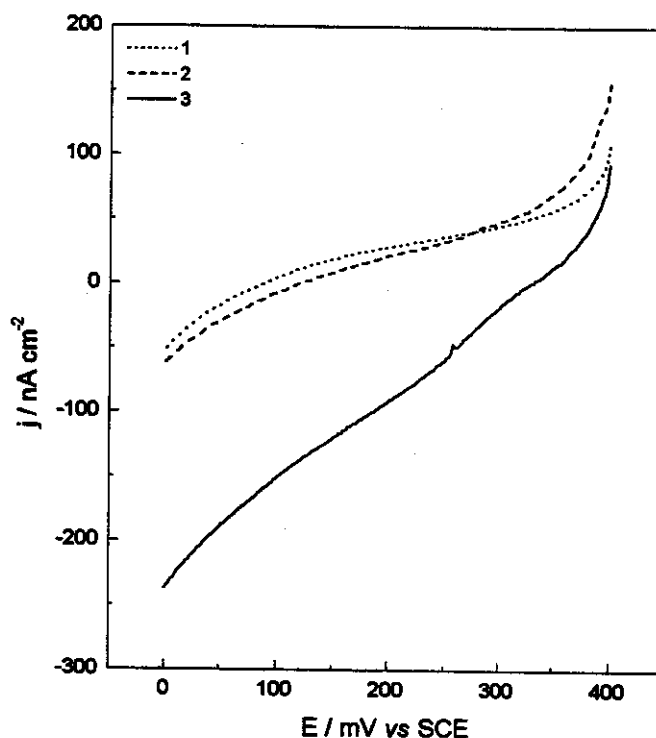
onde  $(\equiv\text{SiOH})$  representa o grupo silanol e a sílica modificada,  $(\equiv\text{SiO})_n\text{Ti}(\text{OH})_{4-n}$ , será denominada como ST. Este método de preparação é bastante eficiente e reprodutível. Como a caracterização desse material já foi investigada [118, 130], foi efetuada apenas a determinação da quantidade de titânio (IV) enxertado sobre a superfície da sílica gel, e o resultado obtido por fluorescência de raios-X foi de  $1,2 \text{ mmol g}^{-1}$ . A sílica modificada com óxido de titânio obtida por esse método de preparação deve ser branca, sendo que uma coloração escura do material resultante indica algum problema no processo de síntese.

A imobilização de HRP sobre ST por adsorção foi muito simples e provavelmente ocorre através do grupo carboxílico da enzima e o óxido de titânio enxertado sobre a superfície da sílica de maneira similar ao descrito por Kennedy e colaboradores [125-127]. O glutaraldeído foi utilizado para fixar a enzima através de ligações intermoleculares [45-47], conforme a reação esquematizada na Figura II.1. ST contendo a enzima imobilizada foi então misturada com grafite e nujol obtendo-se assim a pasta de carbono modificada.

## VII. 2. Mecanismo de transferência de elétrons da HRP na superfície ST

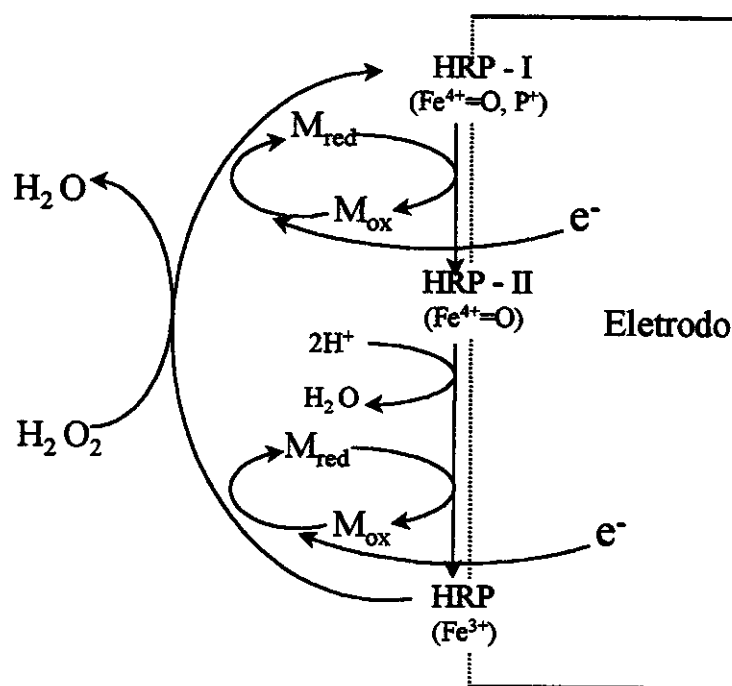
Como descrito no capítulo IV, o mecanismo de transferência de elétrons da peroxidase imobilizada em um eletrodo vai depender do material de eletrodo e da presença de um doador de elétrons na solução (ou imobilizado), além do peróxido de hidrogênio que é o substrato da enzima peroxidase. Sendo assim, os estudos com o biossensor desenvolvido iniciaram com a investigação da ação de HRP sobre a superfície ST/pasta de carbono, utilizando fenol como substância doadora de elétrons.

A Figura VII.1 mostra os voltamogramas de varredura linear do eletrodo de pasta de carbono ST-HRP obtidos em solução tampão fosfato contendo apenas peróxido e peróxido mais fenol. Pode-se observar que na solução contendo apenas o peróxido de hidrogênio, a corrente devido a redução bioeletrocatalítica direta de  $H_2O_2$  normalmente observada em eletrodos de grafite modificados com peroxidase, foi bloqueada na superfície de ST-HRP (curva 2). A transferência de elétrons direta é bloqueada provavelmente devido ao caráter isolante da matriz onde a enzima está imobilizada. Este comportamento é muito interessante para aumentar a sensibilidade do biossensor para a detecção de fenol, o que pode ser verificado pela alta corrente obtida na solução contendo peróxido e fenol (curva 3). Esta corrente é devido a redução dos radicais fenólicos formados na reação do fenol com os compostos intermediários da HRP oxidados.



**Figura VII.1.** Voltamogramas de varredura linear obtidos para o eletrodo de pasta de carbono ST-HRP (1) em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,8, (2) na presença de  $35 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio, (3)  $35 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio e  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de fenol.  $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$ .

O mecanismo de transferência de elétrons mediada pelo fenol na superfície do biossensor ST-HRP está esquematizado na Figura VII.2. Segundo este mecanismo, os radicais fenólicos produzidos no ciclo de reação da peroxidase (reações IV1a-IV1c, capítulo IV.1.2) podem ser eletroquimicamente reduzidos de volta a sua forma inicial na superfície do eletrodo. Neste caso, a corrente de redução é proporcional à concentração de fenol na solução.



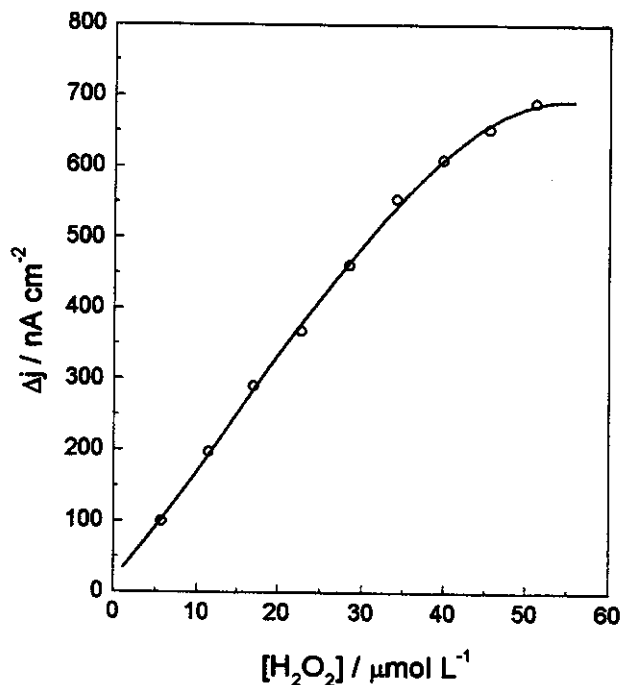
**Figura VII.2.** Mecanismo da transferência de elétrons mediada no eletrodo de pasta de carbono ST-HRP.  $M_{ox}$  e  $M_{red}$  são as formas oxidada e reduzida do mediador, respectivamente.  $P^+$  é um cátion radical porfirínico.

### VII.3. Otimização da resposta do biossensor para fenol

#### VII.3.1. Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio

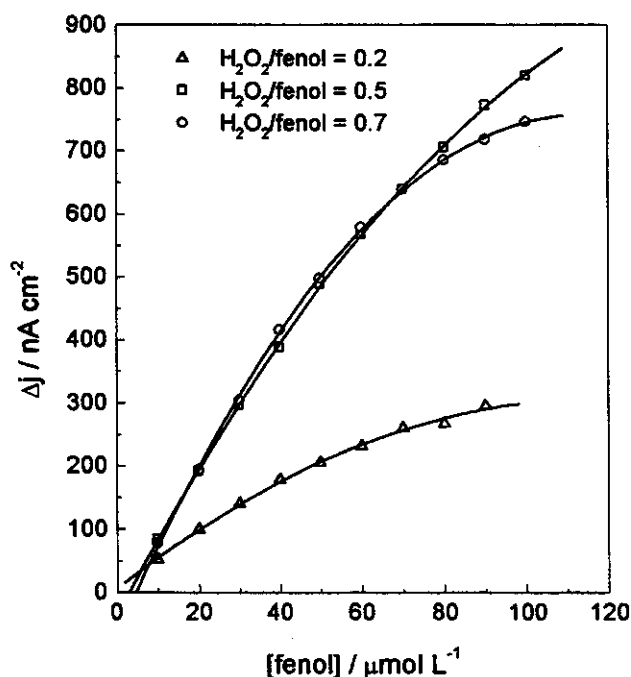
A concentração de peróxido é muito importante neste caso para conseguir uma boa sensibilidade e impedir a formação de enzima inativa devido a uma alta concentração deste reagente [99]. A Figura VII.3 mostra a dependência da concentração de peróxido de hidrogênio na resposta do eletrodo para uma quantidade fixa de fenol. Pode-se observar um aumento na corrente do eletrodo à medida que o peróxido é adicionado até uma razão entre peróxido de hidrogênio e fenol de 0,35. Para

uma relação maior que este valor a curva começa a desviar da linearidade indicando que o efeito de peróxido de hidrogênio é minimizado.



**Figura VII.3.** Influência da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre a resposta do biossensor para fenol, obtida em solução tampão fosfato pH 6,8 contendo 100 μmol L<sup>-1</sup> de fenol. E<sub>apl</sub> = 0 mV vs ECS.

