

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**CURSO DE DOUTORADO EM QUÍMICA – ASSOCIAÇÃO AMPLA**  
**UEL/UEPG/UNICENTRO**

**ROSANA MOSSANHA**

**DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE PREPARAÇÃO DE ELETRODOS A BASE DE**  
**SAM PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS**

Ponta Grossa – PR

2016

**ROSANA MOSSANHA**

**DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE PREPARAÇÃO DE ELETRODOS A BASE DE SAM PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOCENSORES ELETROQUÍMICOS**

Tese apresentada à Universidade Estadual Ponta Grossa, como requisito de Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Inorgânica

Orientadora: Prof. Dra. Christiana Andrade Pessôa

Ponta Grossa – PR

2016

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

Mossanha, Rosana

M913      Diferentes estratégias de preparação de eletrodos a base de SAM para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos/ Rosana Mossanha. Ponta Grossa, 2016.  
137f.

Tese (Doutorado em Química - Área de Concentração: Química Inorgânica), Universidade Estadual de Londrina, Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro-Oeste.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Christiana Andrade Pessoa.

1.Ácido tioláctico. 2.Ácido mercaptoundecanóico. 3.Enzima HRP. 4.SAMmista. 5.Cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano. I.Pessoa, Christiana Andrade. II. Universidade Estadual de Londrina. Universidade Estadual de Ponta Grossa.

CDD: 546

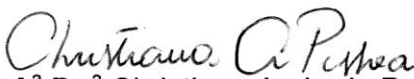
## TERMO DE APROVAÇÃO

**Rosana Mossanha**

**“DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE PREPARAÇÃO DE ELETRODOS A BASE DE SAM PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSORES ELETROQUÍMICOS.”**

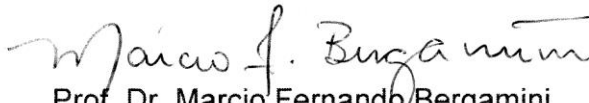
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

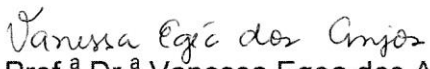
Orientador:

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Christiana Andrade Pessoa  
UEPG/PR

  
Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley  
UEL/PR

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iolanda Cruz Vieira  
UFSC/SC

  
Prof. Dr. Marcio Fernando Bergamini  
UFPR/PR

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Egea dos Anjos  
UEPG/PR

**Ponta Grossa, 23 de fevereiro de 2016.**

*Dedico este trabalho ao meu esposo,  
a minha filha Sofia, a minha mãe Maria  
e aos meus irmãos Cristianny, Samuel e Camila.  
A vocês devo tudo que consegui hoje.  
Obrigada por tudo!!*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente ao bondoso Deus, pela sua presença constante na minha vida, pelo auxílio nas minhas escolhas.

À minha família, minha mãe Maria e irmãos, pelo apoio incondicional, incentivo, força e a amizade sem igual. Sem eles nada disto seria possível.

Ao meu esposo Júnior e a minha filha Sofia por me compreender nas horas que fiquei distante no decorrer deste trabalho, pelo incentivo, apoio e por todo seu amor e carinho.

À minha querida orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Christiana Andrade Pessoa, pela orientação, sábias sugestões, pelo incentivo, amizade, por todos os conhecimentos transmitidos que contribuíram muito para meu desenvolvimento pessoal e crescimento científico.

Aos amigos e colegas que foram ou ainda são do Grupo de Desenvolvimento de Eletrodos Modificados – GDEM. Em especial à Cliciane, Cleverson, Giselle, Dhésmon por estarem sempre me ajudando e tirando minhas dúvidas no laboratório e pela amizade.

Aos professores e colegas do Doutorado em Química

Enfim, a todos que de certo modo contribuíram para que esses anos de doutorado fossem alegres e proveitosos.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão  
uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe  
faltasse uma gota”.*

*Madre Teresa de Calcuta*

## RESUMO

Esta tese descreve a utilização das monocamadas auto-organizadas (SAM) para o desenvolvimento de biossensores enzimáticos a base da enzima *horseradish peroxidase* – HRP. No primeiro capítulo, diferentes biossensores foram desenvolvidos utilizando a SAM de ácido tioláctico (Au/TLA) e também a SAM mista composta por ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) juntamente com o TLA (SAM<sub>mista</sub>). As etapas de construção e caracterização dos biossensores foram realizadas pelas técnicas eletroquímicas e também morfológicas. O método de imobilização da enzima sobre a SAM que proporcionou maior estabilidade foi pela ligação covalente. O biossensor Au/TLA/HRP foi utilizado para a detecção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por cronoamperometria, obtendo-se um limite de detecção (LD) de 5,46 µmol L<sup>-1</sup> e de quantificação (LQ) de 18 µmol L<sup>-1</sup>. Apesar dos bons resultados na detecção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentados por este biossensor, o dispositivo foi estável por apenas 6 dias. Portanto, no intuito de aumentar a estabilidade do biossensor utilizou a molécula de ácido mercaptoundecanóico (MUA) juntamente com TLA, para a formação da SAM<sub>mista</sub> (Au/MUA:TLA). Neste sistema, a velocidade de transferência eletrônica é sensivelmente afetada, pois enquanto o TLA possibilita o aumento da condutividade da SAM<sub>mista</sub> devido a formação de “ilhas”, o MUA confere maior estabilidade à monocamada para a imobilização da enzima HRP, apesar de bloquear parcialmente a superfície. O biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP preparado na razão 0,5:1,0 MUA:TLA apresentou a melhor sensibilidade em comparação as outras modificações, com uma constante de Michaelis-Menten aparente,  $K_M^{app} = 0,40 \text{ mmol L}^{-1}$ . Este biossensor foi aplicado na detecção da hidroquinona (HQ) na presença de uma quantidade fixa de [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0,3 mmol L<sup>-1</sup>. Pela técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD), o biossensor exibiu uma excelente atividade eletrocatalítica para HQ na faixa de 3 a 30 µmol L<sup>-1</sup>, com boa sensibilidade, LD = 1,26 µmol L<sup>-1</sup> e o LQ = 4,23 µmol L<sup>-1</sup>. A SAM<sub>mista</sub> aumentou a estabilidade do biossensor para 15 dias, sendo este mais estável quando comparado ao biossensor Au/TLA/HRP. No segundo capítulo da tese, outra estratégia para a imobilização da enzima HRP sobre o TLA foi realizada a partir de nanopartículas de ouro (AuNps) estabilizadas no cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano (SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>). A presença das AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> foi confirmada pela Espectroscopia UV-Vis a partir da banda plasmon em 521 nm, as quais apresentaram boa distribuição com tamanho aproximado entre 4 a 18 nm, constatado pela microscopia eletrônica de transmissão (MET) e por espalhamento dinâmico de luz (DLS), apresentando boa estabilidade ( $\zeta = + 38,5 \text{ mV}$ ). As AuNps foram incorporadas sobre o eletrodo de carbono vítreo (ECV) e modificadas com o TLA para imobilização da enzima HRP. A formação deste biossensor foi comprovada pela espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e morfológicamente pela microscopia de varredura de efeito de campo (MEV-FEG). O biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP foi utilizado na detecção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com  $K_M^{app} = 0,43 \text{ mmol L}^{-1}$ , sendo próxima ao biossensor Au-SAM<sub>mista</sub>-HRP. Este biossensor foi aplicado na detecção do catecol (CT) na presença de [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0,03 mmol L<sup>-1</sup>. Pela técnica de VPD, o biossensor exibiu uma excelente atividade eletrocatalítica para CT na faixa de 6 a 46 µmol L<sup>-1</sup>, com boa sensibilidade, LD = 0,852 µmol L<sup>-1</sup> e o LQ = 2,84 µmol L<sup>-1</sup>. A estabilidade deste dispositivo é de 25 dias, sendo superior aos outros biossensores desenvolvidos (TLA/HRP e SAM<sub>mista</sub>/HRP) devido a imobilização ocorrer tridimensionalmente aumentando a quantidade de moléculas da TLA e HRP no dispositivo.

**Palavras chave:** ácido tioláctico; ácido mercaptoundecanóico, enzima HRP, SAM<sub>mista</sub>, cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano, nanopartículas de ouro

## ABSTRACT

This thesis describes the use of self-assembled monolayers (SAM) for the development of biosensors based on horseradish peroxidase enzyme - HRP. In the first chapter, the enzyme was immobilized on self-assembled monolayers of thiolactic acid (Au-TLA) and mixed SAM composed of 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) together with the TLA (SAM<sub>mix</sub>). The steps of construction and characterization of biosensors have been carried out by electrochemical techniques and morphological ones. The enzyme immobilization method on SAM which provided higher stability was by covalent bond. The Au/TLA/HRP biosensor was used for the determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by chronoamperometry, yielding a detection limit (DL) of 5.46  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and quantification (QL) of 18  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Despite the good results for the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection presented by this biosensor, the device was stable for only 6 days. Therefore, in order to increase the stability of the biosensor, SAM containing both the mercaptoundecanoic acid molecule (MUA) and TLA was obtained, to the formation of SAM<sub>mix</sub> (Au/MUA:TLA). In this system, the electron transfer rate can be considerably affected because while the TLA enables an increase of SAM<sub>mix</sub> conductivity due to formation of “islands”, the MUA provides greater stability for HRP immobilization, although it partially blocks the surface. The biosensor Au-SAM<sub>mix</sub>-HRP prepared in the ratio 0.5: 1.0 MUA/TLA showed higher sensitivity compared to other modifications ratio, with an apparent Michaelis-Menten constant  $K_M^{app} = 0.40 \text{ mmol L}^{-1}$ . This biosensor has been applied to the determination of hydroquinone (HQ) in the presence of a fixed amount of  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.3 \text{ mmol L}^{-1}$ . By differential pulse voltammetry technique (DPV), the biosensor exhibited excellent electrocatalytic activity for HQ in the range 3-30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , with good sensitivity, DL = 1.26  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and QL = 4.23  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . The SAM<sub>mix</sub> increased the stability of the biosensor for at least 15 days, which is more stable when compared to the biosensor Au/TLA/HRP. In the second chapter of this thesis, another strategy was used for immobilization of the HRP enzyme based on the formation of TLA monolayer on the top of gold nanoparticles (AuNPs) stabilized in the inorganic polymer, 3-n-propylpyridinium silsesquioxane chloride (SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>). The presence of AuNPs-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> was confirmed by UV-Vis spectroscopy from the plasmon band at 521 nm. The AuNPs showed good distribution with approximate size between 4-18 nm, evidenced by transmission electron microscopy (TEM) and by dynamic light scattering (DLS), with good stability ( $\zeta = + 38.5 \text{ mV}$ ). The AuNPs were deposited on the glassy carbon electrode (GCE) and modified with the TLA for immobilization of HRP enzyme. The formation of this biosensor was confirmed by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and morphologically by field-effect scanning electron microscopy (SEM-FEG). The GCE/AuNPs/TLA/HRP biosensor was used for the detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with  $K_M^{app} = 0.46 \text{ mmol L}^{-1}$ , which was similar to the Au-SAM<sub>mix</sub>-HRP biosensor. This biosensor has been applied to the determination of catechol (CT) in presence of  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.03 \text{ mmol L}^{-1}$ . Using the DPV technique, the biosensor showed an excellent electrocatalytic activity for CT in the range 6-46  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , with good sensitivity, DL = 0.852  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and QL = 2.84  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . The stability of this device was approximately 25 days, being superior to other biosensors developed (TLA-HRP and SAM<sub>mix</sub>-HRP), which can be attributed to the three-dimensional immobilization of HRP molecules in this device.