O efeito da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi comprovado pelos resultados apresentados na Figura VII.4, em que as curvas de calibração para fenol, quando obtidas na razão de 0,2 entre peróxido de hidrogênio e fenol, apresentaram sensibilidade menor comparada às curvas obtidas quando essa razão foi 0,5 e 0,7. Assim, a razão mínima entre peróxido de hidrogênio e fenol foi fixada como 0,5 para garantir uma concentração de peróxido de hidrogênio suficiente para conseguir bons resultados sem proporcionar a formação de enzima inativa.



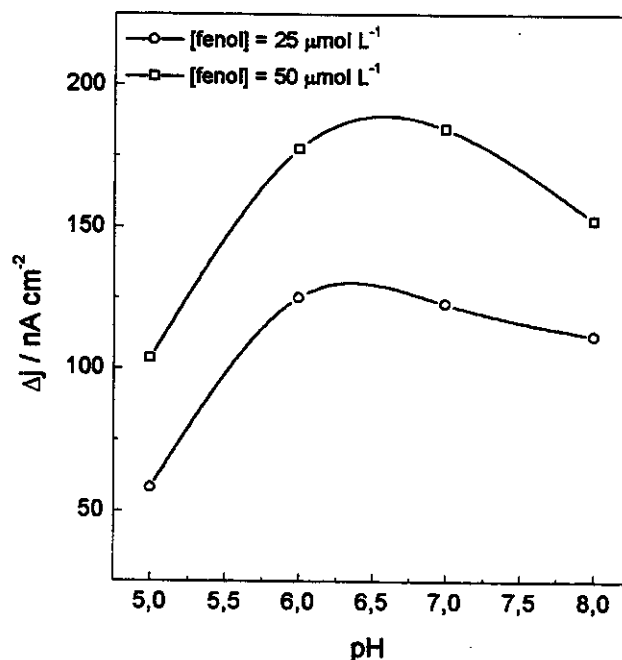
**Figura VII.4.** Dependência da resposta do biossensor obtida em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,8 na presença de diferentes razões entre peróxido de hidrogênio e fenol, com  $E_{\text{apl}} = 0 \text{ mV vs ECS}$ .

### VII.3.2. Efeito do pH da solução tampão

As cargas dos grupos amino e carboxílico das enzimas variam com o pH. Consequentemente, a habilidade catalítica das enzimas depende do pH e da presença de íons, pois a carga afeta a conformação da enzima e sua interação eletrostática com substratos. Segundo a literatura [91] a dependência do pH dos eletrodos modificados com peroxidase pode ser distinta para diferentes mediadores como também para concentrações de peróxido na solução. Em geral, os biossensores a base de peroxidase para a detecção de fenol utilizam tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7 [98, 115- 117].

O efeito do pH da solução sobre a resposta do biossensor para fenol é mostrado na Figura VII.5. Pode-se observar claramente que para pH maior que 7 e menor que 6 a

resposta diminui. Este intervalo ótimo de pH da solução é muito similar ao observado para a enzima solúvel [90]. Assim o pH da solução usado nos experimentos foi 6,8.



**Figura VII.5.** Dependência da resposta do biossensor para fenol em função do pH da solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>.  $E_{\text{apl}} = 0 \text{ mV vs ECS}$  e  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

### VII.3.3. Influência da solução tampão

Muitos dos artigos sobre eletrodos modificados com HRP usam o tampão fosfato [98, 115-117], mas não explicam a razão desta escolha, por isso as medidas eletroquímicas foram realizadas em solução tampão Fosfato, Tris e Pipes com o mesmo pH e concentração, para avaliar o efeito da solução tampão na resposta do biossensor. A Tabela VII.1 mostra as respostas obtidas para fenol usando os diferentes tampões e, o melhor resultado foi obtido em tampão fosfato. Este comportamento pode ser devido à interação entre os íons fosfato e o ferro do grupo heme da enzima e/ou a melhor facilidade dos íons fosfatos difundirem através do eletrodo de pasta de carbono, em comparação com os ânions dos outros dois tampões investigados.

**Tabela VII.1.** Efeito da solução tampão sobre a resposta do biossensor obtido em um potencial aplicado de 0 mV vs ECS e concentração de fenol de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A concentração da solução tampão foi 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  e pH 6,8, contendo 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Tampão	Pipes	Tris	Fosfato
$\Delta j$ ( $\text{nA cm}^{-2}$ )*	83,2 $\pm$ 0,6	116,8 $\pm$ 0,9	169 $\pm$ 1

\* Estimativa do desvio padrão calculado por propagação de erros

#### VII.3.4. Efeito do potencial aplicado

O potencial aplicado tem um grande efeito sobre a resposta do biossensor como pode ser visto na Tabela VII.2. A resposta aumenta na seguinte ordem:  $E_{\text{apl.}} = 100 < 50 \cong 0 \cong -50 < -100$  mV vs ECS. Entretanto, tem sido observada uma lenta desativação irreversível de HRP adsorvida em potenciais mais negativos. Esta pode estar relacionada com o tempo que o potencial foi aplicado e pode ser causada pela formação de um estado inativo de HRP [56]. É conhecido que HRP pode se transformar em uma forma enzimaticamente inativa, HRP-III (+ VI), por exemplo, por redução de HRP (+3) a (+2) seguida por oxidação pelo oxigênio molecular ou por altas concentrações de peróxido [99]. Por isso, mesmo com a resposta do biossensor aumentando quando o potencial aplicado desloca para valores mais negativos, o potencial foi fixado em 0 mV porque foi observada uma pequena variação de corrente no intervalo entre 50 e -50 mV.

Em 250 mV vs ECS, a razão entre sinal e ruído (26 para 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de fenol) é maior que aquela observada em 0 mV (17 para as mesmas condições), o que em termos de sensibilidade do biossensor para fenol, seria melhor nesse potencial. A corrente medida não teria nenhuma contribuição devido à transferência de elétrons direta da peroxidase. Entretanto, o potencial foi fixado em 0 mV para evitar a interferência de vários compostos como ácido ascórbico, ácido úrico e NADH, embora



a interferência de peróxido seja minimizada em 250 mV. Além disto, alguns compostos fenólicos que atuam como substratos tais como catecol, hidroquinona e resorcinol apresentam uma corrente de oxidação significativa dependendo de suas concentrações, que pode causar problemas de interferência.

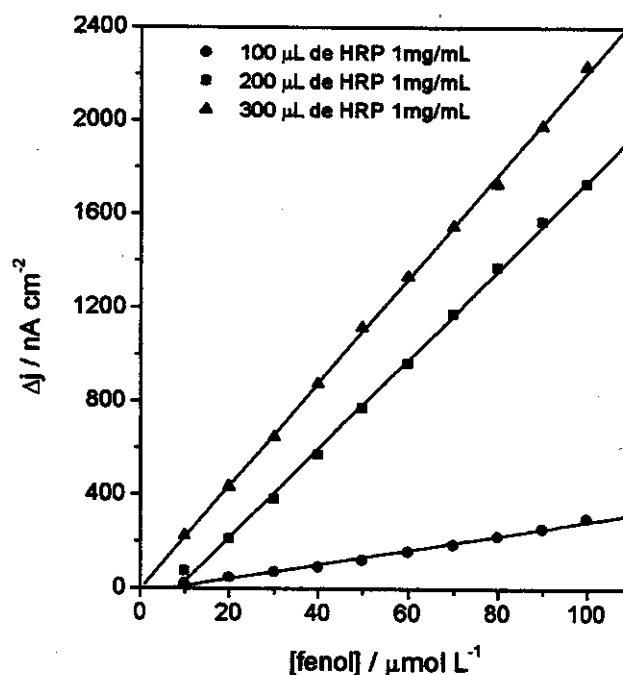
**Tabela VII.2.** Influência do potencial aplicado sobre a resposta do biossensor obtida em solução tampão fosfato, pH 6,8, com 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de fenol.

$E_{\text{apl}}$ (mV vs ECS)	$\Delta j$ (nA $\text{cm}^{-2}$ )*
-100	192 $\pm$ 1
-50	118,4 $\pm$ 0,9
0	100,9 $\pm$ 0,8
50	90,5 $\pm$ 0,7
100	61,8 $\pm$ 0,5

\* Estimativa do desvio padrão calculado por propagação de erros

### VII.3.5. Quantidade de enzima na pasta

A quantidade de enzima utilizada para construir o biossensor deve ser suficiente para garantir a reação com o substrato, mas uma alta quantidade desse reagente pode causar limitações difusionais diminuindo a resposta do biossensor. A Figura VII.6 apresenta as curvas de calibração obtidas com os biossensores construídos com diferentes quantidades de solução de HRP 1mg/mL. Pode-se observar que a resposta do biossensor aumenta à medida que aumenta a quantidade de enzima, porém como uma quantidade maior que 200  $\mu\text{L}$  não causou uma grande alteração na sensibilidade do biossensor, Tabela VII.3, optou-se por essa quantidade de enzima para preparar um biossensor com boa sensibilidade.



**Figura VII.6.** Efeito da quantidade de enzima HRP na resposta do biossensor para fenol.  $E_{\text{apl}} = 0 \text{ mV vs ECS}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{fenol} = 0,7$ .

**Tabela VII.3.** Sensibilidade do biossensor para fenol em função da quantidade de enzima.  $E_{\text{apl}} = 0 \text{ mV vs ECS}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{fenol} = 0,7$ .