**Keywords:** *thiolactic acid; mercaptoundecanoic acid, HRP enzyme, SAM<sub>mix</sub>, 3-n-propylpyridinium silsesquioxane chloride, gold nanoparticles*

## LISTAS DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Principais métodos de imobilização de enzimas .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 24 |
| <b>Figura 2.</b> Representação esquemática da formação da SAM sobre a superfície metálica .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 26 |
| <b>Figura 3.</b> Representação esquemática da SAM <sub>mista</sub> (A) constituída por moléculas que apresentam diferenças no comprimento da cadeia e (B) possuem grupos terminais distintos. ....                                                                                                                                                                                               | 29 |
| <b>Figura 4.</b> (A) Representação tridimensional da estrutura Horseradish peroxidase. (B) Grupo prostético das enzimas peroxidase denominado grupo heme .....                                                                                                                                                                                                                                   | 31 |
| <b>Figura 5.</b> Estrutura química dos isômeros de hidroxibenzeno: hidroquinona e catecol .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 33 |
| <b>Figura 6.</b> Mecanismo geral do ciclo catalítico da enzima peroxidase (HRP) na presença do composto fenólico.....                                                                                                                                                                                                                                                                            | 34 |
| <b>Figura 7.</b> Moléculas utilizadas no estudo da formação das SAMs.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 38 |
| <b>Figura 8.</b> Esquema da imobilização da enzima HRP sobre a SAM pelo método de adsorção. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 39 |
| <b>Figura 9.</b> Esquema da imobilização da enzima HRP sobre a SAM pelo método de ligação covalente.....                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 39 |
| <b>Figura 10.</b> (A) Voltamogramas cíclicos do Au/TLA em diferentes tempos de imobilização em solução 0,1 mol L <sup>-1</sup> PBS com 0,05 mol L <sup>-1</sup> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>-3/-4</sup> em pH = 6,5 v = 50 mV s <sup>-1</sup> . (B) Dependência do potencial e da corrente de pico anódico com o tempo de imersão do eletrodo Au na solução de TLA 10 mmol L <sup>-1</sup> ..... | 42 |
| <b>Figura 11.</b> Caracterização por (A) voltametria cíclica e (B) espectroscopia de impedância eletroquímica para o eletrodo Au, Au/TLA e Au/TLA/HRP obtido por adsorção e também por ligação covalente contendo 55 U, na presença de 0,05 mol L <sup>-1</sup> de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4</sup> em 0,1 mol L <sup>-1</sup> de PBS em pH = 6,5 (n=3). ....                                 | 44 |
| <b>Figura 12.</b> Representação esquemática da interação entre a SAM e a enzima HRP utilizando os dois métodos de imobilização. ....                                                                                                                                                                                                                                                             | 46 |
| <b>Figura 13.</b> Voltamogramas cíclicos para os eletrodos Au/TLA e Au/TLA/HRP obtidos pelos diferentes métodos na presença de 1 mmol L <sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio, em solução PBS 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 6,5. ....                                                                                                                                                             | 47 |
| <b>Figura 14.</b> (A) Cronoamperogramas dos biossensores obtidos pelos métodos de imobilização covalente e adsorção. (B) Relação entre corrente em função da concentração do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na faixa de 1,98 a 9,17x10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> , potencial de -0,2 V.....                                                                                               | 48 |
| <b>Figura 15.</b> Estudo do tempo de vida dos biossensores obtidos pelos diferentes métodos de imobilização no tampão PBS 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 6,5 na presença de 5,7x10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ..                                                                                                                                             | 49 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 16.</b> Diagramas de Nyquist dos eletrodos Au/TLA e Au/TLA/HRP construídos com diferentes quantidades de unidades enzimáticas na presença de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS, pH = 6,5.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 50 |
| <b>Figura 17.</b> Efeito da quantidade de HRP imobilizada na resposta amperométrica ( $n = 3$ ) do eletrodo de Au/TLA/HRP em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,5 contendo $3,88 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Potencial fixo de $-0,2 \text{ V}$ vs SCE. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 51 |
| <b>Figura 18.</b> Imagens de AFM do (A) eletrodo de Au sem modificação, (B) do Au/TLA e (C) do Au/TLA/HRP.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 53 |
| <b>Figura 19.</b> Espectro de FTIR para o eletrodo Au/TLA, Au/TLA/HRP e a enzima HRP em pastilha de KBr. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 53 |
| <b>Figura 20.</b> (A) Cronoamperogramas do biossensor Au/TLA/HRP para variação da concentração do $\text{H}_2\text{O}_2$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , em potencial fixo de $-0,2 \text{ V}$ e (B) Curva de corrente de redução em função da concentração de $\text{H}_2\text{O}_2$ na faixa de concentração de $1,1$ a $9,17 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 55 |
| <b>Figura 21.</b> (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo de Au, das monocamadas isoladas (Au/TLA e Au/MUA $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e $\text{SAM}_{\text{mista}}$ (obtida a partir de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TLA e $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de MUA). Eletrólito suporte: solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ (B) Gráficos de Nyquist do eletrodo de ouro, Au/MUA, Au/TLA e Au/ $\text{SAM}_{\text{mista}}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , amplitude de pulso de $10 \text{ mV}$ e faixa de frequência de $100 \text{ mHz}$ a $10 \text{ kHz}$ ..... | 58 |
| <b>Figura 22.</b> Voltamogramas de pulso diferencial das diferentes monocamadas em NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , $v = 20 \text{ mVs}^{-1}$ . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 62 |
| <b>Figura 23.</b> (A) Voltamogramas cíclicos das monocamadas mistas obtidas em diferentes concentrações dos tióis ( $0,25$ a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Eletrólito suporte: solução KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Gráficos de Nyquist dos eletrodos Au/(MUA:TLA) nas diferentes proporções, em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ , amplitude de pulso de $10 \text{ mV}$ e faixa de frequência de $10 \text{ kHz}$ a $100 \text{ mHz}$ . ....                                                                                                               | 64 |
| <b>Figura 24.</b> Caracterização por (A) voltametria cíclica e (B) espectroscopia de impedância eletroquímica para o eletrodo Au/MUA:TLA e Au/MUA:TLA/HRP, na presença de $5 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 6,5).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 65 |
| <b>Figura 25.</b> Curvas de intensidade de corrente em função da concentração de $\text{H}_2\text{O}_2$ para o biossensor Au/MUA:TLA/HRP, obtidas por cronoamperometria em diferentes potenciais aplicados, em tampão PBS, pH 6,5. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 66 |
| <b>Figura 26.</b> Comparação da resposta amperométrica do Au/MUA:TLA(0,25:1,0) e Au/MUA:TLA(0,25:1,0)/HRP em diferentes concentrações de $\text{H}_2\text{O}_2$ na faixa de $0,45$ a $0,95 \text{ mmol L}^{-1}$ em Tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,5 e potencial aplicado de $-0,2 \text{ V}$ . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 67 |

- Figura 27.** Relação da intensidade de corrente em relação à concentração do  $\text{H}_2\text{O}_2$  dos diferentes tipos de monocamadas mistas na faixa de concentração de  $1,1$  a  $9,17 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Potencial aplicado  $-0,2 \text{ V}$ , eletrólito suporte tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,5..... 68
- Figura 28.** Dependência da intensidade de corrente em relação à concentração do  $\text{H}_2\text{O}_2$  dos diferentes biossensores Au/TLA/HRP, Au/MUA/HRP e Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP na faixa estudada de concentração de  $1,1$  a  $9,17 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Potencial aplicado  $-0,2 \text{ V}$ , eletrólito suporte tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,5. .... 69
- Figura 29.** Estudo do tempo de vida dos biossensores Au/TLA/HRP e Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP em tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5 na presença do  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ . .... 71
- Figura 30.** (A) Curva de adição de padrão obtida para a determinação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em meio de solução tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,5 na faixa de  $5,83 \times 10^{-5}$  a  $1,26 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para o biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP. Potencial aplicado =  $-0,2 \text{ V}$  vs Ag/AgCl. (B) Gráfico de Duplo recíproco ou Lineweaver and Burk, obtido para o biossensor, Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP. .... 71
- Figura 31.** Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando os eletrodos (--) SAM<sub>mista</sub>, (--) SAM<sub>mista</sub>/HRP e (--) SAM<sub>mista</sub>/HRP na presença do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Solução Tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5 na presença de  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$  de hidroquinona. .... 73
- Figura 32.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o biossensor SAM<sub>mista</sub>/HRP na presença da HQ (concentração fixa de  $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) variando a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na faixa de  $3 \times 10^{-5}$  a  $3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . (B) Dependência da corrente de pico da HQ em função da concentração do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . .... 74
- Figura 33.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial dos eletrodos Au/SAM<sub>mista</sub> e Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP na presença de  $0,29 \text{ mmol L}^{-1}$  de HQ. (B) Curva analítica para HQ para os eletrodos na faixa de  $3,0$  a  $29,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  na presença de  $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . .... 75
- Figura 34.** Voltamogramas cíclicos do biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP em diferentes velocidades de varredura em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  na presença de  $0,29 \text{ mmol L}^{-1}$  de HQ e  $0,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ . .... 76
- Figura 35.** (A) Dependência  $I_{pc}$  com a velocidade de varredura,  $v$  (B) Dependência  $I_{pc}$  com a raiz quadrada da velocidade de varredura,  $v^{1/2}$  do Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP na presença de  $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $0,29 \text{ mmol L}^{-1}$  de HQ em tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  no pH 6,5 ..... 76
- Figura 36.** Dependência linear de  $\log I_{pc}$  vs  $\log v$  para o biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP..... 77
- Figura 37.** Voltamogramas cíclicos do Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP na presença de HQ  $0,29 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5 velocidade de varredura  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . (A) Repetitividade da medida (B) Estabilidade da medida. .... 78
- Figura 38.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos usando o Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$  em diferentes concentrações de solução de hidroquinona na faixa de  $6,0$  a  $29,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  utilizando os parâmetros otimizados:  $E_{pulso} = 0,05 \text{ V}$ , velocidade de varredura =  $0,05 \text{ V s}^{-1}$ , e tempo de pulso =  $0,05 \text{ s}$ . (B) Curva analítica da HQ. .... 79

|                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 39.</b> Mecanismos básicos de estabilização de dispersões coloidais: (A) impedimento estérico e (B) eletrostática. ....                                                                                                                                  | 84  |
| <b>Figura 40.</b> Representação esquemática da estabilização das AuNPs no polímero SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> ...                                                                                                                                           | 91  |
| <b>Figura 41.</b> Espectros eletrônicos de UV-Vis da solução de SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> , HAuCl <sub>4</sub> e dispersão coloidal de AuNps-SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> .....                                                                       | 95  |
| <b>Figura 42.</b> Espectros eletrônicos de UV-Vis das dispersões coloidais de AuNps-SiPy <sup>+</sup> Cl em diferentes concentrações do HAuCl <sub>4</sub> entre 0,1 a 5,0 mmol L <sup>-1</sup> .....                                                              | 97  |
| <b>Figura 43.</b> DLS das dispersões coloidais de AuNps-SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> em diferentes concentrações ..                                                                                                                                           | 98  |
| <b>Figura 44.</b> Potencial Zeta das dispersões coloidais AuNps-SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> na concentração (A) 0,1 mmol L <sup>-1</sup> – (B) 1,0 mmol L <sup>-1</sup> - (C) 5,0 mmol L <sup>-1</sup> .....                                                 | 99  |
| <b>Figura 45.</b> Micrografias obtidas por MET da dispersão coloidal AuNps-SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> de 5,0 mmol L <sup>-1</sup> , com diferentes magnificações. ....                                                                                      | 101 |
| <b>Figura 46.</b> Espectros de FTIR para o polímero SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> e o nanohíbrido AuNps-SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> obtidos em pastilhas de KBr. ....                                                                                    | 102 |
| <b>Figura 47.</b> Espectros de absorção na região do UV-vis da dispersão coloidal AuNps-SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> obtidos em diferentes dias. ....                                                                                                         | 103 |
| <b>Figura 48.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo Au e o ECV-AuNps-SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> em solução H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 mol L <sup>-1</sup> . Velocidade de varredura: 50 mVs <sup>-1</sup> .....                        | 105 |
| <b>Figura 49.</b> Esquema representativo da formação do biossensor ECV/AuNps-TLA-HRP....                                                                                                                                                                           | 106 |
| <b>Figura 50.</b> Micrografias do eletrodo (A) ECV/AuNps, (B) ECV/AuNps/TLA e (C) ECV/AuNps/TLA/HRP .....                                                                                                                                                          | 107 |
| <b>Figura 51.</b> Diagramas de Nyquist para os diferentes eletrodos na presença de 5,0 mmol L <sup>-1</sup> de [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> em KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 6,5.....                                                                | 107 |
| <b>Figura 52.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos para os diferentes sensores em solução PBS 0,1 mol L <sup>-1</sup> na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,2 mmol L <sup>-1</sup> e v = 50 mV s <sup>-1</sup> .....                                        | 109 |
| <b>Figura 53.</b> Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para os diferentes sensores em solução PBS 0,1 mol L <sup>-1</sup> , v = 25 mV s <sup>-1</sup> na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,3 mmol L <sup>-1</sup> . ....                           | 110 |
| <b>Figura 54.</b> Voltamogramas cíclicos do biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP em diferentes velocidades de varredura em solução PBS 0,1 mol L <sup>-1</sup> na presença de 2 mmol L <sup>-1</sup> .....                                                                 | 112 |
| <b>Figura 55.</b> (A) Relação entre a corrente de pico de redução do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e a velocidade de varredura; (B) Relação entre a corrente de pico de redução do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e a raiz quadrada da velocidade de varredura..... | 112 |

**Figura 56.** Dependência linear de  $\log I_{pc}$  vs  $\log v$  para o biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP. .... 113

**Figura 57.** (A) Curva analítica obtida para a adição de padrão para  $H_2O_2$  em meio de solução tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,5 na faixa de  $0,1$  a  $1,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para o biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP. (B) Gráfico de Duplo recíproco ou Lineweaver and Burk, obtido para o biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP. .... 114

**Figura 58.** Voltamogramas cíclicos do ECV, ECV/AuNps, ECV/AuNps/TLA e ECV/AuNps/TLA/HRP na presença de catecol  $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  em tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5. .... 115

**Figura 59** (A) Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo de ECV/AuNps/TLA/HRP variando-se a concentração  $H_2O_2$  na faixa de  $0,01$  a  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$  na presença de uma concentração fixa de CT  $0,18 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (B) Dependência da corrente de pico da CT em função da concentração do  $H_2O_2$ . .... 116

**Figura 60.** Voltamogramas cíclicos do biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP em diferentes velocidades de varreduras na presença de  $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $H_2O_2$  e  $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$  de CT em tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  no pH 6,5. .... 117

**Figura 61.** (A) Dependência  $I_{pc}$  com a velocidade de varredura, (B) Dependência  $I_{pc}$  com a raiz quadrada da velocidade de varredura, do ECV/AuNps/TLA/HRP na presença de  $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $H_2O_2$  e  $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$  de CT em tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  no pH 6,5. .... 118

**Figura 62.** Dependência linear de  $\log I_{pc}$  vs  $\log v$  para o biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP. .... 118

**Figura 63.** Voltamogramas cíclicos do ECV/AuNps/TLA/HRP na presença de CT  $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . (A) Repetitividade de medida (B) Relação entre  $I_{pc}$  e o número de ciclos voltamétricos. .... 119

**Figura 64.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo ECV/AuNps/TLA/HRP na presença de  $[H_2O_2] = 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$  em diferentes concentrações de solução de catecol na faixa de  $6,0$  a  $46,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  utilizando os parâmetros otimizados:  $E_{pulso} = 0,05 \text{ V}$ , velocidade de varredura  $= 0,05 \text{ V s}^{-1}$ , e tempo de pulso  $= 0,05 \text{ s}$ . (B) Relação entre a corrente de pico e a concentração de catecol. .... 120

## LISTAS DE TABELAS

|                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1.</b> Parâmetros eletroanalíticos dos diferentes eletrodos na presença da molécula sonda .....                      | 45  |
| <b>Tabela 2.</b> Comparação dos diferentes eletrodos utilizando a enzima HRP para detecção do $H_2O_2$ .....                   | 56  |
| <b>Tabela 3.</b> Parâmetros eletroquímicos dos diferentes eletrodos na presença da molécula sonda .....                        | 65  |
| <b>Tabela 4.</b> Características dos biossensores obtidas com os diferentes eletrodos de SAM mistas. ....                      | 68  |
| <b>Tabela 5.</b> Comparação de sensibilidade entre os biossensores Au/TLA/HRP, Au/MUA/HRP e Au/SAM <sub>mista</sub> /HRP. .... | 70  |
| <b>Tabela 6.</b> Comparação com outros diferentes eletrodos modificados para determinação de HQ. ....                          | 80  |
| <b>Tabela 7.</b> Tamanho e intensidade dos picos das diferentes sínteses AuNps-SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> .....         | 98  |
| <b>Tabela 8.</b> Acompanhamento da estabilidade da dispersão coloidal. ....                                                    | 104 |
| <b>Tabela 9.</b> Valores de resistência de transferência de carga dos diferentes eletrodos .....                               | 108 |
| <b>Tabela 10.</b> Valores de $E_{pc}$ , $I_{pc}$ e sensibilidade dos diferentes eletrodos na presença de $H_2O_2$ .....        | 111 |
| <b>Tabela 11.</b> Comparação do valor de <b><i>KM<sub>app</sub></i></b> para diferentes biossensores enzimáticos .....         | 114 |
| <b>Tabela 12.</b> Parâmetros eletroanalíticos (potencial e corrente de pico) dos diferentes eletrodos na presença de CT.....   | 116 |
| <b>Tabela 13.</b> Comparação com diferentes eletrodos modificados para determinação de CT...121                                |     |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Theta$  - grau de recobrimento

$\zeta$  - potencial zeta

**AFM** – microscopia de força atômica

**Ag/AgCl** – eletrodo de referencia prata/cloreto de prata

**AuNps** – nanopartículas de ouro

**Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP** – eletrodo de ouro modificado com monocamada auto-organizada mista e a enzima *horseradish peroxidase*

**ChOx** – colesterol oxidase

**CT** – catecol

**DLS** - espalhamento de luz dinâmico

**ECV** – eletrodo de carbono vítreo

**EDC** - cloridrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

**EDTA** - ácido etilenodiamino tetra-acético

**EIE** – espectroscopia de impedância eletroquímica

**E<sub>pa</sub>** – potencial de pico anódico

**E<sub>pc</sub>** – potencial de pico catódico

**E<sub>pulso</sub>** – potencial de pulso

**FTIR** - espectroscopia na Região do Infravermelho (*FTIR*, Fourier Transform Infrared)

**GOx** – enzima glucose oxidase

**HQ** - hidroquinona

**HRP** – enzima *horseradish peroxidase*

**I<sub>pa</sub>** – corrente de pico anódica

**I<sub>pc</sub>** – corrente de pico catódica

**K<sub>app</sub>** – constante aparente de velocidade

**K<sub>M</sub><sup>app</sup>** – constante de Michaelis-Menten aparente

**LD** – limite de detecção

**LQ** – limite de quantificação

**MET** - microscopia eletrônica de transmissão

**MNPs** - nanopartículas metálicas

**MUA** – ácido 11-mercaptopundecanóico

**MWCNT** – nanotubos de carbono

**NHS** - N-Hidroxisuccinimida

**Nps** – nanopartículas

**PAMAM** – poliamidoamina

**PBS** – tampão Fosfato Salino

**Rct** – resistência de transferência de carga

**SAM** – monocamadas auto-organizadas

**SAM<sub>mista</sub>** - monocamadas auto-organizadas mistas

**SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>** - cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano

**SCE** – eletrodo de referencia calomelano saturado ( $\text{Hg} \mid \text{Hg}_2\text{Cl}_2 \mid \text{Cl}^-$ )

**TLA** – ácido tioláctico

**TTF** – tetratiofulvaleno

**U** - unidades enzimáticas

**UV-Vis** - espectroscopia na região do ultravioleta-visível

**v** - velocidade de varredura de potencial

**VC** – voltametria cíclica

**VPD** – voltametria de pulso diferencial

## Sumário

|                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO.....                                                                                                                 | 20 |
| CAPÍTULO 1 .....                                                                                                                | 22 |
| 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                                                                                   | 23 |
| 1.1 Moléculas biológicas imobilizadas sobre eletrodos para a construção de biossensores                                         | 23 |
| 1.2 Métodos de imobilização enzimática para aplicação em biossensores .....                                                     | 24 |
| 1.3 Monocamadas auto-organizadas (SAM) para imobilização enzimática .....                                                       | 26 |
| 1.4 Monocamadas auto-organizadas mistas (SAM <sub>mistas</sub> ) para obtenção de biossensores.....                             | 28 |
| 1.5 Considreações gerais sobre a Enzima Horseradish peroxidase (HRP).....                                                       | 31 |
| 1.6 Utilização da enzima HRP para detecção de compostos fenólicos .....                                                         | 33 |
| 2 OBJETIVO GERAL.....                                                                                                           | 36 |
| 2.1 Objetivos específicos.....                                                                                                  | 36 |
| 3 METODOLOGIA.....                                                                                                              | 37 |
| 3.1 Equipamentos e reagentes .....                                                                                              | 37 |
| 3.2 Preparação de filmes SAM .....                                                                                              | 37 |
| 3.2.1 Limpeza da superfície do eletrodo de ouro.....                                                                            | 37 |
| 3.2.2 Preparação da monocamada de ácido tioláctico (TLA) e ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) e monocamada mista (MUA/TLA)..... | 38 |
| 3.3 Imobilização enzimática sobre as monocamadas .....                                                                          | 38 |
| 3.4 Caracterização dos eletrodos modificados por técnicas eletroquímicas.....                                                   | 40 |
| 3.5 Estudo da potencialidade dos eletrodos modificados como sensores eletroquímicos ....                                        | 40 |
| 3.6 Caracterização morfológica.....                                                                                             | 41 |
| 3.7 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR, Fourier Transform Infrared) .....                                          | 41 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                                                   | 42 |
| 4.1 Monocamadas auto-organizadas de ácido tioláctico .....                                                                      | 42 |
| 4.1.1 Formação das monocamadas auto-organizadas de ácido tioláctico .....                                                       | 42 |
| 4.1.2 Formação do biossensor Au/TLA/HRP .....                                                                                   | 44 |
| 4.1.3 Avaliação do método de imobilização da HRP.....                                                                           | 45 |
| 4.1.4 Efeito da concentração da enzima HRP sobre a resposta do biossensor.....                                                  | 50 |
| 4.1.5 Caracterização do biossensor do Au/TLA/HRP .....                                                                          | 52 |
| 4.1.6 Detecção de peróxido de hidrogênio usando o biossensor Au/TLA/HRP .....                                                   | 55 |
| 4.2 Monocamadas auto-organizadas mistas de ácido tioláctico e ácido 11-mercaptoundecanóico .....                                | 57 |

|                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.1 Formação das monocamadas auto-organizadas mistas de ácido tioláctico e ácido 11-mercaptoundecanóico ( $SAM_{mista}$ ).....    | 57  |
| 4.2.2 Dessorção redutiva das monocamadas auto-organizadas de ácido tioláctico, ácido 11-mercaptoundecanóico e mistura de ambos..... | 61  |
| 4.2.3 Influência da concentração dos tióis na formação da monocamada mista.....                                                     | 63  |
| 4.2.4 Imobilização da enzima HRP sobre a $SAM_{mista}$ .....                                                                        | 64  |
| 4.2.5 Monocamadas auto-organizadas mistas utilizadas como biossensores.....                                                         | 67  |
| 4.2.6 Detecção da Hidroquinona utilizando o biossensor Au/ $SAM_{mista}$ /HRP.....                                                  | 72  |
| 4.2.7 Efeito da velocidade de varredura na presença da Hidroquinona.....                                                            | 75  |
| 4.2.8 Estudo da repetitividade e estabilidade da medida do biossensor.....                                                          | 78  |
| 4.2.9 Curva analítica obtida pela técnica de voltametria de pulso diferencial para o Biossensor Au/ $SAM_{mista}$ /HRP.....         | 79  |
| 5 CONCLUSÃO.....                                                                                                                    | 81  |
| CAPÍTULO 2.....                                                                                                                     | 82  |
| 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                                                                                                        | 83  |
| 1.1 Nanopartículas metálicas.....                                                                                                   | 83  |
| 1.2 Aplicação de nanopartículas metálicas como sensores e biossensores.....                                                         | 86  |
| 2 OBJETIVO GERAL.....                                                                                                               | 90  |
| 2.1 Objetivos específicos.....                                                                                                      | 90  |
| 3 METODOLOGIA.....                                                                                                                  | 91  |
| 3.1 Síntese das nanopartículas.....                                                                                                 | 91  |
| 3.2 Caracterização pela Espectroscopia de UV-Vis.....                                                                               | 91  |
| 3.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....                                                                                         | 92  |
| 3.4 Potencial Zeta.....                                                                                                             | 92  |
| 3.5 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....                                                                                | 92  |
| 3.6 Espectroscopia na região do Infravermelho.....                                                                                  | 92  |
| 3.7 Microscopia Eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV/FEG).....                                                         | 93  |
| 3.8 Preparo e caracterização do eletrodo ECV/AuNps/TLA/HRP.....                                                                     | 93  |
| 3.9 Estudo da potencialidade do eletrodo ECV/AuNps/TLA/HRP como sensor eletroquímico.....                                           | 93  |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....                                                                                                      | 95  |
| 4.1 Síntese e caracterização das Nanopartículas de Ouro.....                                                                        | 95  |
| 4.2 Preparação e caracterização do Biossensor enzimático.....                                                                       | 105 |
| 4.3 Caracterização eletroquímica dos diferentes sensores na presença do peróxido de hidrogênio.....                                 | 109 |
| 4.4 Cinética enzimática.....                                                                                                        | 113 |
| 4.5 Determinação do Catecol utilizando o ECV/AuNps/TLA/HRP.....                                                                     | 115 |

|                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.6 Estudo da repetitividade e estabilidade da medida do biossensor .....      | 119 |
| 4.7 Aplicação analítica voltamétrica para o biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP ..... | 120 |
| 5 CONCLUSÕES .....                                                             | 122 |
| CAPÍTULO 3 – CONCLUSÃO GERAL.....                                              | 123 |
| CAPÍTULO 4 - PERSPECTIVAS FUTURAS .....                                        | 124 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                               | 125 |

## INTRODUÇÃO

A intensificação dos problemas ambientais vinculados diretamente com as atividades humanas, principalmente as industriais e farmacológicas, tem acelerado o desenvolvimento de novas metodologias de análise. Assim, novas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de obter uma metodologia de análise capaz de fornecer seletividade, baixo custo e facilidade na construção e que possa ser usada na construção de equipamentos simples e portáteis. Fundamentado nisto, a utilização de eletrodos quimicamente modificados (EQM) para o desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos é uma das áreas de destaque dentro da Química <sup>[1, 2]</sup>.