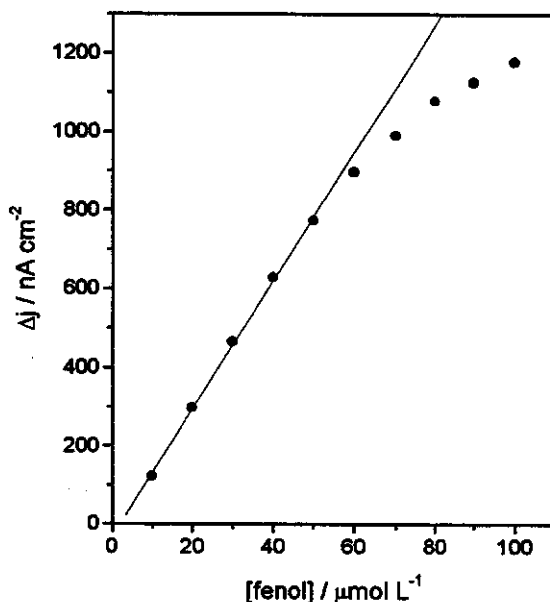
Solução de HRP (1mg/mL)	Sensibilidade ( $\text{nA cm}^{-2} \mu\text{mol}^{-1} \text{L}$ )
100 $\mu\text{L}$	$3,00 \pm 0,02$
200 $\mu\text{L}$	$19,0 \pm 0,1$
300 $\mu\text{L}$	$22,1 \pm 0,2$

\* Estimativa do desvio padrão calculado por propagação de erros

### VII.3.6. Curva analítica para fenol

A curva analítica obtida para fenol, Figura VII.7, com o biossensor desenvolvido aplicando um potencial de 0 mV vs ECS em solução tampão fosfato

0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7 mostrou um intervalo de resposta linear entre 10 e 50 μmol L<sup>-1</sup> de fenol ajustado pela equação  $j = -32,8(\pm 0,5) + 16,3(\pm 0,2) [\text{fenol}]$  com um coeficiente de correlação de 0,9995 para n=5, onde a densidade de corrente  $j$  é dada em nA cm<sup>-2</sup> e a concentração de fenol em μmol L<sup>-1</sup>, com uma concentração fixa de 40 μmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O desvio da linearidade observado para concentração de fenol maior que 50 μmol L<sup>-1</sup> foi atribuído à saturação dos sítios ativos da enzima imobilizada sobre a superfície da sílica gel modificada usada na construção do biossensor, e também está relacionado com a variação na relação entre peróxido de hidrogênio e fenol. O limite de detecção, calculado como 3 vezes o ruído, foi 1,5 μmol L<sup>-1</sup>, enquanto que o limite operacional foi 5 μmol L<sup>-1</sup>. A estimativa do desvio padrão relativo das medidas foi 3,3 % para 10 μmol L<sup>-1</sup> de fenol. Em comparação com um biossensor para fenol descrito na literatura [115], o biossensor desenvolvido apresentou um maior intervalo linear de resposta. Além disto, este foi pelo menos treze vezes mais sensível para fenol em relação ao resultado obtido com eletrodos sólidos [115].

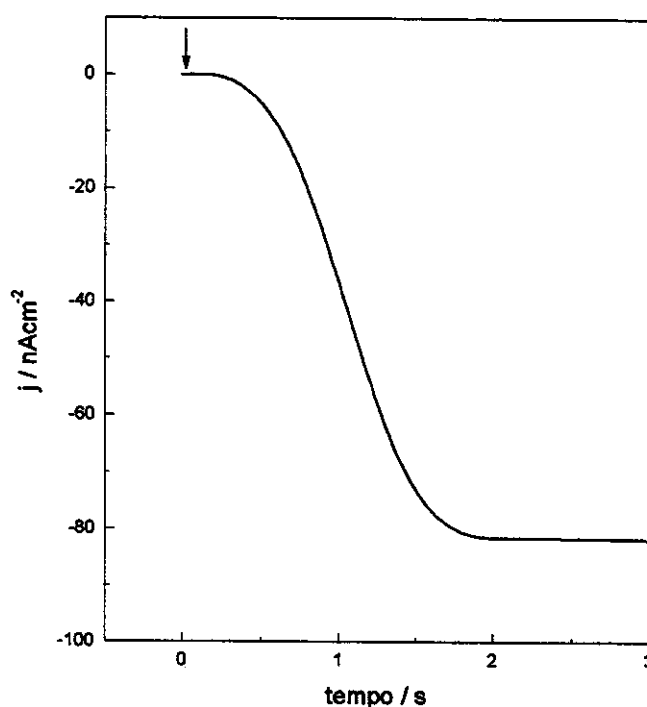


**Figura VII.7.** Curva analítica obtida para fenol usando o biossensor desenvolvido aplicando um potencial de 0 mV vs ECS em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,8 com uma concentração fixa de peróxido de 40 μmol L<sup>-1</sup>.

### VII.3.7. Tempo de resposta

A resposta para este biossensor foi rápida, alcançando 95% de sua resposta máxima em cerca de 1,5 s como pode ser verificado na Figura VII.8. Este tempo de resposta é muito curto considerando que o eletrodo seja a base de pasta de carbono. Uma condição para o biossensor responder é que haja difusão da solução através da pasta, sendo que esta etapa influi no tempo de resposta do biossensor.

Provavelmente a forma e o procedimento usado para construir o biossensor a base de pasta de carbono ST-HRP, resulte num sistema bem empacotado, tornando difícil a solução difundir profundamente através da pasta, e isso pode contribuir para uma resposta rápida.



**Figura VII.8.** Tempo de resposta obtido para o biossensor em um potencial aplicado de 0 mV vs ECS,  $[H_2O_2] = 5 \mu mol L^{-1}$  e  $[fenol] = 10 \mu mol L^{-1}$ .

### VII.3.8. Efeito de diferentes substratos fenólicos

A enzima HRP é altamente específica para peróxido de hidrogênio, mas exibe uma especificidade relativamente baixa para doadores de elétrons, e vários compostos fenólicos podem ser determinados [115-117]. A resposta relativa obtida para diferentes compostos fenólicos com o biossensor desenvolvido encontra-se na Figura VII.9. As melhores respostas foram observadas para 2-amino-4-clorofenol e catecol, seguida por hidroquinona, 4-clorofenol e então fenol. Este comportamento sugere que o biossensor deve ser 5 vezes mais sensível para catecol em relação ao fenol.

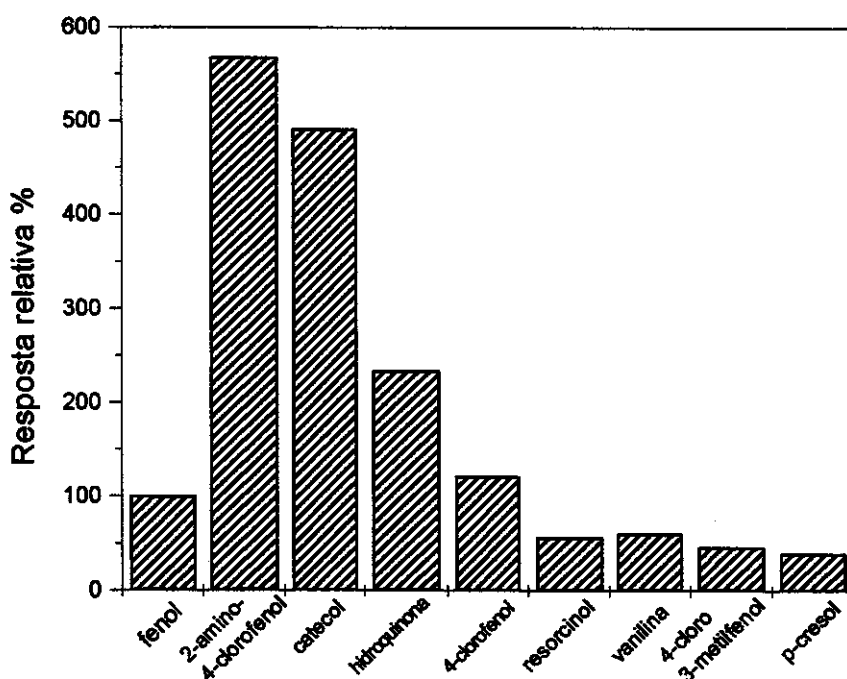


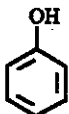
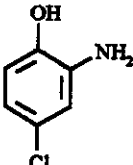
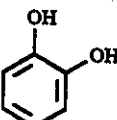

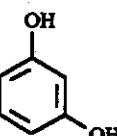
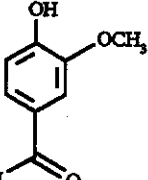
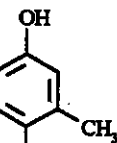
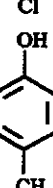
Figura VII.9. Resposta relativa obtida para  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de diferentes substratos em um potencial aplicado de 0 mV vs ECS,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{fenol} = 0,5$ .

A Tabela VII.4 mostra uma comparação da resposta relativa para diferentes compostos fenólicos obtida com diferentes biossensores a base de peroxidase. Ruzgas e col. [115] e Lindgren e col. [116] utilizaram a mesma enzima HRP, grafite sólido espectroscópico como material de eletrodo, e adsorção como método de imobilização da enzima. A diferença entre esses dois biossensores é que o eletrodo de grafite em um dos casos [116] foi submetido a um tratamento térmico e, como pode ser visto na Tabela VII.4, as respostas relativas ao fenol dos compostos fenólicos investigados são todas maiores para um biossensor [115] e menores para o outro [116], sendo que essa diferença de resposta parece ser devida à uma pequena mudança na preparação do biossensor. Já no caso do biossensor desenvolvido neste trabalho, as respostas relativas ao fenol foram maiores para alguns compostos fenólicos e menores para outros, diferente do que foi observado para os outros dois biossensores citados para comparação, que mostraram uma tendência.

Se compararmos a resposta relativa obtida para catecol com os três biossensores observa-se que o biossensor proposto pode ser muito mais sensível para catecol em comparação com os outros dois biossensores a base de peroxidase descritos na literatura [115,116] baseados em grafite sólido que geralmente são mais sensíveis.

A configuração do biossensor e o método de imobilização influem na habilidade como doador de elétrons dos compostos fenólicos. Dessa forma é possível preparar biossensores a base de peroxidase específicos para diferentes substratos fenólicos variando-se os fatores envolvidos na sua construção.

**Tabela VII.4.** Comparação da resposta relativa para diferentes compostos fenólicos obtidas com eletrodos modificados com HRP.

Composto fenólico	Estrutura	Resposta relativa (%)		
		ST-HRP	Grafite-HRP [116]	Grafite-HRP [115]
Fenol		100	100	100
2-amino-4-clorofenol		568		2658
Catecol		491	45	125
4-clorofenol		121	51	417
Resorcinol		57		167
Vanilina		61	61	358
4-cloro-3-metilfenol		46	75	792
p-cresol		40	92	500

### ***VII.3.9. Efeito de aditivos na sensibilidade e estabilidade do biossensor***

A sensibilidade do biossensor ST-HRP desenvolvido para fenol foi muito boa em relação a biossensores similares descritos na literatura, porém, a estabilidade foi baixa. A falta de estabilidade de biossensores a base de enzimas é geralmente reconhecida. Esse problema tem sido contornado com os progressos introduzidos nas técnicas de imobilização de enzimas, e uma outra alternativa que tem recebido grande atenção é a estabilização de enzimas em configurações de biossensor amperométrico usando um sistema estabilizador que inclui um polímero positivamente carregado ou um carboidrato neutro [131].