Dentre as estratégias bastante utilizadas para a modificação de superfícies eletródicas destacam-se as monocamadas auto-organizadas (SAMs). São fáceis de serem formadas, normalmente apresentam estruturas ordenadas e razoável estabilidade por um longo período de tempo, permitindo sua utilização por um grande número de medidas. Como as SAMs podem formar membranas que assemelham ambientes celulares, possuem a habilidade de proteger as moléculas biocatalíticas da desnaturação, normalmente observada durante a interação com eletrodos não modificados <sup>[3,4]</sup>. Assim, estes filmes possibilitam a funcionalização com biomoléculas.

Outra possibilidade para melhorar o desempenho do eletrodo modificado com SAM é a incorporação de nanopartículas metálicas. As nanopartículas são especialmente úteis devido as suas propriedades únicas, pela possibilidade de controle de tamanho, elevada área superficial e fácil funcionalização. Esta funcionalização aumenta a especificidade para a ligação das biomoléculas permitindo a formação dos biossensores <sup>[5]</sup>.

Dentre as biomoléculas mais utilizadas para a confecção de biossensores, destacam-se as enzimas, as quais são catalisadores biológicos que intermediam várias reações. Neste contexto, o desenvolvimento desse trabalho deu-se pela necessidade de investigar as potencialidades de sistemas auto-organizados juntamente com a incorporação da enzima *horseradish peroxidase* (HRP). As peroxidases pertencem a classe das óxido-redutase, a qual na presença de peróxido de hidrogênio, catalisa a oxidação de diversos compostos fenólicos, sendo vantajosa para determinação dessas substâncias. Atualmente encontra-se um grande número de poluentes orgânicos, possuindo uma estrutura fenólica. Esta classe de compostos representam as implicações ambientais e biológicas associadas ao fenol, intimamente

relacionadas com sua concentração no ambiente.<sup>[6]</sup> Portanto a importância do desenvolvimento de dispositivos para a detecção e quantificação destes poluentes, com rapidez, seletividade e sensibilidade, características encontradas especialmente nos biossensores a base da enzima HRP.

Este trabalho teve como objetivo investigar diferentes estratégias de preparação de eletrodos a base de SAM para a imobilização da enzima horseradish peroxidase (HRP) e obtenção do biossensores eletroquímicos. A tese foi dividida em capítulos para melhor exposição e compreensão dos diferentes biossensores com a enzima HRP desenvolvidos. Assim, no primeiro capítulo da tese, foram abordados dois métodos de imobilização da enzima HRP sobre a molécula de ácido tioláctico (TLA), além da utilização da monocamada auto-organizada mista composta por TLA e ácido mercaptoundecanóico (MUA). Após caracterização, o biossensor contendo a SAM<sub>mista</sub>, foi aplicado para a detecção do composto fenólico hidroquinona. No segundo capítulo, outra estratégia foi utilizada para imobilização da enzima HRP sobre a monocamada de TLA. Neste estudo a SAM foi formada sobre nanopartículas de ouro estabilizadas no polímero inorgânico/orgânico cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano (AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>) em eletrodo de carbono vítreo. O biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP obtido foi utilizado na detecção do catecol.

## **CAPÍTULO 1**

### **MONOCAMADAS MISTAS DE ÁCIDO TIOLÁCTICO E ÁCIDO 11-MERCAPTOUNDECANÓICO PARA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS**

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Moléculas biológicas imobilizadas sobre eletrodos para a construção de biossensores

A Bionanotecnologia é a área relacionada com os estudos das aplicações de biomoléculas em dispositivos de base nanotecnológica para obtenção de biossensores <sup>[7, 8, 9]</sup>, no intuito de desenvolver metodologias confiáveis com níveis de detecção baixos. Um biossensor é definido como dispositivo analítico contendo um elemento biológico, sendo capaz de reconhecer determinada substância, o qual se encontra conectado ou integrado em um transdutor que converte uma resposta biológica em um sinal eletrônico ou óptico proporcional à concentração do composto a ser detectado <sup>[10]</sup>.

O funcionamento do biossensor está relacionado ao tipo de biomolécula imobilizada, como exemplo podemos citar os imunossensores. Nesse caso, o funcionamento do dispositivo é baseada na habilidade do anticorpo (Ac) formar complexo com o correspondente antígeno (Ag) o que é essencial, pois não somente a sensibilidade deve ser considerada, mas também a especificidade <sup>[11]</sup>. Outra aplicação de incorporação de biomoléculas sobre eletrodos refere-se aos biossensores de DNA ou genossensores <sup>[12, 13]</sup>, devido à detecção de sequências específicas de bases em ácidos nucléicos humanos, virais e bacterianos, as quais são importantes no diagnóstico de doenças. No entanto, os elementos biológicos mais empregados na confecção dos biossensores são as enzimas, podendo ser utilizadas na sua forma purificada ou através de extratos vegetais <sup>[14]</sup>. As enzimas são catalisadores biológicos usados em reações com substrato específico, porém com maior reversibilidade do complexo enzima-substrato formado <sup>[15]</sup>, diferentemente do modo de ação dos anticorpos, os quais se ligam especificamente com o antígeno correspondente, mas na maioria das vezes, sem efeito catalítico.

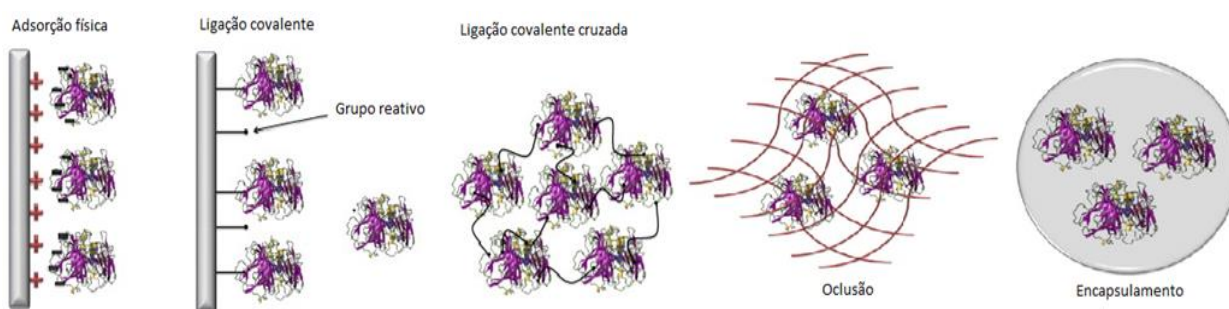
Devido às suas propriedades de especificidade, alta seletividade e sensibilidade, as enzimas têm sido largamente usadas como material biológico na construção de biossensores <sup>[16]</sup>, sendo ferramentas promissoras para suplementar as técnicas existentes. Assim, novas tecnologias têm sido desenvolvidas, a fim de permitirem a imobilização de enzimas em sistemas eletródicos para confecção de biossensores com elevada estabilidade <sup>[17, 18]</sup>.

## 1.2 Métodos de imobilização enzimática para aplicação em biossensores

As enzimas são catalisadores biológicos usados em reações com substrato específico [17, 19], sendo um dos elementos biológicos mais empregados na confecção de biossensores [20], devido às suas propriedades de especificidade, alta seletividade e sensibilidade [15, 16]. A imobilização de enzimas é a etapa mais importante para o desenvolvimento de biossensores. As biomoléculas têm que manter a sua estrutura e principalmente sua função, para preservar a sua atividade biológica após imobilização, sem prejuízo a sua funcionalidade permanecendo firmemente fixadas à superfície para não serem lixiviadas durante a utilização do biossensor [21].

Cada método de imobilização apresenta vantagens e desvantagens. A escolha da técnica mais adequada depende da natureza da enzima, o transdutor e o modo de detecção desejado [22]. Diversos métodos de imobilização do material biológico podem ser citados tais como: adsorção; ligação covalente [23]; ligação covalente cruzada [24] (“crosslinking”); oclusão [25] e encapsulamento.

**Figura 1.** Principais métodos de imobilização de enzimas



Fonte: Adaptado [22]

A adsorção da enzima é o modo mais simples e rápido de imobilização, baseia-se em interações do tipo iônicas, polar, ligações de hidrogênio entre a enzima e a superfície da matriz. No trabalho Shin *et al* [26] a colesterol oxidase foi imobilizada sobre as nanofibras de polianilina por meio de adsorção eletrostática pelo método “Layer-by-Layer”. O nível de adsorção foi examinado através da técnica de microbalança de cristal de quartzo. O biossensor fabricado a partir dessas nanofibras foi utilizado para determinações de solução padrão de colesterol pela técnica amperométrica, obtendo boa resposta na faixa de 0,05 a 0,40 mmol L<sup>-1</sup> para a

determinação da concentração de colesterol. Neste método de imobilização pela adsorção a atividade enzimática normalmente é preservada, entretanto pode ocorrer lixiviação da enzima da superfície do eletrodo.

O método da ligação covalente fornece uma imobilização mais estável da enzima sobre o eletrodo, diminuindo a lixiviação, sendo este o mais comumente empregada. No entanto, o método apresenta alta possibilidade de diminuição ou mesmo perda da atividade enzimática devido à reação com grupos funcionais do centro ativo da enzima, como também pela deformação da estrutura tridimensional da mesma. Yadav *et al* <sup>[27]</sup> imobilizaram três enzimas, a creatinina amidohidrolase, amidinohidrolase creatina e oxidase sarcosina por meio da ligação covalente do N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) e de N-hidroxisuccinimida (NHS) com os grupos carboxilatos do nanotubo de carbono de paredes múltiplas (c-MWCNT)/polianilina (PANI) sobre a superfície de um eletrodo de platina (Pt). O biossensor fabricado foi empregado para determinação da creatinina em soro humano, mostrando perda de somente 15% na resposta inicial quando estocado por 180 dias na temperatura de 4°C, apresentando boa estabilidade na imobilização do material biológico.

Outro método descrito de imobilização enzimática em eletrodos é pela ligação covalente cruzada (*crosslinking*). A imobilização é baseada na formação de um sistema reticulado das moléculas da enzima, formando uma rede rígida. O glutaraldeído é um dos reagentes de ligação cruzada mais utilizados. Entretanto, é possível que a integridade da enzima não seja totalmente conservada após a etapa de ligação, além de dificuldades na reprodutibilidade do eletrodo e de induzir a formação de barreiras de difusão. Isto pode acarretar aumento do tempo de resposta e baixo desempenho do biossensor. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Santos *et al* <sup>[28]</sup>, no qual imobilizaram sobre a monocamada de poliamidoamina-cistamina de quarta-geração (PAMAM-G4) a enzima acetilcolinesterase, utilizando o glutaraldeído por meio da ligação cruzada. Esta imobilização apresentou boa estabilidade, o qual pode ser utilizado pelo menos por 5 dias sem perda da resposta.

Os métodos de oclusão são baseados no confinamento da enzima dentro dos espaços intersticiais de um gel, permitindo a livre difusão de substratos de baixo peso molecular e dos produtos da reação, não provocando alteração estrutural da enzima <sup>[29]</sup>. Conzuelo *et al* <sup>[25]</sup> utilizaram o método de oclusão para imobilizar as enzimas  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal), glicose oxidase (GOD), peroxidase (HRP) por meio de uma membrana de diálise e o mediador tetratiofulvaleno (TTF) sobre um eletrodo de ouro modificado com o ácido 3-mercaptopropiônico. Este biossensor formado foi aplicado na determinação de lactose no leite

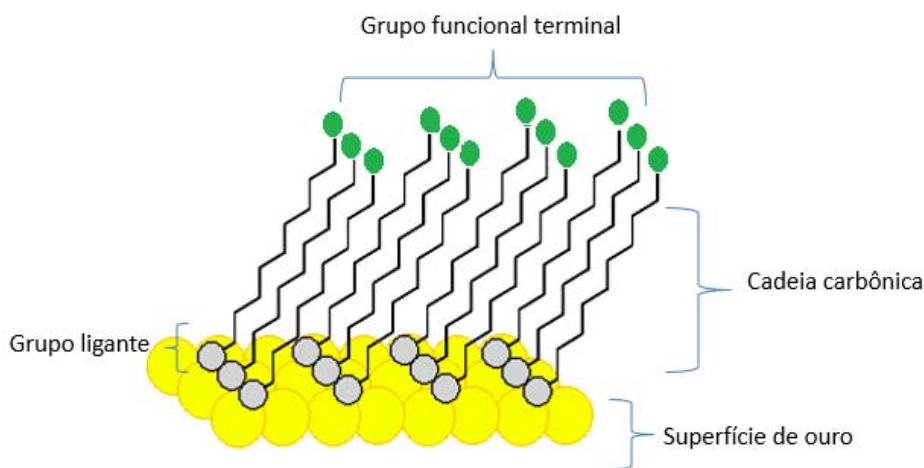
e seus derivados, apresentando uma boa repetibilidade e boa reprodutibilidade das medições realizadas com o mesmo biocompósito, com um tempo de vida útil de 28 dias. No entanto, esta metodologia pode promover limitações de transferência de massa e baixa da atividade enzimática.

Assim, ao escolher o procedimento de imobilização do material biológico deve-se analisar cuidadosamente os efeitos de cada método, pois estes podem provocar mudanças conformacionais, afetando muitas vezes a atividade enzimática do eletrodo. Muitas vezes, apenas uma pequena porcentagem das biomoléculas permanece ativa e mantém a capacidade de interação com o analito.

### 1.3 Monocamadas auto-organizadas (SAM) para imobilização enzimática

O processo de formação das monocamadas auto-organizadas <sup>[30]</sup> ocorre pela ligação do grupo tiol (grupo ligante) sobre a superfície do substrato metálico (geralmente eletrodo de ouro) via uma ligação covalente extremamente forte e estável. Esta interação ocorre de forma rápida, seguida de uma segunda etapa, mais lenta, onde verifica-se a organização da molécula sobre o substrato por meio de interações intermoleculares Van der Waals entre as cadeias carbônicas e as moléculas de tiol. Os grupos funcionais na outra extremidade da molécula controlam as propriedades da superfície do eletrodo, conforme Figura 2.

**Figura 2.** Representação esquemática da formação da SAM sobre a superfície metálica



Fonte: a autora

Monocamadas auto-organizadas (SAMs) têm despertado muito interesse devido às suas potenciais aplicações em biossensores, eletrônica biomolecular e nanotecnologia <sup>[31, 32]</sup>, também

à sua homogeneidade, facilidade de preparação e possibilidade de variar tanto o comprimento das cadeias, como os grupos funcionais terminais. Essa versatilidade na variação do grupo funcional permite que sejam obtidas superfícies com características hidrofóbicas ou hidrofílicas e ainda, possibilitam uma boa imobilização para compostos biocataliticamente ativos <sup>[33]</sup>.

As biomoléculas imobilizadas diretamente sobre a superfície do metal não é uma estratégia adequada, porque, em geral, produz uma modificação fraca da superfície que não resiste a agitação, lavagem e o substrato muitas vezes não é biocompatível e inativa a biomolécula. A fim de evitar este tipo de incompatibilidade, as monocamadas auto-organizadas são interessantes, pois oferecem várias propriedades atraentes para incorporação de biomoléculas <sup>[34]</sup>. A imobilização de biomoléculas sobre a SAM requer pouca quantidade de material biológico em relação aos outros tipos de eletrodos, tais como os eletrodos compósitos <sup>[35]</sup>. Assim reduz o custo do dispositivo sem perda na resposta eletroquímica de analitos alvos. A utilização da SAM apropriada ajuda na imobilização orientada e controlada de biomoléculas <sup>[32]</sup>. As SAMs podem ser usadas para prevenir a desnaturação da proteína a uma superfície eletródica e para aumentar a estabilidade de biomoléculas. Isto ocorre, pois as monocamadas podem formar membranas que se assemelham a ambientes celulares, tornando-se adequadas para a imobilização de biomoléculas. Por exemplo, Patil *et al* <sup>[36]</sup> investigaram o desempenho do biossensor formado a partir da imobilização da ascorbato oxidase pelo método de adsorção física sobre a monocamada auto-organizada de L-cisteína sobre eletrodo de ouro. Os estudos realizados sugeriram que a SAM proporcionou uma melhor plataforma para imobilização da enzima garantindo uma melhor sensibilidade para a oxidação do ácido ascórbico assim como a redução de oxigênio.

Outro exemplo da aplicação de SAM para obtenção de biossensores enzimáticos, destacam-se os sensores para a determinação do colesterol. Arya *et al* <sup>[4]</sup> utilizaram um eletrodo de ouro sobre o qual depositou um filme de octadecanotiol (ODT) para a formação da SAM. Este filme foi modificado através da reação nitreno de 1-fluoro-nitro-2-4-azidobenzeno (FNAB) para ocorrer a ligação covalente com a colesterol oxidase (ChOx) por meio de reação térmica. A FNAB atua como uma ponte (*cross-linker*) entre SAM e ChOx. Este biossensor foi utilizado para a detecção de colesterol em solução pela técnica de ressonância de plasma de superfície (SPR) e apresentou boa linearidade 50-500 mg dL<sup>-1</sup> de colesterol em solução com baixo limite de detecção de 50 mg dL<sup>-1</sup> e vida útil de cerca de dois meses quando armazenado a 4°C.

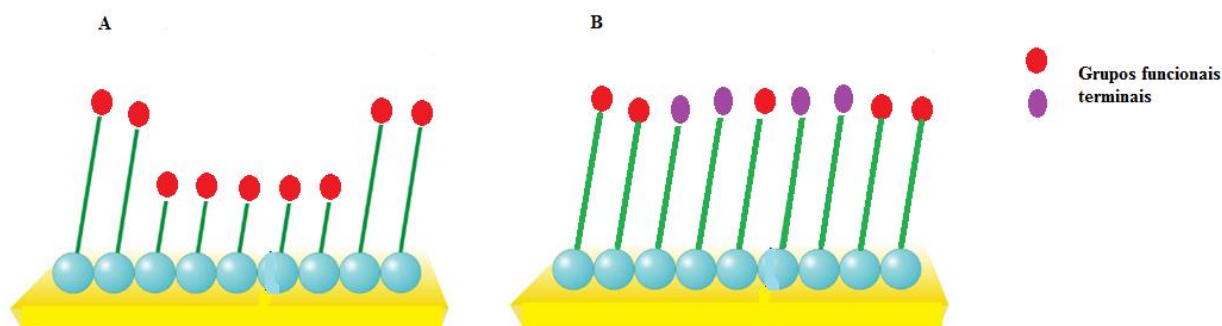
Wang *et al* <sup>[37]</sup> preparam biossensores a partir da imobilização da glucose oxidase (GOx) sobre três tipos de SAM: ácido 11-mercaptopundecanóico (MUA), ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) e ácido 4-mercaptobenzóico (MBA) e posteriormente coberta por filmes Langmuir Blodgett (LB) contendo nanopartículas de azul da prússia (PB) como mediador de elétrons para a enzima. Foi observado que a sensibilidade é significativamente afetada pela condutividade da camada de SAM, como no MBA, o qual apresentou maior sensibilidade e estabilidade em conjunto com o menor tempo de resposta. O MBA se destaca na preparação do biossensor entre as moléculas estudadas, devido à presença do anel aromático, que permite a formação de camadas de MBA com alta propriedade de condutividade. O biossensor Au-MBA-Gox apresentou um limite de detecção de  $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , sensibilidade de  $50 \text{ nA}/(\text{cm}^2 \text{ mM})$ , e uma linearidade estável a longo prazo (13-14 dias) variando a partir da faixa linear de concentração de  $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $70 \text{ mmol L}^{-1}$ .

As monocamadas auto-organizadas proporcionam um ambiente favorável a co-imobilização enzimática, como no trabalho de Asav *et al* <sup>[38]</sup>. Neste trabalho foi desenvolvido um biossensor enzimático contendo, duas enzimas (alcool oxidase e a glucose oxidase) e o mediador, TTF (tetratiofulvano) imobilizados por reticulação entre o glutaraldeído e a monocamada auto-organizada de cisteamina formada sobre um eletrodo disco de ouro. O biossensor foi utilizado para a detecção seletiva de etanol e de glicose através da amperometria, sendo monitorados os valores de corrente pelo potencial de redução do  $\text{TTF}^+$  em  $0,1\text{V}$ . Os limites de detecção do biossensor para o etanol e glicose foram calculados como sendo  $0,75$  e  $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente.

#### **1.4 Monocamadas auto-organizadas mistas ( $\text{SAM}_{\text{mistas}}$ ) para obtenção de biossensores**

Uma estratégia para melhorar a resposta eletroquímica dos biossensores é a formação de SAMs contendo uma mistura bem definida de distintas estruturas moleculares formando as chamadas SAMs mistas <sup>[39]</sup>. Assim, as SAMs mistas têm sido extensivamente estudadas <sup>[40]</sup>, essas superfícies são atraentes na concepção, modelagem e controle das propriedades de superfície de eletrodos. Essas superfícies podem ser constituídas por duas ou mais moléculas que possuem grupos funcionais terminais distintos como  $-\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$  ou também formadas por moléculas que apresentem diferenças no comprimento da cadeia carbônica <sup>[41]</sup>, conforme representação da Figura 3.

**Figura 3.** Representação esquemática da SAM<sub>mista</sub> (A) constituída por moléculas que apresentam diferenças no comprimento da cadeia e (B) possuem grupos terminais distintos.



Fonte: a autora

Como o grupo terminal também pode influenciar a organização da SAM, monocamadas obtidas a partir de uma mistura de alcanotióis com diferentes grupos terminais possibilitam a obtenção de superfícies com múltiplas funcionalidades <sup>[42]</sup>. A mistura de monocamadas auto-organizadas contendo grupos funcionais distintos e de comprimento de cadeia próximos foi descrita por Ji *et al* <sup>[43]</sup>. A SAM mista formada pelo ácido tióctico (T-COOH) e a amida do ácido tióctico (T-NH<sub>2</sub>) foi utilizada como plataforma para imobilizar a enzima tirosinase para a fabricação do biossensor. A SAM mista contendo grupos -COOH e -NH<sub>2</sub> pode formar ligação de hidrogênio mais estável com a tirosinase, em comparação a SAM pura. Além disso, a tirosinase é carregada negativamente em solução neutra (ponto isoeletrico = 4,7) e com o aumento do T-NH<sub>2</sub> na mistura ocorre o aumento da carga positiva na SAM, proporcionando a atração eletrostática entre a tirosinase e a superfície. Os melhores resultados foram obtidos com a SAM mista preparada na proporção 1:4 (COOH:NH<sub>2</sub>) obtendo um excelente meio para a reação enzimática entre a tirosinase e o substrato.

Dependendo do comprimento das cadeias, as monocamadas podem variar de altamente densas, para cadeias longas, superiores ou iguais a 10 carbonos, a pouco densas e parcialmente desordenadas, com cadeias curtas. A utilização de SAM mistas pode ser útil para aumentar a estabilidade do filme e também diminuir o impedimento estérico, permitindo que mais biomoléculas possam ancorar nas extremidades das SAM. Isto ocorre, pois, as cadeias menores podem atuar como espaçadores de modo a minimizar a agregação das biomoléculas e as de cadeia longa permitem o ancoramento destas. O trabalho de Sosna *et al* <sup>[44]</sup> descreve a formação de SAMs mistas obtida pela mistura da molécula de 11-amino-1-undecanotiol (AUT) com mercaptohexanol (MH) - AUT/MH e também com mercaptoetanol (ME) - AUT/ME. As duas SAMs mistas obtidas foram covalentemente modificadas com hemina e usadas como uma

plataforma para a reconstituição da *Horseradish peroxidase* (HRP). A reconstituição de enzimas sobre a superfície pode ser considerada como uma poderosa ferramenta para a concepção de interfaces de biorecombinação e para estudos fundamentais das relações entre estrutura-função. A melhor reconstituição da enzima foi observada apenas para a SAM mista contendo o tiol de cadeia curta ME e 1% de AUT, a qual cumpriu os requisitos estéricos para acomodar a enzima volumosa.

As monocamadas mistas podem ser preparadas por co-adsorção ou sequencial dos seus componentes <sup>[45]</sup>. No primeiro caso, a composição da monocamada é determinada pelas propriedades das moléculas, como comprimento de cadeia, grupo terminal e solubilidade, sendo preparadas adicionando moléculas simultaneamente. Na deposição sequencial, o segundo componente é incorporado numa monocamada pré-existente, por imersão do substrato em outra solução de deposição.