Os eletrodos de pasta de carbono oferecem alta versatilidade, facilidade de renovação da superfície, baixo ruído, baixa corrente de fundo, baixo custo e além dessas características apresenta a vantagem da modificação do “bulk” do eletrodo, oferecendo uma proximidade entre a enzima, a matriz condutora e outros aditivos [131], e fornece um ambiente protetor para a enzima incorporada, que pode resultar em um aumento de estabilidade [132].

Como o eletrodo ST-HRP apresentou uma estabilidade baixa, nessa parte do trabalho são apresentados os resultados de um estudo da incorporação de alguns aditivos na pasta com o intuito de melhorar o tempo de vida do biossensor sem perder a sensibilidade. Para impedir a desnaturação da enzima no meio orgânico ou melhorar a sensibilidade e estabilidade operacional, tem sido sugerido o uso de aditivos tais como polietileno glicol [133], antibióticos catiônicos, polímeros, pequenas moléculas não carregadas e proteínas carregadas negativamente [134] e recentemente DNA [135].

Gorton e col.[136] tem uma série de publicações mostrando as propriedades benéficas de pastas de carbono modificadas com enzima que inclui polietilenoimina (PEI) como um aditivo, geralmente em sistemas com enzimas oxidase/peroxidase acopladas como, por exemplo, um biossensor para álcool baseado neste tipo de sistema bienzimático. Albumina de soro bovino (BSA) tem sido usada juntamente com enzimas para formar um ambiente mais próximo do natural da enzima [137]. Esse



reagente tem sido utilizado quando enzimas são imobilizadas através do método de ligação covalente cruzada com glutaraldeído, Figura VII.10. Um trabalho recente mostrou que a incorporação de uma mistura de tirosinase-DNA na pasta de carbono apresentou um desempenho superior em operação amperométrica sobre condições de fluxo em comparação com o eletrodo de pasta de carbono preparado sem DNA, rendendo ao biossensor um aumento na sensibilidade e estabilidade [135].

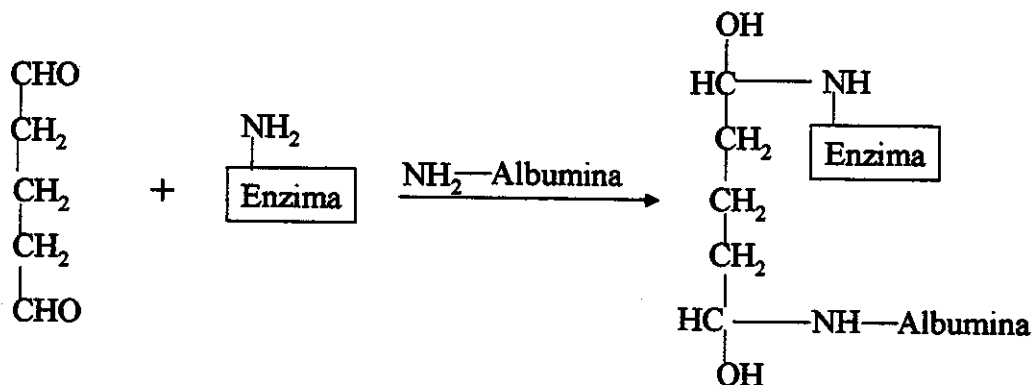
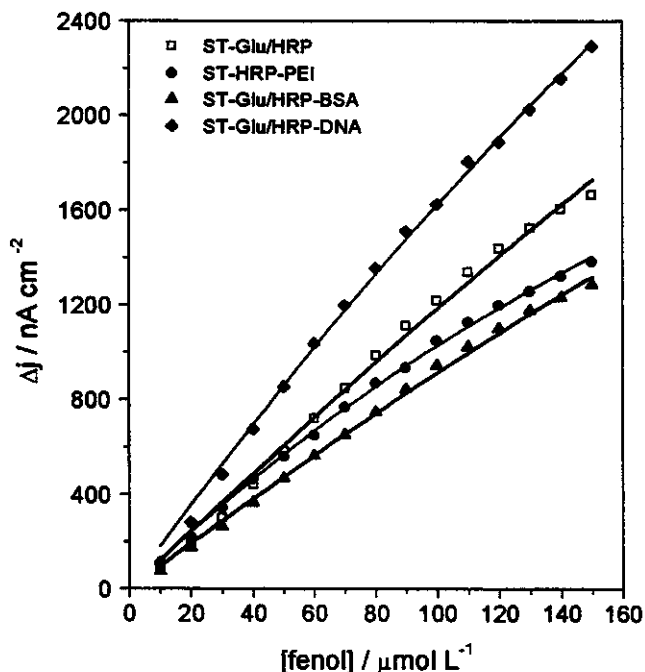


Figura VII.10. Imobilização de enzima e albumina de soro bovino via glutaraldeído.

Assim, a influência dos aditivos PEI, BSA e DNA sobre a sensibilidade e estabilidade operacional do biossensor ST-HRP para fenol foi estudada.

A Figura VII.11 mostra as curvas analíticas obtidas com os biossensores a base de pasta de carbono preparados com e sem aditivos. Em comparação ao biossensor sem aditivo, pode-se observar que tanto PEI quanto BSA na pasta acarretam uma pequena diminuição na sensibilidade do biossensor para fenol. No caso do aditivo PEI, este comportamento pode ser devido à formação de ligação cruzada com reticulação desfavorável da enzima. A presença de BSA na pasta pode causar um aumento na resistência a difusão ou uma fixação rígida da enzima ou ainda substituição da HRP pelo BSA sobre a região da superfície, diminuindo a sensibilidade do biossensor. Já, com a presença de DNA na pasta obteve-se uma melhora na sensibilidade do biossensor para fenol. Este comportamento deve-se à natureza condutora da fita de

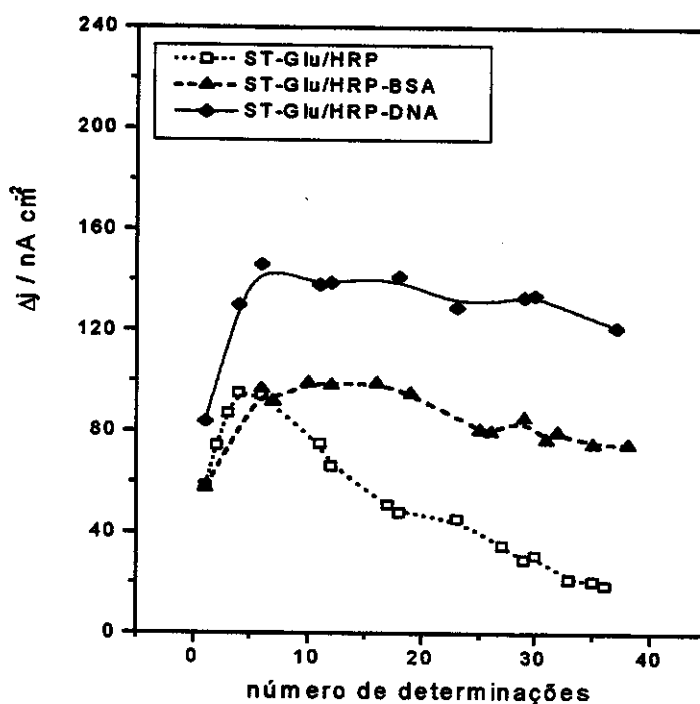
DNA facilitando a transferência de elétrons além de proporcionar um ambiente mais hidrofílico para a enzima favorecendo a catálise [135].



**Figura VII.11.** Curvas analíticas para fenol obtidas com os eletrodos de pasta de carbono ST-HRP sem e com aditivos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,8,  $E_{\text{ap}} = 0 \text{ mV vs ECS}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{fenol} = 0,5$ .

A Figura VII.12 apresenta a resposta obtida para  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de fenol em função do número de determinações no mesmo dia de preparação da pasta, para uma comparação da estabilidade das diferentes preparações sem e com aditivos. Pode-se observar um aumento de estabilidade na seguinte ordem: ST-Glu/HRP < ST-Glu/HRP-BSA < ST-Glu/HRP-DNA. O biossensor preparado com PEI como aditivo apresentou uma estabilidade baixa equivalente ao biossensor preparado sem aditivo, e menor sensibilidade. O aumento na estabilidade causado pela adição de BSA deve estar relacionado à formação de um ambiente mais favorável à enzima, porém com uma diminuição na sensibilidade. A presença de DNA na pasta, além de aumentar a sensibilidade, melhorou também a estabilidade do biossensor. Essa melhor estabilidade

pode ser explicada pela interação do DNA com os resíduos de aminoácidos da enzima, através de ligação de hidrogênio [135]. A outra possibilidade que justificaria a melhor estabilidade conseguida na presença de DNA seria a sua capacidade de absorver os radicais livres formados no ciclo enzimático da peroxidase. Entretanto, experimentos realizados na presença de manitol, que é um seqüestrador de radicais livres, não mostraram nenhum efeito, portanto esta estabilidade não pode ser explicada somente pelo efeito seqüestrador de radicais.

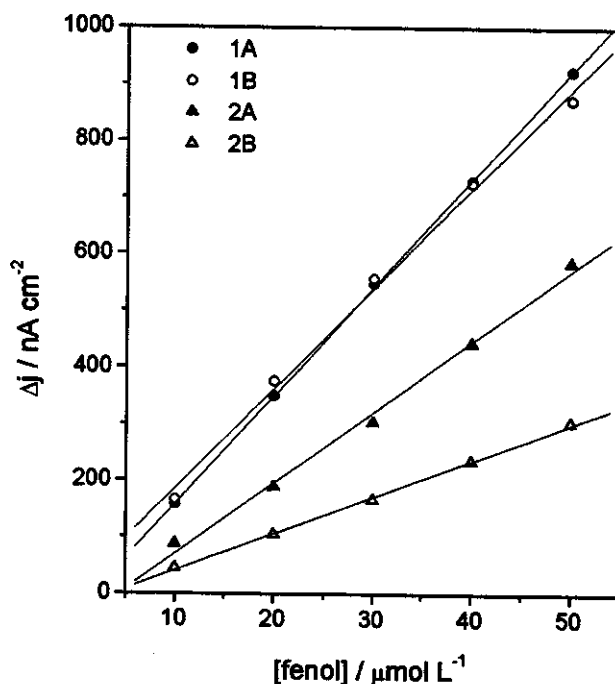


**Figura VII.12.** Comparação da estabilidade dos biossensores preparados sem e com aditivos. Resposta obtida para  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de fenol, nas mesmas condições mencionadas na Figura VII.11.

Dessa forma a incorporação de DNA garantiu ao biossensor melhor desempenho em termos de sensibilidade e estabilidade em uso contínuo, sendo interessante investigar a sua estabilidade quanto à estocagem.

### VII.3.10. Estabilidade da pasta e do biossensor contendo o aditivo DNA

A pasta de carbono modificada com HRP e DNA imobilizados em ST foi guardada em geladeira com a finalidade de acompanhar a atividade da enzima peroxidase nesse ambiente. A Figura VII.13 mostra as curvas de calibração de um biossensor construído no dia da preparação da pasta e de um biossensor construído com a mesma pasta estocada em geladeira após 30 dias da preparação. Para efeito de comparação, na mesma figura são apresentados os resultados obtidos com um biossensor sem aditivos.



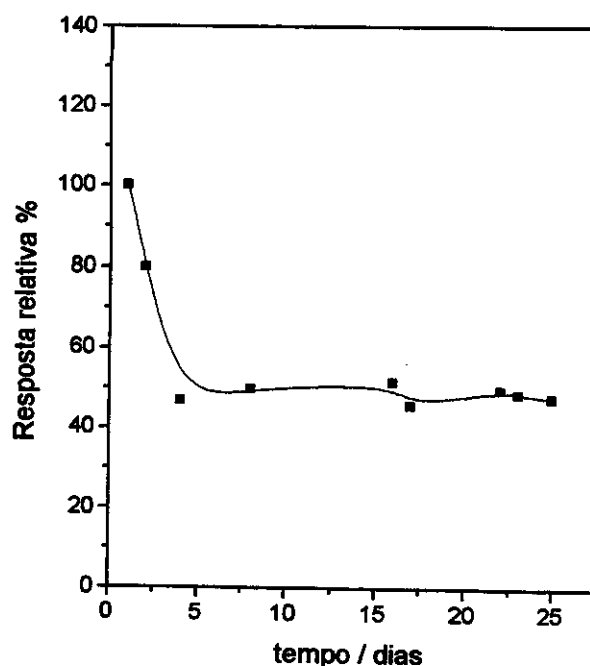
**Figura VII.13.** Curvas analíticas para fenol obtidas em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,8,  $E_{\text{apl}} = 0 \text{ mV vs ECS}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{fenol} = 0,5$ . 1A-biossensor contendo DNA no dia da preparação da pasta e 1B- após 30 dias. 2A- biossensor sem aditivo no dia da preparação da pasta e 2B- no dia seguinte de preparação da pasta.

Pode-se observar que a estabilidade da pasta contendo DNA é muito boa mantendo a mesma atividade da enzima durante esse período, diferente do que ocorre com a pasta

preparada sem aditivos que apresenta metade da atividade inicial já no dia seguinte da preparação da pasta. A estabilidade da pasta é muito importante para conseguir uma maior semelhança entre biossensores construídos em dias diferentes.

Lindgren e col. [116] encontraram que os eletrodos modificados com peroxidase, independente do método de preparação (ligação covalente ou adsorção), apresentam inicialmente um decréscimo rápido na corrente de estado estacionário para  $H_2O_2$ , enquanto que a resposta para p-cresol foi aproximadamente constante, por uma ou duas semanas, quando os eletrodos foram estocados em solução tampão à 4 °C entre os experimentos. Após esse período a resposta para p-cresol também diminui atingindo 50 % da sua resposta inicial em 25 dias. Essa diferença em estabilidade das moléculas de peroxidase imobilizada em proceder transferência de elétrons direta e mediada foi relacionada à suposição de que nem todas as moléculas estão igualmente envolvidas nos dois processos.

A Figura VII.14 apresenta a resposta relativa do biossensor para fenol em função do tempo. Pode-se observar um decréscimo em sensibilidade atingindo 50 % após 3 dias de uso e a partir desse período a resposta mantém-se num patamar. Uma condição para conseguir esse comportamento foi manter o biossensor estocado em solução tampão 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,8, em geladeira, pois foi observado experimentalmente que a resposta de um biossensor que foi estocado seco em geladeira é muito pequena além de aumentar o tempo necessário para o condicionamento. Cabe ressaltar que mesmo com uma diminuição de 50% em sensibilidade, essa resposta equivale ao 100 % de resposta do biossensor sem aditivo, sendo assim, o biossensor é muito sensível se comparado com os outros [115, 116].



**Figura VII.14.** Estabilidade do biossensor preparado com pasta de carbono modificada com HRP e DNA imobilizados na superfície da sílica-titânio. Resposta relativa para  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de fenol obtida por cronoamperometria em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com um  $E_{\text{apl}}$  de  $0 \text{ mV vs ECS}$ .  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{fenol}=0,5$ .

No caso do biossensor desenvolvido, mesmo com a presença de DNA, a transferência de elétrons direta da peroxidase é bloqueada, de forma que a corrente medida resulta do processo mediado. Sendo assim, o decréscimo na resposta observado nos primeiros dias de uso do biossensor pode ser devido a uma gradual inativação da enzima peroxidase por radicais fenólicos. A redução dos compostos fenólicos na superfície de um eletrodo de pasta de carbono é menos eficiente do que na superfície de eletrodos sólidos [115], sendo assim tanto peróxido como compostos fenólicos podem ser adsorvidos na superfície do biossensor.

Quando o biossensor é estocado entre os experimentos, os compostos que por ventura tenham sido adsorvidos em sua superfície ficam mais tempo em interação com a camada de enzima mais externa ou mais desprotegida, inativando-a com o tempo. O

fator tempo deve ser importante nesse caso, já que quando o biossensor está em uso contínuo o decréscimo na sua resposta é bem menos pronunciado como pode ser visto na Figura VII.12. Após os primeiros dias de uso, ficam ativas apenas uma porção de enzimas mais protegidas e por isso a resposta permanece praticamente constante, garantindo ao biossensor um tempo de vida útil de cerca de 1 mês. Essa diferença observada em relação a moléculas de enzima mais ou menos protegida pode ser devido a ambientes diferentes que podem ter sido formados, já que a fita de DNA utilizada foi de difícil solubilização nas condições empregadas.

A estabilidade da pasta e do biossensor contendo DNA em relação à estocagem do biossensor contendo DNA representa uma contribuição significativa em relação ao custo/benefício além da facilidade operacional de conseguir o desempenho inicial por substituição da pasta por uma nova porção de pasta estocada em geladeira.

#### *VII.3.11. Aplicação do biossensor em análise de amostra real*

As limitações que podem ser encontradas para o uso de biossensores para determinação de fenóis em amostras reais são a sensibilidade (exceto para os melhores substratos da enzima) e estabilidade operacional. Estes problemas têm sido contornados através de modificações que podem ser desde a etapa de construção dos biossensores, como materiais de eletrodos, diferentes técnicas de imobilização do componente biológico, adição de mediadores, estabilizadores, até a análise em si. Dessa forma, a literatura dispõe de muitas publicações considerando biossensores amperométricos que atingiram os limites de detecção necessários para análise de amostra de interesse ambiental [138]. Para que tais biossensores sejam úteis em análises ambientais, é necessário melhorar os mecanismos de transdução e combinar tais progressos com a escolha das seqüências de reações biológicas em novos materiais na transdução eletroquímica.

A compatibilidade de um biossensor a base de peroxidase desenvolvido por Ruzgas e col. [115] para aplicação em amostras reais foi testada marcando-se amostras

de águas de superfície contendo substâncias húmicas com 2-amino-4-clorofenol, que foi o composto fenólico que apresentou maior sensibilidade nessa configuração de biossensor, e encontraram quase a mesma resposta para esse composto fenólico em solução tampão fosfato. Ou seja, os autores investigaram o efeito da matriz para uma análise de amostra real, mas não chegaram à determinação de fenol propriamente dita.

A Tabela VII.5 mostra os resultados de um teste com o biossensor desenvolvido para sua aplicação em amostras reais de efluentes industriais. Duas amostras foram testadas, uma oriunda de indústria papelreira e outra de uma indústria química. Os resultados foram comparados com aquele obtido por um método espectrofotométrico cuja resposta é representada como fenol total.

**Tabela VII.5.** Determinação de fenol em amostras reais de efluentes industriais.

	Efluente (indústria de papel)	Efluente (indústria química)
Biossensor / ppm	$64,6 \pm 0,02$	$143 \pm 1$
Espectrofotométrico / ppm	$34 \pm 1$	$128 \pm 40$

Como pode ser observado, os valores encontrados com o biossensor são mais concordantes com o valor obtido através do método espectrofotométrico para a amostra de efluente de indústria química, enquanto que no caso do efluente oriundo de indústria de papel a resposta do biossensor foi quase o dobro da obtida pelo outro método. A resposta nos dois métodos depende da matriz analítica, porém no teste de aplicação do biossensor para análise do efluente papelreiro, foi encontrado uma boa recuperação da resposta, 102,2 %. O fato de o biossensor apresentar resposta maior pode ser devido ao princípio da medida eletroquímica sendo o biossensor sensível também para outras substâncias redox na amostra. Dessa forma, o biossensor desenvolvido pode ainda não ser um método exato para a determinação de fenóis numa amostra real, apesar de que o método espectrofotométrico utilizado para comparação pode também fornecer resultados errôneos por formar diferentes compostos com  $\epsilon$  bastante diferentes.



Entretanto o método proposto oferece uma excelente alternativa para acompanhamento da concentração de fenol num processo de tratamento de efluente, possibilitando monitorar a resposta antes e após cada etapa do processo.

A Tabela VII.6 apresenta os resultados das análises de fenol com o biossensor em amostras de águas de rios da região de Cubatão e os valores de recuperação da resposta do biossensor para fenol após adição das amostras. Pode ser observado que a recuperação foi muito boa, com valores muito próximos de 100 % para quatro das cinco amostras, o que indica que o biossensor se aplica muito bem na análise deste tipo de amostra com pouca influência da matriz.

**Tabela VII.6.** Resultados das análises de fenol em amostras de águas de rios da região de Cubatão obtidas com o biossensor amperométrico ST-HRP-DNA e porcentagens de recuperação das respostas do biossensor após adição de amostras de águas de rios da região de Cubatão.

Amostras	Fenol (ppm)	Recuperação / %
1	8,2±0,7	100,6
2	12,8±0,8	106,9
3	12,6±2	110,3
4	14,7±2	101,2
5	5,8±1	86,3

# *CONCLUSÕES*

УВАЖАЮ  
ЩИМ  
ОБРАЗОМ  
VIII

## VIII. CONCLUSÕES

A superfície da sílica gel modificada com óxido de titânio pode ser usada na imobilização da enzima HRP com relativa facilidade, para o desenvolvimento de biossensores amperométricos a base de pasta de carbono. A transferência de elétrons direta entre a enzima e o eletrodo, na presença apenas de peróxido, foi bloqueada provavelmente devido ao caráter isolante da matriz sílica na qual a enzima foi imobilizada. Neste caso onde a transferência de elétrons direta é bloqueada, a sensibilidade do biossensor a base de peroxidase para a detecção de fenol melhorou de forma significativa. Esse comportamento representa uma grande contribuição para a detecção de fenóis via biossensores a base de peroxidase, uma vez que diminuindo a corrente devido à transferência de elétrons direta, foi possível preparar eletrodos mais sensíveis para fenol. A maioria dos dispositivos descritos anteriormente apresentou uma baixa sensibilidade para fenol em virtude de uma alta corrente devido à transferência de elétrons direta entre a enzima e eletrodo de grafite sólido.