Um exemplo de co-adsorção é descrito no trabalho de Cancino *et al* <sup>[46]</sup> para desenvolvimento de um biossensor para carbaril. A arquitetura da SAM mista foi formada por um alcanotiol de cadeia curta (2-mercaptoetanol) e outro de cadeia longa (ácido 11-mercaptoundecanóico). A mistura desses alcanotióis foram utilizadas para aumentar a transferência eletrônica através dos alcanotióis de cadeia curta, enquanto os alcanotióis de cadeia mais longa podem proporcionar maior suporte para a estrutura enzimática. O preparo desta configuração de SAM mista para imobilização da enzima acetilcolinesterase proporcionou a retenção da máxima atividade enzimática sem a utilização de agentes de ligação cruzada.

Na deposição sequencial tem sido utilizado o método da dessorção seletiva, pois proporciona eletrodos com propriedades eletroquímicas específicas. Este método permite a alteração das propriedades de superfície, utilizando os diferentes potenciais de dessorção para as monocamadas distintas, as quais podem ser parcialmente dessorvidas para fabricar SAMs binárias <sup>[47]</sup>. Como exemplo, citamos o trabalho de Park *et al* <sup>[48]</sup>, no qual a superfície do eletrodo de ouro foi modificada com nanopartículas de ouro (AuNP) e monocamadas auto-organizadas mistas, composta de duas moléculas distintas, ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) e o tetradecano-1-tiol (TDT), na proporção de 80:20. Então, o MPA foi dessorvido pela aplicação do potencial de -1,2 V por 30 minutos. Após a redução dessorativa o eletrodo foi imerso na solução de ditiobis-N-succinimidil propionato (DTSP) para a formação da monocamada sobre os sítios dessorvidos. O método proposto é eficaz para fixação da enzima HRP mantendo-a estável, enquanto a presença de nanopartículas de ouro proporciona maior atividade

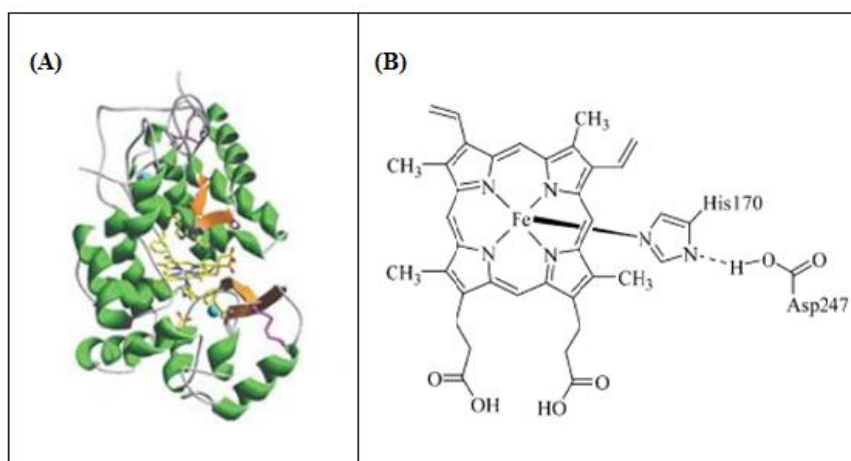
eletroquímica. É interessante notar que a SAM mista apresenta características voltamétricas únicas em comparação com o SAMs unimolecular Esta metodologia é útil para incorporar em uma monocamada uma espécie molecular cujas próprias dimensões físicas impediriam uma imobilização bem organizada [49].

### 1.5 Considerações gerais sobre a Enzima Horseradish peroxidase (HRP)

A raiz forte (*Amoracia rusticana*) é uma planta que cresce em regiões temperadas, sendo cultivada principalmente devido ao valor culinário de suas raízes, as quais são também uma rica fonte de peroxidase. Essa planta é utilizada para a produzir a peroxidase em larga escala devido ao uso comercial da enzima. As peroxidases têm atraído interesse, devido o envolvimento dessas enzimas em diversas reações biológicas, sendo usadas como biossensores em análises médicas, alimentícias [50] e também ambientais [51].

A HRP é uma glicoproteína globular que contém vários tipos de isoenzimas. É constituída de 308 resíduos de aminoácidos, dois íons cálcio e uma porção ferriprotoporfirina IX (heme), não covalentemente ligada à cadeia polipeptídica que forma o sítio ativo da enzima (Figura 4). O íon férrico central da referida protoporfirina está coordenado a um resíduo de histidina [52].

**Figura 4.** (A) Representação tridimensional da estrutura Horseradish peroxidase. (B) Grupo prostético das enzimas peroxidase denominado grupo heme

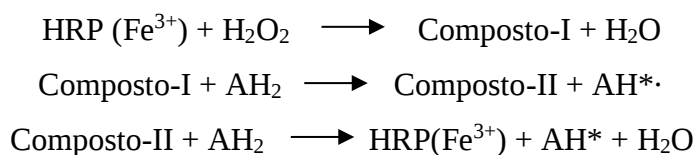


Fonte: adaptado [53, 54].

Os biossensores contendo a HRP constituem uma alternativa rápida e conveniente para medidas analíticas convencionais no monitoramento do peróxido de hidrogênio. A determinação sensível e precisa do  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem atraído interesse uma vez que, este composto é um mediador essencial na biologia, medicina e também é importante subproduto da oxidação enzimática de várias oxidases altamente seletivas. O peróxido de hidrogênio é necessário para o metabolismo de proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas, etc., e também ajuda a regular o açúcar no sangue e na produção de energia celular <sup>[55]</sup>.

Estudos desenvolvidos por Senel *et al* <sup>[56]</sup>, detectaram peróxido de hidrogênio via amperometria modificando o eletrodo de ouro com o dendrímero pirrolpoliamidoamina com diferentes gerações. A HRP retém a sua bioatividade após imobilização e os resultados indicaram uma imobilização eficaz da enzima na superfície modificada com o dendrímero contendo o monômero pirrol. Tal imobilização proporciona uma maior retenção da enzima sobre a superfície, aumentando a estabilidade no tempo de vida do eletrodo. O biossensor exibiu alta sensibilidade de  $54 \text{ nA mmol}^{-1}$ , uma faixa linear ( $1,0 - 18,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e um baixo limite de detecção de  $5,47 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  para  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

No mecanismo de reação das peroxidases, a transferência de elétrons envolvida será mediada quando um doador de elétrons ( $\text{AH}_2$ ) participa da reação de redução da enzima e posteriormente atua como aceptor de elétrons provenientes do eletrodo. Neste caso, a reação enzimática da peroxidase (HRP) ocorre em três etapas distintas <sup>[57]</sup>, como mostram as equações abaixo:



Na primeira etapa, há o envolvimento de dois elétrons na oxidação do grupo prostético da enzima na forma nativa pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formando um composto oxidado intermediário, Composto-I. Na reação seguinte, a forma oxidada da enzima é então, reduzida pela doação de um elétron do composto  $\text{AH}_2$  (molécula doadora de elétrons), formando o Composto-II. Este por sua vez, aceita um elétron de uma segunda molécula doadora  $\text{AH}_2$  na terceira etapa e a enzima retorna a sua forma nativa <sup>[58]</sup>.

Os mediadores são pequenas moléculas passíveis de redução/oxidação com alta velocidade de transferência eletrônica. A molécula do mediador escolhido deve reagir

rapidamente com a peroxidase oxidada. Uma variedade de moléculas pode ser utilizada como mediador de elétrons para a enzima HRP como: fenóis, aminas aromáticas, ácido áscórbico, ferroceno, entre outros <sup>[52]</sup>.

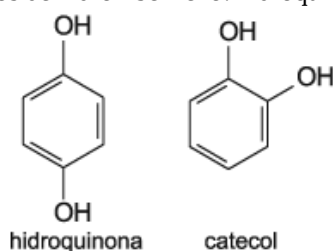
Mendes *et al* <sup>[59]</sup> avaliaram o efeito de diferentes tipos de SAM sobre a imobilização da enzima HRP para determinação de peróxido de hidrogênio utilizando a hidroquinona como mediador de elétrons. Após análise da formação das monocamadas e dos processos de imobilização enzimática, os autores selecionaram a SAM composta por cisteamina. Neste trabalho os autores comprovam que a utilização do mediador hidroquinona atua doando eficazmente elétrons do centro redox da HRP e a superfície de ouro, seguindo o mecanismo catalítico típico de HRP para a redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 1.6 Utilização da enzima HRP para detecção de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são poluentes ambientais, extremamente tóxicos e perigosos para os organismos vivos, mesmo em baixas concentrações. A contaminação da água destinada a consumo por compostos fenólicos na concentração de aproximadamente 1 µg L<sup>-1</sup>, além de acarretar problemas de sabor, odor, pode causar sérios danos à saúde humana levando em alguns casos até a morte <sup>[60]</sup>. Estes compostos podem derivar tanto de fontes naturais (ocorrência natural em plantas e solo) e atividades antrópicas como resíduos de vários tipos de atividades industriais e agrícolas <sup>[61]</sup>.

Dentre os diversos compostos fenólicos, destaca-se a hidroquinona (HQ) e o catecol (CT). Estes dois isômeros importantes do hidroxibenzeno (Figura 5) coexistem amplamente em amostras ambientais. A HQ pode induzir a fadiga, dor de cabeça, às vezes até mesmo danos a função renal e CT pode causar a lesão hepática. Portanto, eles são considerados como poluentes ambientais pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos e da União Européia por causa de sua alta toxicidade e baixa degradabilidade no ambiente ecológico <sup>[62]</sup>.

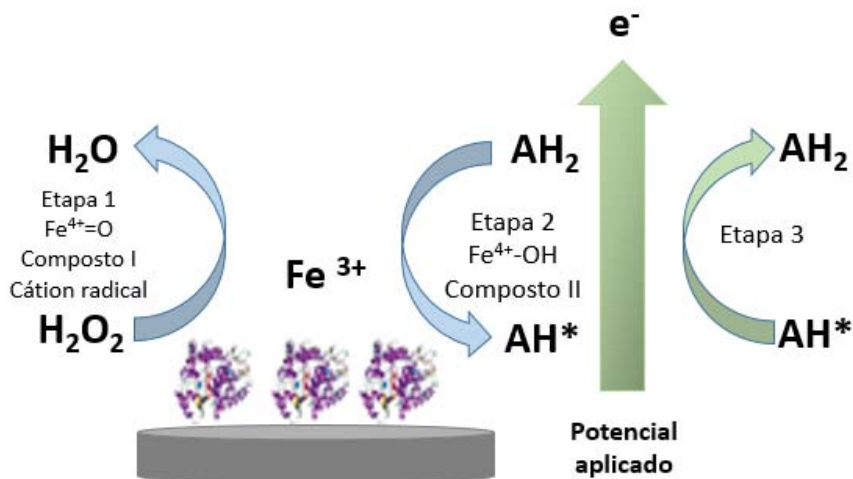
**Figura 5.** Estrutura química dos isômeros de hidroxibenzeno: hidroquinona e catecol



Devido à gravidade do impacto dos fenóis sobre o ambiente e de saúde, vários biossensores amperométricos de enzimas têm sido desenvolvidos para detectar esses compostos. As enzimas utilizados nestes sensores tipicamente envolvem polifenol oxidase - PPO (tirosinase <sup>[6]</sup> e a lacase <sup>[63]</sup>) e peroxidase (HRP). Os biossensores contendo a tirosinase são aplicáveis para a monitorar compostos fenólicos com, pelo menos, uma posição orto-livre. Por outro lado, o biossensor a base de lacase pode detectar compostos fenólicos com posição para e meta livres, com um ciclo catalítico complicado. Os produtos formados durante a reação da lacase não são ainda bem compreendidas. Entretanto a HRP reage mais rápido e com uma maior gama de compostos fenólicos e mostra uma sensibilidade mais elevada em comparação com os eletrodos à base de PPO <sup>[64]</sup>. A principal vantagem da utilização das enzimas redox é o baixo potencial aplicado, o que leva a uma boa sensibilidade

A resposta do biossensor contendo peroxidase para detecção do composto fenólico é baseado no mecanismo de deslocamento duplo, no qual dois substratos ( $H_2O_2$  e componente fenólico) estão envolvidos. O mecanismo geral pode ser descrito pelo Figura 6.

**Figura 6.** Mecanismo geral do ciclo catalítico da enzima peroxidase (HRP) na presença do composto fenólico.



Fonte: adaptado <sup>[65]</sup>

Neste mecanismo o Composto I (estado de oxidação +5) contendo uma espécie ferril ( $Fe^{4+} = O$ ) e um cátion radical porfirina, e Composto II (estado de oxidação +4), que é formado pela primeira redução do cátion radical porfirina, são os correspondentes intermediários enzimáticos. Na superfície do eletrodo, as moléculas de enzima HRP são oxidadas pelo  $H_2O_2$  seguido pela sua redução por compostos fenólicos. Na última reação, os compostos fenólicos

são convertidos principalmente em quinonas ou produtos de radicais livres, que são eletroativos e podem ser reduzidos eletroquimicamente sobre a superfície do eletrodo <sup>[64]</sup>. A corrente de redução é proporcional à concentração de compostos fenólicos na solução.