O biossensor ST-HRP apresentou uma resposta bastante sensível para fenol ( $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), um amplo intervalo linear de resposta ( $10\text{-}50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e um curto tempo de resposta (1,5 s), em um potencial aplicado de 0 mV vs ECS.

Entre os compostos fenólicos testados, o biossensor foi mais sensível para 2-amino-4-clorofenol e catecol. O biossensor foi cerca de 5 vezes mais sensível para catecol em relação ao fenol, em comparação com outros biossensores descritos na literatura que mostraram aproximadamente a mesma resposta para esses dois compostos. Isso mostra que o perfil de seletividade varia significativamente dependendo da matriz (ambiente) ou material de eletrodo em que uma mesma enzima peroxidase foi imobilizada.

A estabilidade do biossensor foi baixa, necessitando trocar a pasta de carbono e a solução, após um certo número de adições do analito, já que as medidas foram realizadas em estado estacionário. A maioria dos biossensores a base de peroxidase anteriormente descritos utilizaram grafite sólido como material de eletrodo e as

análises foram feitas em fluxo que tem a vantagem de o eletrodo ser lavado continuamente, mesmo assim, a estabilidade destes não foi maior que duas semanas.

Contudo, a configuração do biossensor desenvolvido, sendo a base de pasta de carbono possibilitou a incorporação de aditivos e os estudos realizados neste sentido mostraram que a presença de DNA junto à peroxidase melhora tanto a estabilidade como a sensibilidade do biossensor para fenol. A pasta de carbono modificada com ST-HRP-DNA foi estável por pelo menos 1 mês e o biossensor preparado com este material apresentou estabilidade por cerca de 1 mês quando estocado em geladeira e em solução tampão entre os experimentos.

A estabilidade da pasta contendo DNA em relação à estocagem representa uma facilidade operacional de conseguir o desempenho inicial do biossensor por substituição da pasta por uma nova porção de pasta estocada em geladeira.

A sensibilidade do biossensor permitiu a determinação de fenol em amostras reais de influentes industriais e de águas de rios da região de Cubatão. Os resultados mostraram que o biossensor é mais sensível para determinação de fenol para os diferentes tipos de amostras em comparação com o método espectrofotométrico. Isso indica que o biossensor desenvolvido oferece uma excelente alternativa como um método de acompanhamento da concentração de fenol num processo de tratamento de efluente, possibilitando monitorar a resposta antes e após cada etapa do processo.

A sensibilidade e os progressos conseguidos em relação à estabilidade dos biossensores para fenóis através da incorporação de aditivos, principalmente o DNA, são bastante promissores para aplicação destas configurações em situações que requeiram monitoramento contínuo.

***PROPOSTAS  
PARA  
TRABALHOS  
FUTUROS***

УДК 37.010  
IX

## IX. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Como propostas de trabalhos futuros sugere-se:

Utilização de sistemas em fluxo empregando o biossensor amperométrico a base de peroxidase e sílica-titânio para a detecção de compostos fenólicos.

Usar a sílica-titânio para imobilizar diferentes enzimas peroxidases (purificadas ou extrato bruto) para verificar a possibilidade de conseguir seletividade para determinados compostos fenólicos, uma vez que é conhecido que o perfil de seletividade varia para diferentes peroxidases .

Empregar arranjos de eletrodos modificados com diferentes enzimas peroxidases (seletivas para determinados compostos fenólicos) e diferentes processos de imobilização, assim como o tratamento dos dados experimentais através de métodos quimiométricos (PLS, redes neurais), visando a determinação simultânea e “*in situ*” de todas as espécies fenólicas presentes em amostras de interesse ambiental. Esta possibilidade é de grande interesse nos estudos de toxicidade e tratamento de efluentes industriais.

Prosseguir os estudos com o biossensor contendo DNA buscando melhorar ainda mais os benefícios alcançados com esse aditivo na sensibilidade e estabilidade, através do uso de reagentes especiais como grafite em pó e óleo mineral sem DNA.

***REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS***

X OTC-HH-DAN

## X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Nistor, C., Ennéus, J., Gorton, L. e Ciucu, A.; Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds. *Anal. Chim. Acta* 387 (1999) 309.
- [2] Svitel, J. e Miertus, S.; Development of tyrosinase based biosensor and its application for monitoring of bioremediation of phenol and phenolics compounds. *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 828.
- [3] Russell, I. M. e Burton, S.G.; Development and demonstration of an immobilized-polyphenol oxidase bioprobe for the detection of phenolic pollutants in water. *Anal. Chim. Acta*, 389 (1999) 161.
- [4] Calvo, E.J. e Danilowicz, C.; Amperometric enzyme electrodes. *J. Braz. Chem. Soc.* 8 (1997) 563.
- [5] Ortega, F., Domínguez, E., Burestedt, E., Ennéus, J., Gorton, L. e Marko-Varga, G.; Phenol oxidase-based biosensors as selective detection units in column liquid chromatography for the determination of phenolic compounds. *J. Chromatogr., A* 675 (1994) 65.
- [6] Campanella, L., Beone, T., Sammartino, M.P., e Tomassetti, M.; Determination of phenol in wastes and water using an enzyme sensor. *Analyst* 118 (1993) 979.
- [7] Zimmermann, F. e Taylor-Mayer, R.; *Mutagenicity Testing in Environmental Pollution Control*, John Wiley and Sons, New York, 1985, p 1.
- [8] Vincent, G.; In: Angeletti, G.; Bjorseth, A. (Eds), *Organic Micropollutants in the Aquatic Environment*, Klumer Dordrecht, 1991, 285.
- [9] Puig, D., Ruzgas, T., Ennéus, J., Gorton, L., Marko-Varga, G. e Barceló, D.; Characterization of tyrosinase-teflon-graphite composite electrodes for the determination of catechol in environmental analysis. *Electroanalysis* 8 (1996) 885.
- [10] Puig, D. e Barcelo, D.; Determination of phenolic compounds in water and waste water. *Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 362.
- [11] Norberg, J., Ennéus, J., Jönson, J.A., Mathiasson, L., Burestedt, E., Knutsson, M. e Marko-Varga, G.; On-line supported liquid membrane-liquid chromatography with a



- phenol oxidase-based biosensor as a selective detection unit for the determination of phenol in blood plasma. *J Chromatogr., B* 701 (1997) 39.
- [12] Parellada, J., Narváez, A., López, M.A., Domínguez, E., Fernández, J.J., Pavlov, V. e Katakis, I.; Amperometric immunosensors and enzyme electrodes for environmental applications. *Anal. Chim. Acta* 362 (1998) 47.
- [13] Marko-Varga, G., Emneus, J., Gorton, L. e Ruzgas, T.; Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds. *Trends Anal. Chem.* 14 (1995) 319.
- [14] Rogers, K.R. e Willians, L.R.; Biosensors for environmental monitoring: a regulatory perspective. *Trends Anal. Chem.* 14 (1995) 289.
- [15] Karube, I., Nomura, Y. e Arikawa, Y.; Biosensors for environmental control. *Trends Anal. Chem.* 14 (1995) 295.
- [16] Crumbliss, A.L., Stonehuerner, J. e Henkens, R.W.; The use of inorganic materials to control or maintain immobilized enzyme activity. *New J. Chem.* 18 (1994) 327.
- [17] Hulanicki A., Glab, S. e Ingman, F.; Chemical sensors: definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* 63 (1991) 1247.
- [18] Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A. e Wilson, G.S.; Electrochemical biosensors: proposed definitions and classification - synopsis of the report. *Sens. Actuators, B* 30 (1996) 81.
- [19] Mulchandani, A.; Bassi, A.S.; Principles and applications of biosensors for bioprocess monitoring and control. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15 (1995) 105.
- [20] Turner, A.P.F., Karube, Y. e Wilson, G.S; *Biosensors. Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, New York, 1987, v.
- [21] Durst, R.A., Bäumner, A.J., Murray, R.W., Buck, R.P. e Andrieux, C.P.; Chemically modified electrodes: recommended terminology and definitions. *Pure Appl. Chem.* 69 (1997) 1317.
- [22] Duffy, P., Saad, I. e Wallach, J.M.; New development of conductometric measurements in analytical biochemistry. *Anal. Chim. Acta* 2 (1988) 267.
- [23] Eggins, B.R., *Biosensors: an introduction*, Wiley, New York, 1996, 8.
- [24] Soares, T.A. e Lins, R.D.; Ribozimas: nem toda enzima é proteína. *Quim. Nova*, 18 (1995) 375.

- [25] Guilbault, G.G., *Handbook of enzymatic methods of analysis*. Marcel Dekker, New York, 1976, 4.
- [26] Frew, J.E. e Hill, H.A.O.; Electrochemical biosensors. *Anal. Chem.* 59 (1987) 933A.
- [27] Guo, L.-H. e Hill, H.A.O., Direct electrochemistry of proteins and enzymes. *Adv. Inorg. Chem.* 36 (1991) 341.
- [28] Ikeda T., Electrochemical biosensors based on biocatalyst electrodes. *Bull. Electrochem.* 8 (1992) 145.
- [29] Lötzbeyer, T., Schuhmann, W. e Schmidt, H-L.; Electron transfer principles in amperometric biosensors: direct electron transfer between enzymes and electrode surface. *Sens. Actuators.*, B 33 (1996) 50.
- [30] Heller A.; Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes. *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 3579.
- [31] Worsfold, P.J.; Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes. *Pure Appl. Chem.* 67 (1995) 597.
- [32] Kierstan, M.P.J. e Coughlan, M.P.; Immobilization of cells and enzymes by gel entrapment. In: Woodward, J. (Ed.) *Immobilized cells and enzymes: a practical approach*, IRL Press, Oxford, 1985, 39.
- [33] Messing, R.A.; Adsorption and inorganic bridge formations. *Methods Enzymol.* 44, (1976) 148.
- [34] Scouten, W.H., Luong, J.H.T. e Brown, R.S.; Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *Tibtech* 13 (1995) 178.
- [35] Gorton, L., Csöregi, E., Domínguez, E., Emnéus, J., Jönsson-Pettersson, G., Marko-Varga, G. e Persson, B.; Selective detection in flow analysis based on the combination of immobilized enzymes and chemically modified electrodes. *Anal. Chim. Acta* 250 (1991) 203.
- [36] Gorton, L., Jönsson-Petersson, G., Csöregi, E., Johansson, K., Domínguez E. e Marko-Varga, G.; Amperometric biosensors based on an apparent direct electron transfer between electrodes and immobilized peroxidases. Plenary lecture. *Analyst* 117 (1992) 1235.
- [37] Wilson, G.S. e Thévenot, D.R.; Unmediated amperometric enzyme electrodes. In: Cass, A.E.G. (Ed.) *Biosensors a practical approach*, IRL Press, 1990, 3.

- [38] Barker, S.A.; Immobilization of the biological component of biosensors. In: Turner, A.P.F., Karube, I. e Wilson, G.S. (Eds.) *Biosensors Fundamental and applications*, Oxford University Press, 1987, 85.
- [39] Klei, H.E., Sundstrom, D.W. e Shim, D.; Immobilization of Enzymes by Microencapsulation. In: Woodward, J. (Ed.) *Immobilized cells and enzymes: a practical approach*, IRL Press, 1985, 49.
- [40] Chibata, I.; *Immobilized enzymes research and development*, John Wiley and Sons, New York, 1978, 12.
- [41] Polásek, M., Gorton, L., Appelvist, R., Marko-Varga, G. e Johansson, G.; Amperometric glucose sensor based on glucose-dehidrogenase immobilized on a graphite electrode modified with an n,n'-bis(benzophenoxaziny) derivative of benzene-1,4-dicarboxamida. *Anal. Chim. Acta* 246 (1991) 283.
- [42] Foulds, N.C. e Lowe, C.R.; Enzyme entrapment in electrically conducting polymer. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* 82 (1986) 1259.
- [43] Bartlett, P.N., Tebbutt, P. e Tyrrel, C.H.; Electrochemical immobilization of enzymes. 3. Immobilization of glucose oxidase in thin films of electrochemically polymerized phenols. *Anal. Chem.* 64 (1992) 138.
- [44] Cosnier, S.; Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 443.
- [45] Fatibello Filho, O. e Capelato, M.D; Biossensores. *Quim. Nova* 15 (1992) 28.
- [46] Oliveira Neto, G. e Yamanaka, H.; Enzimas e materiais biológicos imobilizados: biossensores. *Quim. Nova* 11 (1988) 432.
- [47] Walt, D.R. e Agayn, V.I.; The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *Trends Anal. Chem.* 13 (1994) 425.
- [48] Chibata, I.; *Immobilized enzymes research and development*, John Wiley and Sons, New York, 1978, 47.
- [49] Kennedy, J.F. e Cabral, J.M.S.; Immobilisation of biocatalysts by metal link/chelation processes. In Woodward, J. (Ed.) *Immobilized cells and enzymes: a practical approach*, IRL Press 1985, 31.

- [50] Chibata, I.; *Immobilized enzymes research and development*, John Wiley and Sons, New York, 1978, 32.
- [51] Guilbault, G.G.; *Analytical uses of immobilized enzymes*, Marcel Dekker, New York 1984.
- [52] Hendry, S.P., Higgins, I.J. e Bannister, J.V.; Amperometric biosensors. *J. Biotechnol.* 15 (1990) 229.
- [53] Scheller, F. e Schubert F.; *Biosensors*, Amsterdam-New York-Tokyo, Elsevier, 1992, p.7.
- [54] Updike, S.J. e Hicks, G.P.; The enzyme electrode. *Nature* 214 (1967) 986.
- [55] Bartlett, P.N., Tebbutt, P. e Whitaker, R.G.; Kinetics aspects of the use of modified electrodes and mediators in bioelectrochemistry, *Prog. React. Kinet.* 16 (1991) 55.
- [56] Csöregi, E., Jönsson-Pettersson, G. e Gorton, L.; Mediatorless electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at graphite electrodes chemically modified with peroxidases. *J. Biotechnol.* 30 (1993) 315.
- [57] Gorton, L.; Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells. *Electroanalysis* 7 (1995) 23.
- [58] Ghindilis, A.L., Atanasov, P., Wilkins, E.; Enzyme-catalysed direct electron transfer: fundamentals and analytical applications. *Electroanalysis* 9 (1997) 661.
- [59] Gilmartin, M.A.T. e Hart, J.P.; Sensing with chemically and biologically modified carbon electrodes. *Analyst* 120 (1995) 1029.
- [60] Csöregi, E., Gorton, L. e Marko-Varga, G.; Carbon fibers as electrode materials for the construction of peroxidase-modified amperometric biosensors. *Anal. Chim. Acta* 273 (1993) 59.
- [61] Ruiz, B.L., Dempsey, E., Hua, C., Smyth, M.R. e Wang, J.; Development of amperometric sensors for choline, acetylcholine and arsenocholine. *Anal. Chim. Acta* 273 (1993) 425.
- [62] Adams, R.N.; Carbon paste electrodes. *Anal. Chem.* 30 (1958) 1576.
- [63] Céspedes, F., Fabregas, M.J., Bartrolí, J. e Alegrats, S.; Amperometric enzymatic glucose electrode based on an epoxy-graphite composite. *Anal. Chim. Acta* 273 (1993) 409.
- [64] Kinoshita, K.; *Carbon: Electrochemical and Physicochemical Properties*, Wiley, New York, 1988, 1.

- [65] Kalcher, K.; Chemically modified carbon paste electrodes in voltammetric analysis. *Electroanalysis* 2 (1990) 419.
- [66] Kissinger, P.T.; The development of liquid chromatography/electrochemistry from a historical perspective. *Electroanalysis* 4 (1992) 359.
- [67] Kulys, J., Gorton, L., Domínguez, E., Emnéus, J. e Jarskog, H.; Electrochemical characterization of carbon paste modified with proteins and polycations. *J. Electroanal. Chem.* 372 (1994) 49.
- [68] Matuszewski, W. e Trojanowicz, M.; Graphite paste-based enzymatic glucose electrode for flow injection analysis. *Analyst* 113 (1988) 735.
- [69] Walcarius, A.; Analytical applications of silica-modified electrodes - A comprehensive review. *Electroanalysis* 10 (1998) 1217.
- [70] Iler, R.K.; *The chemistry of silica*, Wiley, New York, 1979.
- [71] Zhuravlev, L. T.; Surface characterization of amorphous silica-a review of work from the former USSR. *Coll. Surf. A* 74 (1993) 71.
- [72] Miles, W. J. e Hamilton, R. D.; Chemical methods of analysis for crystalline silica. A critical literature review. *Anal. Chim. Acta* 286 (1994) 3.
- [73] Vansant, E. F., Van der Voort, P. e Vrancken, K. C.; *Characterization and chemical modification of the silica surface*. Elsevier, Amsterdam, 1995.
- [74] Sjöberg, S.; Silica in aqueous environments. *J. Non-Cryst. Solids* 196 (1996) 51.
- [75] Hair, M.L. e Hertl, W.; Adsorption on hydroxylated silica surfaces. *J. Phys. Chem.* 73 (1969) 4269.
- [76] Unger, K.K., Porous silica, Elsevier, Amsterdam 1979 apud in Walcarius, A., *Electroanalysis*, 10 (1998) 1217.
- [77] Kalcher, K., Kauffmann, J.-M., Wang, J., Svancara, I., Vytras, K., Neuhold, C. e Yang, Z.; Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: a review with particular emphasis on the period 1990-1993. *Electroanalysis*, 7 (1995) 5.
- [78] Zaldivar, G.A.P., Gushikem, Y. e Kubota, L.T.; Tin(IV) oxide grafted on a silica gel surface as a conducting substrate base for cupric hexacyanoferrate. *J. Electroanal. Chem.* 318 (1991) 247.
- [79] Kubota, L.T. e Gushikem, Y.; Cyclic voltammetric study of  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  immobilized on silica gel surface coated with titanium (IV) oxide. *Electrochim. Acta* 37 (1992) 2477.

- [80] Kubota, L.T. e Gushikem, Y.; Cyclic voltammetry studies of copper and nickel hexacyanoferrate immobilized on a silica gel surface coated with titanium (IV) oxide. *J. Electroanal. Chem.* 362 (1993) 219.
- [81] Kubota, L.T. e Gushikem, Y., Perez, J. e Tanaka, A.A.; Electrochemical properties of iron phthalocyanine immobilized on titanium (IV) oxide coated on silica gel surface. *Langmuir* 11 (1995) 1009.
- [82] Rocha, R.F., Rosatto, S.S., Bruns, R.E. e Kubota, L.T.; Factorial design optimization of redox properties of methylene blue adsorbed on modified silica gel surface. *J. Electroanal. Chem.* 433 (1997) 73.
- [83] Perez, E.F., Kubota, L.T., Tanaka, A.A. e Oliveira Neto, G.; Anodic oxidation of cysteine catalysed by nickel tetrasulphonated phthalocyanine immobilized on silica gel modified with titanium (IV) oxide. *Electrochim. Acta* 43 (1998) 1665.
- [84] Garcia, C.A.B, Oliveira Neto, G., Kubota, L.T. e Grandin, L.A.; A new amperometric biosensor for fructose using a carbon paste electrode modified with silica gel coated with meldola's blue and fructose dehydrogenase. *J. Electroanal. Chem.* 418 (1996) 147.
- [85] Kubota, L.T., Milagres, B.G., Gouvea, F., de Oliveira Neto, G.; A modified carbon paste electrode with silica gel coated with meldola's blue and salicylate hydroxylase as a biosensor for salicylate. *Anal. Lett.* 29 (1996) 893.
- [86] Milagres, B.G., Kubota, L.T. e de Oliveira Neto, G.; Immobilized ferrocene and glucose oxidase on titanium(IV) oxide grafted onto a silica gel surface and its application as an amperometric glucose biosensor. *Electroanalysis* 8 (1996) 489.
- [87] King, W.P., Joseph K.T. e Kissinger, P.T.; Liquid chromatography with amperometric detection for determining phenolic preservatives. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63 (1990) 137.
- [88] Burestedt, E., Narvaez, A., Ruzgas, T., Gorton, L., Ennéus, J., Domínguez, E. e Marko-Varga, G.; Rate-limiting steps of tyrosinase modified electrodes for the detection of catechol. *Anal. Chem.* 68 (1996) 1605.
- [89] Razumas, V.J., Jasaitis, J.J. e Kulys, J.; Electrocatalysis on enzyme – modified carbon materials. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 12 (1984) 297.
- [90] Maehly, A.C.; Plant peroxidase. *Methods Enzymol.* 2 (1955) 801.