Ozoner *et al* <sup>[66]</sup> descreve a importância da otimização, da concentração do peróxido de hidrogênio para a determinação de fenóis. A enzima HRP foi covalentemente imobilizada a matriz polimérica do compósito poli(metacrilato de glicina-co-3-tienil metacrilato de metila)-polipirrol- nanotubo de carbono [Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT]. A otimização dos parâmetros experimentais foi realizada no que diz respeito ao pH, potencial aplicado e a concentração de peróxido de hidrogênio. O efeito da concentração do peróxido de hidrogênio foi avaliado pelas respostas amperométricas obtidas na faixa de 8,0 a 48,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . O valor máximo obtido para a corrente de redução foi quando utilizou 16,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e então decresceu acima de 48,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Nas condições otimizadas, foi realizada a determinação de dezoito derivados de fenol (fenol, catecol, p-benzoquinona, m-cresol, o-cresol, p-cresol, guaiacol, 2,4-dimetilfenol, 2,6-dimetoxifenol, 2-clorofenol, 3-clorofenol, 4-clorofenol, hidroquinona, 4-acetamidofenol, o pirrogallol, 4-metoxifenol, pirocatecol, 2-aminofenol), fixando-se a concentração de peróxido de hidrogênio a 16,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a um potencial de trabalho de 50 mV (vs. Ag / AgCl).

## 2 OBJETIVO GERAL

Investigar as potencialidades dos filmes auto-organizados, compostos por diferentes tióis (SAM<sub>mista</sub>), visando a posterior imobilização da enzima *horseradish peroxidase* (HRP), para o desenvolvimento de um biossensor. Otimização do biossensor de SAM<sub>mista</sub> com o propósito de determinar o composto fenólico - hidroquinona, utilizando técnicas eletroquímicas.

### 2.1 Objetivos específicos

- ✓ Preparar e caracterizar o eletrodo de SAM de ácido tioláctico, utilizando a voltametria cíclica;
- ✓ Otimizar o processo de imobilização da HRP sobre a SAM de ácido tioláctico utilizando a molécula modelo o substrato da enzima, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- ✓ Preparar e caracterizar o eletrodo de SAM mista de ácido tioláctico e ácido 11-mercaptopundecanóico sobre a superfície do eletrodo de ouro utilizando as técnicas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica;
- ✓ Avaliar a influência da concentração dos tióis no comportamento dos biossensores SAM<sub>mista</sub> para a determinação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela cronoamperometria. Comparar o biossensor de SAM<sub>mista</sub> com os biossensores obtidos contendo Au/TLA/HRP e Au/MUA/HRP
- ✓ Após determinado a concentração dos tióis, estudar o comportamento do eletrodo de Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP na detecção de hidroquinona na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por técnicas voltamétricas de análise tais como a voltametria cíclica e de pulso diferencial.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Equipamentos e reagentes

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato PalmSens (Palm Instruments BV) e Autolab PGSTAT 100, utilizando uma célula eletroquímica de capacidade de 10 ml contendo o eletrodo de ouro como trabalho, um eletrodo de referência calomelano saturado (SCE -  $\text{Hg} | \text{Hg}_2\text{Cl}_2 | \text{Cl}^-$ ) ou de prata/cloreto de prata ( $\text{Ag} | \text{AgCl}_{(\text{saturado})} | \text{KCl}$  (3,0 mol  $\text{L}^{-1}$ ) e como eletrodo auxiliar, um fio de platina. Ácido tioláctico, Ácido 11-mercaptoundecanóico, *Horseradish Peroxidase* (HRP) Tipo VI-A, cloridrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), N-Hidroxisuccinimida (NHS) e dopamina foram obtidos da Sigma-Aldrich (USA). Ferricianeto de potássio -  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , ferrocianeto de potássio trihidratado -  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , etanol, ácido sulfúrico, peróxido de hidrogênio foram adquiridos da Vetec (BRASIL). Tampão fosfato salino PBS 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  foi preparado pela mistura de hidrogenofosfato de sódio, dihidrogenofosfato de sódio e cloreto de sódio 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ . Para o ajuste de pH foram utilizadas soluções de ácido fosfórico (Vetec) e hidróxido de sódio. Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água deionizada.

#### 3.2 Preparação de filmes SAM

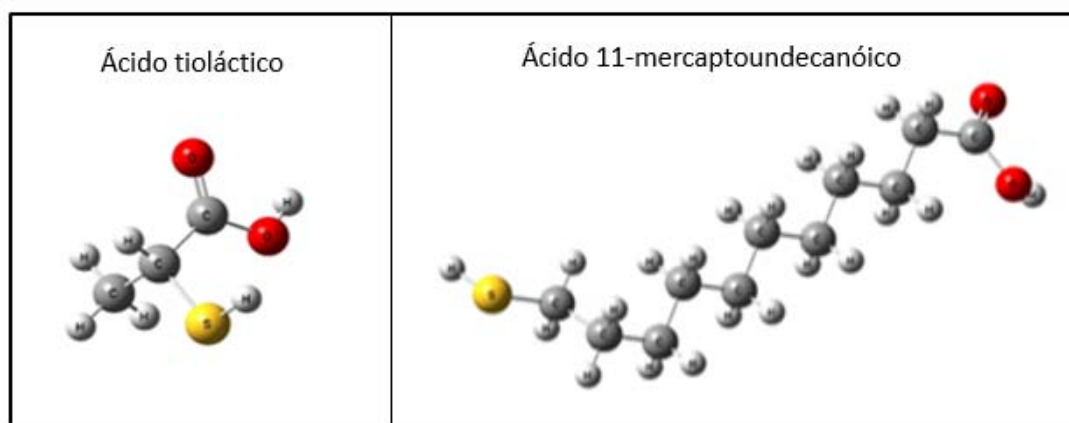
##### 3.2.1 Limpeza da superfície do eletrodo de ouro

A limpeza da superfície do eletrodo de ouro é uma etapa de extrema importância pois se trata da eliminação de possíveis impurezas existentes na superfície do mesmo. É uma etapa de grande influência na formação das SAMs e deve ser realizada de forma sistemática, a qual consiste no tratamento mecânico, químico e eletroquímico. Inicialmente realizou o pré-tratamento mecânico com polimento do eletrodo com solução de alumina 0,05  $\mu\text{m}$ . No tratamento químico deixou o eletrodo imerso na solução piranha (1:3  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% -  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado) durante 10 minutos. Após efetuou o tratamento eletroquímico, aplicando-se várias varreduras sucessivas entre os potenciais redox do ouro, na faixa de 0,2V a 1,6 V em solução aquosa de 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  em 50 mV  $\text{s}^{-1}$  até obter o perfil voltamétrico característico <sup>[67]</sup>.

### 3.2.2 Preparação da monocamada de ácido tioláctico (TLA) e ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) e monocamada mista (MUA/TLA)

A quimissorção da monocamada sobre a superfície eletródica foi realizada mergulhando-se o eletrodo de ouro previamente limpo na solução dos tióis representados na Figura 7. Na obtenção da monocamada auto-organizada de TLA deixou-se o eletrodo de ouro imerso na solução etanólica do tiol contendo  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ . O tempo de imersão para a molécula de TLA foi avaliado no intervalo de 10 a 180 minutos. Na obtenção da monocamada auto-organizada mista ( $\text{SAM}_{\text{mista}}$ ) contendo ambos os precursores, também deixou-se o eletrodo de ouro imerso na solução etanólica. Na formação da  $\text{SAM}_{\text{mista}}$  avaliou-se o efeito da concentração de cada tiol na faixa de  $0,25$  a  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  para a formação de uma superfície ordenada e estável. Para a molécula de MUA o tempo de imersão foi 24 horas, o qual foi previamente estabelecido a partir de estudos iniciais no intervalo de 10 min a 24 horas, sendo assim manteve-se esse tempo para a obtenção da  $\text{SAM}_{\text{mista}}$ .

**Figura 7.** Moléculas utilizadas no estudo da formação das SAMs



Fonte: A autora, obtida pelos programas GAUSSIAN 03 <sup>[68]</sup> e MOLEKEL 5.3 <sup>[69]</sup>

Nos estudos de dessorção eletroquímica utilizou a técnica de voltametria de pulso diferencial. Foi utilizado como eletrólito suporte uma solução de hidróxido de sódio  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , velocidade de varredura de  $20 \text{ mV s}^{-1}$  na faixa de potencial de  $-0,6$  a  $-1,4 \text{ V}$ .

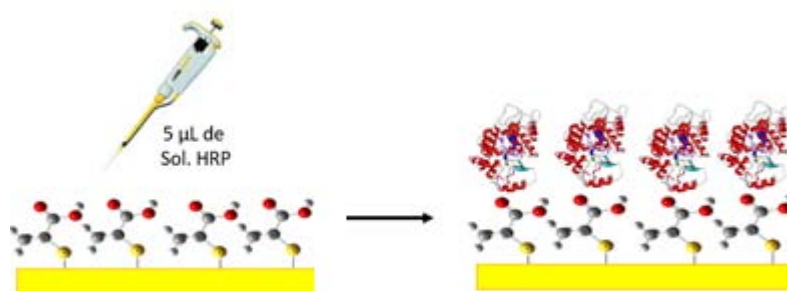
### 3.3 Imobilização enzimática sobre as monocamadas

Nesta etapa, foram realizados estudos utilizando diferentes formas de imobilização da enzima HRP na superfície do eletrodo de ouro já modificado com a monocamada de TLA. A

enzima peroxidase utilizada neste trabalho foi a HRP tipo IV-A. A solução foi preparada dissolvendo a enzima HRP em tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 6,5. Desta solução utilizou-se 55 unidades enzimáticas (U) para construção do biossensor, exceto para os estudos da variação da quantidade de enzima no eletrodo. As metodologias utilizadas na imobilização do material biológico foram realizadas como descrito abaixo:

(1) *Adsorção*: foram gotejados 5,0 µL da solução da enzima HRP na superfície do eletrodo já modificado com o ácido tioláctico, conforme Figura 8. Em seguida, o eletrodo foi seco a temperatura ambiente.

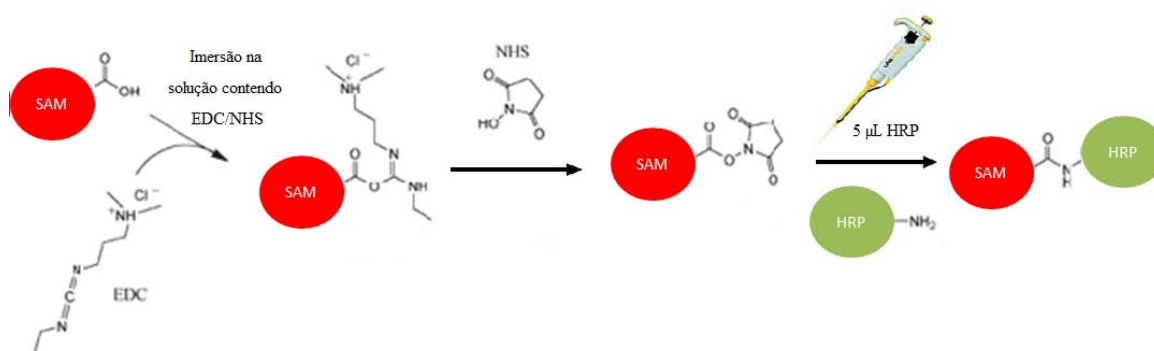
**Figura 8.** Esquema da imobilização da enzima HRP sobre a SAM pelo método de adsorção.



Fonte: a autora

(2) *Ligação Covalente*: o eletrodo modificado foi imerso em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo os agentes de ligação (EDC e NHS) por um período de uma hora. A reação ocorre com os grupos terminais carboxílicos da SAM com os ligantes EDC (2,0 mmol L<sup>-1</sup>) e NHS (5,0 mmol L<sup>-1</sup>). Após, a enzima foi imobilizada, gotejando 5,0 µL de solução contendo a enzima HRP sobre a superfície já modificada, conforme Figura 9. O biossensor foi seco a temperatura ambiente.

**Figura 9.** Esquema da imobilização da enzima HRP sobre a SAM pelo método de ligação covalente



Fonte: a autora

A imobilização da enzima HRP sobre a SAM<sub>mista</sub> foi realizada somente pelo método de ligação covalente, seguindo o procedimento descrito anteriormente.