- [91] Ruzgas, T., Csöregi, E., Emnéus, J., Gorton, L. e Marko-Varga, G.; Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and Application. *Anal. Chim. Acta* 330 (1996) 123.
- [92] Dunford, H.B.; Horseradish Peroxidase: Structure and Kinetics Properties. In Everse, J.; Everse, K.E.; Grisham, M.B. (Eds.) *Peroxidases in Chemistry and Biology*; CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, 2.
- [93] Chance, B.; The properties of the enzyme-substrate compounds of peroxidase and peroxides. I. The spectra of the primary and secondary complexes. *Arch. Biochem. Biophys.* 21 (1949) 416.
- [94] Aasa, R., Vanngard, T., Dunford, H.B.; EPR studies on compound-I of horseradish-peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 391 (1975) 250.
- [95] LaMar, G.N. e Ropp, J.S. de; Proton nuclear magnetic resonance characterization of the electronic structure of horseradish peroxidase compound I. *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 395.
- [96] Roberts, J.E., Hoffman, B.M., Rutter, R. e Hager, L.P.; Electron-nuclear double-resonance of horseradish-peroxidase compound I-detection of the porphyrin pi-cation radical. *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 2118.
- [97] Chance, B.; The properties of the enzyme-substrate compounds of horseradish and lactoperoxidase. *Science* 109 (1949) 204.
- [98] Ruzgas, T., Gorton, L., Emnéus J. e Marko-Varga, G.; Kinetic models of horseradish peroxidase action on a graphite electrode. *J. Electroanal. Chem.* 391 (1995) 41.
- [99] Adediran S.A. e Lambeir, A.-M.; Kinetics of the reaction of compound II of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide to form compound III. *Eur. J. Biochem.* 186 (1989) 571.
- [100] Eddowes, M.J. e Hill, H.A.O.; Novel method for the investigation of the electrochemistry of metalloproteins: cytochrome c. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1977) 771.
- [101] Yeh, P. e Kuwana, T.; Reversible electrodes reaction of cytochrome c. *Chem. Lett.* (1977) 1145.
- [102] Tarasevich, M.R., Yaropolov, A.I., Bogdanovskaya, V.A. e Varfolomeev, S.D.; Electrocatalysis of a cathodic oxygen reduction by laccase. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 6 (1979) 393 (*J. Electroanal. Chem.* 104 (1979) 393).

- [103] Gorton, L., Lindgren, A., Larsson, T., Munteanu, F.D., Ruzgas, T. e Gazaryan, I.; Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. *Anal Chim Acta* 400 (1999) 91.
- [104] Hill, H.A.O. e Hunt, N.I.; Direct and indirect electrochemical investigations of metalloenzymes. *Methods Enzymol.* 227 (1993) 501.
- [105] Ho, W.O., Athey, D., McNeil, C.J., Hager, H.J., Evans, G.P. e Mullen, W.H.; Mediatorless horseradish-peroxidase enzyme electrodes based on activated carbon – potential application to specific binding assay. *J. Electroanal. Chem.* 351 (1993) 185.
- [106] Wollenberger, U., Bogdanovskaya, V., Bobrin, S., Scheller, F. e Tarasevich, M.; Enzyme electrodes using bioelectrocatalytic reduction of hydrogen peroxide. *Anal. Lett.* 23 (1990) 1795.
- [107] Sanchez, P.D., Blanco, P.T., Alvarez, J.M.F., Smyth M.R. e Okennedy, R.; Flow-injection analysis of hydrogen-peroxide using a horseradish peroxidase-modified electrode detection system. *Electroanalysis* 2 (1990) 303.
- [108] Armstrong, F.A., Bond, A.M., Büchi, F.N., Hamnett, A., Hill, H.A.O., Lannon, A.M., Lettington, O.C. e Zoski, C.G.; Electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at a stationary pyrolytic graphite electrode surface in the presence of cytochrome c peroxidase: A description based on a microelectrode array model for adsorbed enzyme molecules. *Analyst* 118 (1993) 973.
- [109] McCreery, R.L.; Carbon electrodes: structural effects on electron transfer kinetics. In: Bard, A.J. (Ed.) *Electroanalytical Chemistry – a serie of advances*, 17 (1991) 221.
- [110] Tatsuma, T., Okawa Y. e Watanabe, T.; Enzyme monolayer- and bilayer-modified tin oxide electrodes for the determination of hydrogen peroxide and glucose. *Anal. Chem.* 61 (1989) 2352.
- [111] Schubert, F., Saini, S. e Turner, A.P.F.; Mediated amperometric enzyme electrode incorporating peroxidase for the determination of hydrogen peroxide in organic solvents. *Anal. Chim. Acta* 245 (1991) 133.
- [112] Zhao, R.W. Henkens, J. Stonehuerner, J.P.O'Daly e A.L. Crubliiss; Direct electron transfer at horseradish peroxidase-colloidal gold modified electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 327 (1992) 109.



- [113] Sánchez, P.D., Ordieres, A.J.M., García, A.C. e Blanco, P.T.; Peroxidase-ferrocene modified carbon paste electrode as an amperometric sensor for the hydrogen peroxide assay. *Electroanalysis* 3 (1991) 281.
- [114] Wang, J. e Varughese, K.; Polishable and robust biological electrode surfaces. *Anal. Chem.* 62 (1990) 318.
- [115] Ruzgas, T., Emnéus, J., Gorton, L. e Marko-Varga, G.; The development of a peroxidase biosensor for monitoring phenol and related aromatic compounds. *Anal. Chim. Acta* 311 (1995) 245.
- [116] Lindgren, A., Emnéus, J., Ruzgas, T., Gorton, L. e Marko-Varga, G.; Amperometric detection of phenols using peroxidase-modified graphite electrodes. *Anal. Chim. Acta* 347 (1997) 51.
- [117] Munteanu, F.-D., Lindgren, A., Emnéus, J., Gorton, L., Ruzgas, T., Csöregi, E., Ciucu, A., van Huystee, R.B., Gazaryan, I.G. e Lagrimini, L.M.; Bioelectrochemical monitoring of phenols and aromatic amines in flow injection using novel plant peroxidases. *Anal. Chem.* 70 (1998) 2596.
- [118] Kubota, L.T., Gushikem, Y., Castro, S. e Moreira, J.C.; Preparation and characterization of Ti(IV) oxide grafted onto silica on a silica gel surface. *Colloids Surf.* 57 (1991) 11.
- [119] Cass, A.E.G.; *Biosensor a practical approach*. Oxford University Press, 1990, 14.
- [120] APHA; Standard Methods for examination of water and wastewater, 17 ed., New York, Ammer. Publ. Health Ass. n° 5550, 5.67-5.69 (1989).
- [121] Peralta-Zamora, P., Esposito, E., Pelegrini, R., Groto, R., Reys, J. e Duran, N.; Effluent treatment of pulp and paper, and textile industries using immobilised horseradish peroxidase. *Environ. Technol.* 19 (1998) 55.
- [122] APHA; Standard Methods for examination of water and wastewater, 18 ed., New York, Ammer. Publ. Health Ass. n° 5530, 5.30-5.33 (1992).
- [123] Chen, Q., Kenausis, G.L. e Heller, A.; Stability of oxidases immobilized in silica gels. *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 4582.
- [124] Heller, J. e Heller, A.; Loss of activity or gain in stability of oxidases upon their immobilization in hydrated silica: significance of the electrostatic interactions of surface arginine residues at the entrances of the reaction channels. *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 4586.

- [125] Kennedy, J.F. e Cabral, J.M.S.; Immobilisation of biocatalysts by metal link/chelation processes. In Woodward, J. (Ed.) *Immobilised cells and enzymes: a practical approach*, 1985, 19.
- [126] Kennedy, J.F. e Cabral, J.M.S.; Use of titanium etc. species for the immobilization of bioactive compounds – enzymes. *Transition Met. Chem.* 11 (1986) 41.
- [127] Kennedy, J.F. e Kay, I.M.; Hydrous titanium oxides – New supports for the simple immobilization of enzymes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* (1976-(3)) 329.
- [128] Silva, L.R.D., Gushikem Y. e Kubota, L.T.; Horseradish peroxidase enzyme immobilized on titanium(IV) oxide coated cellulose microfibers: study of the enzymatic activity by flow injection system. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 6 (1996) 309.
- [129] Perez, E.F., Oliveira Neto, G., Tanaka, A.A. e Kubota, L.T.; Electrochemical sensor for hydrazine based on silica modified with nickel tetrasulfonated phthalocyanine. *Electroanalysis* 10 (1998) 111.
- [130] Kubota, L.T.; Síntese, caracterização e algumas propriedades do óxido de titânio(IV) enxertado sobre superfície de sílica gel. Tese de Doutorado, Instituto de Química- Unicamp (1993).
- [131] Pospecu, I.C., Zetterberg, G. e Gorton, L.; Influence of graphite powder, additives and enzyme immobilization procedures on a mediatorless HRP-modified carbon paste electrode for amperometric flow-injection detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biosens. Bioelectron.* 10 (1995) 443.
- [132] Amine, A. e Kauffmann, J.; Preparation and characterization of a fragile enzyme immobilized carbon paste electrode. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 28 (1992) 117.
- [133] Yabuki, S., Mizutani, F. e Katsura, T.; Glucose-sensing carbon paste electrode containing polyethylene glycol-modified glucose-oxidase. *Biosens. Bioelectron.* 7 (1992) 695.
- [134] Lutz, E.S.M., Burestedt, E., Ernés, J., Lidén, H., Gobhadi, S., Gorton, L. e Marko-Varga, G.; Effects of different additives on a tyrosinase based carbon paste electrode. *Anal. Chim. Acta* 305 (1995) 8.
- [135] Dantoni, P., Serrano, S.H.P., Brett, A.M.O. e Gutz, I.G.R.; Flow-injection determination of catechol with a new tyrosinase/DNA biosensor. *Anal. Chim. Acta* 366 (1998) 137.

- [136] Vijayakumar, A.R., Csöregi, E., Heller, A. e Gorton, L.; Alcohol biosensors based on coupled oxidase-peroxidase systems. *Anal. Chim. Acta* 327 (1996) 223.
- [137] Jönsson-Pettersson, G.; Reagentless hydrogen peroxide and glucose sensors based on peroxidase immobilized on graphite electrodes. *Electroanalysis* 3 (1991) 741.
- [138] Rosatto, S.S. Freire, R.S., Duran, N. e Kubota, L.T.; Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. Artigo de revisão submetido para publicação na revista *Quim. Nova*.