### **3.4 Caracterização dos eletrodos modificados por técnicas eletroquímicas**

Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica foram utilizadas para a avaliação do comportamento eletroquímico das diferentes configurações de eletrodos na presença da molécula sonda de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$  0,5 mol L<sup>-1</sup> em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> e em solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,5. Na voltametria cíclica realizou o estudo na faixa de potencial entre -0,2 e 0,6 V a 100 mV s<sup>-1</sup> e para a SAM<sub>mista</sub> o potencial foi variado entre -0,4 e 0,6 V a 50 mV s<sup>-1</sup> pH 6,5. Na espectroscopia de impedância eletroquímica foi aplicado ao eletrodo de trabalho uma onda senoidal com amplitude de 10 mV utilizando potencial de circuito aberto na faixa de frequência de 10 kHz a 100 mHz.

### **3.5 Estudo da potencialidade dos eletrodos modificados como sensores eletroquímicos**

Para os estudos do comportamento eletroquímico dos eletrodos obtidos a partir dos diferentes métodos de imobilização da enzima HRP foram registrados voltamogramas cíclicos na faixa de -0,4 a 0,6 V em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,5 contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup> a 50 mV s<sup>-1</sup>. Para a técnica de cronoamperometria foi necessário pré-condicionamento (300 s) em um potencial fixo de -0,2 V na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na faixa de concentração de 0,1 a 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, eletrólito suporte Tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH = 6,5. Antes de todas as medidas para detecção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi necessário desaerar o eletrólito, durante 10 min em fluxo de nitrogênio para retirar o O<sub>2</sub> dissolvido na solução. Para a aplicação do biossensor para detecção da hidroquinona (HQ) foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica e pulso diferencial, na faixa de concentração entre 30,0 a 300,0 μmol L<sup>-1</sup>. Nas medidas para detecção da hidroquinona avaliou o efeito da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.6 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica do biossensor (Au/TLA/HRP) foi realizada pela microscopia de força atômica (AFM), utilizando amostras de filmes de ouro policristalino não modificado e modificado com a monocamada de ácido tioláctico e com a enzima HRP. A monocamada foi obtida pela imersão do Au em solução de TLA 10,0 mmol L<sup>-1</sup> por um período de 3 horas. A enzima HRP foi imobilizada sobre o TLA utilizando o método de ligação covalente. As superfícies das amostras foram escaneadas pelo modo não contato, em um equipamento Shimadzu SPM-9600. As imagens foram obtidas com tamanho 1x1 µm.

### 3.7 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR, *Fourier Transform Infrared*)

A espectroscopia de FTIR foi utilizada para o estudo da interação química entre a monocamada de TLA e a enzima HRP. Para a realização destas medidas utilizou-se o equipamento FT-IR Spectrometer Frontier - Perkin Elmer, no modo transmissão e reflectância, na região entre 500 a 4000 cm<sup>-1</sup>, sendo acumuladas 64 varreduras. Realizou-se a análise do Au/TLA e Au/TLA/HRP sobre a superfície do eletrodo de ouro, já para a obtenção do espectro da enzima HRP nativa utilizou pastilhas de brometo de potássio.

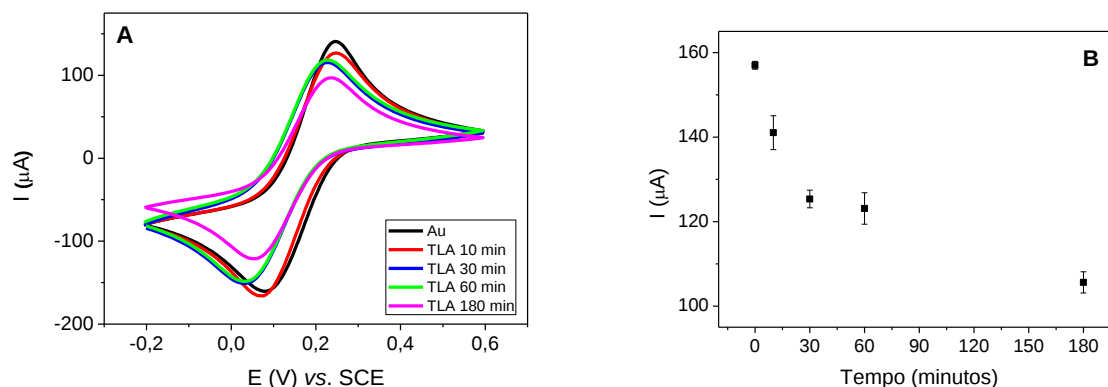
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Monocamadas auto-organizadas de ácido tioláctico

#### 4.1.1 Formação das monocamadas auto-organizadas de ácido tioláctico

As monocamadas auto-organizadas foram inicialmente obtidas utilizando-se a molécula de ácido tioláctico (TLA -  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{SH})\text{COOH}$ ). Esta molécula possui dois grupos funcionais em sua extremidade, um grupo carboxílico e uma metila. Estes grupos previnem a passivação do eletrodo e conferem cargas superficiais [70]. Estudos de eletrodos modificados por SAMs demonstram que a transferência de elétrons de uma espécie em solução é retardada com a redução da área ativa do eletrodo ou por impedimento das espécies redox ao se aproximar da superfície imobilizada com o tiol [71]. Assim, a capacidade de uma monocamada para bloquear a transferência de elétrons entre a superfície de ouro e um doador ou aceitador de elétrons em solução tem-se mostrado uma boa medição do recobrimento superficial [28]. O efeito do tempo de formação das monocamadas de TLA foi acompanhado através da técnica de voltametria cíclica (número de medidas = 3), por meio da oxirredução de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (molécula sonda). Avaliando o intervalo de tempo de 10 a 180 minutos (Figura 10), tendo como objetivo a avaliação das propriedades das monocamadas comparadas ao eletrodo de ouro policristalino sem modificação.

**Figura 10.** (A) Voltamogramas cíclicos do Au/TLA em diferentes tempos de imobilização em solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> PBS com 0,05 mol L<sup>-1</sup>  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em pH = 6,5  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Dependência do potencial e da corrente de pico anódico com o tempo de imersão do eletrodo Au na solução de TLA 10 mmol L<sup>-1</sup>.



Fonte: A autora

Conforme Fig. 10-A, pode ser observado que após a imobilização da monocamada dificulta na transferência de elétrons diminuindo as correntes de pico. Este processo de formação da SAM de TLA altera a difusão da sonda eletroquímica até a superfície do eletrodo. Este comportamento era esperado, pois a molécula sonda apresenta-se negativamente carregada e ao entrar em contato com a SAM, composta por moléculas que contém o grupo carboxílico desprotonado, esta sofre repulsão maior que aquela apresentada pelo ouro sem modificação.

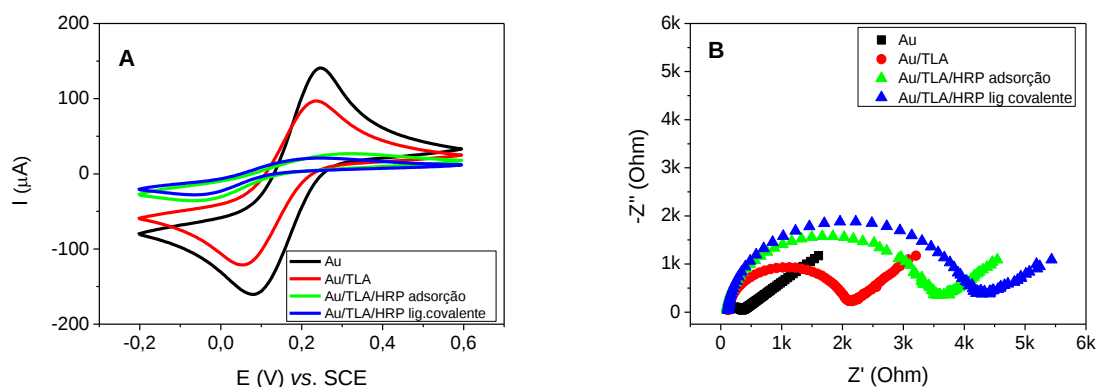
A partir dos voltamogramas pode-se considerar que o processo de quimissorção inicia-se nos primeiros 10 min, pois a corrente de pico diminui comparada ao eletrodo de ouro sem modificação. À medida que o tempo de imersão do eletrodo na solução de TLA foi aumentado observou-se uma diminuição nas correntes de pico (Figura 10-B), provavelmente devido a melhor organização da SAM na superfície, tornando mais lenta a cinética de transferência de elétrons. Nos estudos de Raoof *et al* <sup>[72]</sup>, foram otimizados os parâmetros de formação da SAM estudando-se os efeitos do tempo de imersão de 0 a 150 min do modificador ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (Nq), os quais influenciaram na determinação voltamétrica da cisteamina. Através destes estudos os pesquisadores obtiveram os eletrodos Au-Nq com melhores propriedades eletroquímicas no tempo de imersão de 30 min. Souza *et al* <sup>[73]</sup> estudaram o tempo de imobilização utilizando o eletrodo de ouro modificado após diferentes tempos de imersão em solução de 1,4 – ditiano (dt). Com o aumento do tempo de imersão, foi verificada uma diminuição dos valores de corrente faradaica da molécula sonda redox.

Nota-se nos voltamogramas, (Fig. 10-A) que ocorreu o deslocamento do potencial de oxidação para menores valores com o aumento de tempo de imersão. Isto pode ser relacionado a maior organização da SAM, mantendo-se constante a partir de 60 minutos. A relação  $I_{pa}/I_{pc}$  foi superior a 1 e com  $\Delta E_p$  em torno de 180 mV, para todos os tempos de imobilização indicando que o sistema é considerado quase-reversível. De acordo com a literatura, para curtos tempos de imersão, existe uma cobertura densa da molécula tiol, porém sem organização, apresentando muitas irregularidades. No decorrer do tempo, uma organização mais lenta, que requer tempos da ordem de horas, maximiza a densidade de moléculas e minimiza os defeitos na SAM <sup>[30, 45]</sup>. Sendo assim, escolheu-se o tempo de 180 minutos para a deposição para o ácido tioláctico, pois apresenta a menor corrente de pico e também o menor potencial de oxidação indicando que a molécula foi imobilizada de forma homogênea e organizada. Esse tempo de 180 minutos é similar aos encontrados na literatura para moléculas de cadeia curta, em períodos maiores não ocorre alteração, pois a molécula já se encontra organizada na superfície.

#### 4.1.2 Formação do biossensor Au/TLA/HRP

A partir da confirmação da viabilidade da construção da monocamada de ácido tioláctico e conhecendo a possibilidade da SAM para imobilizar biomoléculas, o biossensor baseado em *Horseradish peroxidase* foi construído. Para uma prévia constatação da imobilização da HRP e também para verificar a eficiência do processo de formação do biossensor sobre a monocamada de TLA, estudos de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizados (Fig. 11) na presença de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ . Avaliou-se a imobilização enzimática pelo método de adsorção e também pelo método de ligação covalente entre a monocamada de ácido tioláctico e a enzima HRP.

**Figura 11.** Caracterização por (A) voltametria cíclica e (B) espectroscopia de impedância eletroquímica para o eletrodo Au, Au/TLA e Au/TLA/HRP obtido por adsorção e também por ligação covalente contendo 55 U, na presença de  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de PBS em  $\text{pH} = 6,5$  ( $n=3$ ).



Fonte: A autora.

Inicialmente com a formação da monocamada de TLA (Figs. 11-A e 11-B), a corrente de pico diminui assim como a resistência de transferência de elétrons aumenta (Tabela 1), na presença de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ . No entanto após a imobilização da enzima HRP pelos dois diferentes métodos, ocorre alterações mais significativas no comportamento eletroquímico do sistema, sendo possível constatar que o TLA favoreceu a imobilização da enzima HRP. Uma maior diminuição nas correntes de pico assim como um maior aumento na resistência de transferência de carga após a imobilização da enzima HRP, possivelmente devido ao aumento da espessura e compactação da monocamada dificultando a transferência eletrônica.

Um comportamento similar a este foi observado no trabalho de Ran *et al* <sup>[74]</sup> no qual o conjunto formado pela monocamada de 1,4 alquil-benzeno e a subsequente imobilização por

ligação covalente da enzima HRP aumentou significativamente a resistência de transferência de elétrons, sendo esta alteração no sinal de impedância relacionada com o comportamento de automontagem da monocamada e imobilização da biomolécula.

**Tabela 1.** Parâmetros eletroanalíticos dos diferentes eletrodos na presença da molécula sonda

| <i>Eletrodo</i>           | <i>I<sub>pa</sub> (μA)</i> | <i>R<sub>ct</sub> (Ω)</i> |
|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Au                        | 149,29                     | 271,08                    |
| Au/TLA                    | 105,83                     | 2029,92                   |
| Au/TLA/HRP adsorção       | 21,39                      | 3.590,23                  |
| Au/TLA/HRP lig. covalente | 16,73                      | 4.126,91                  |

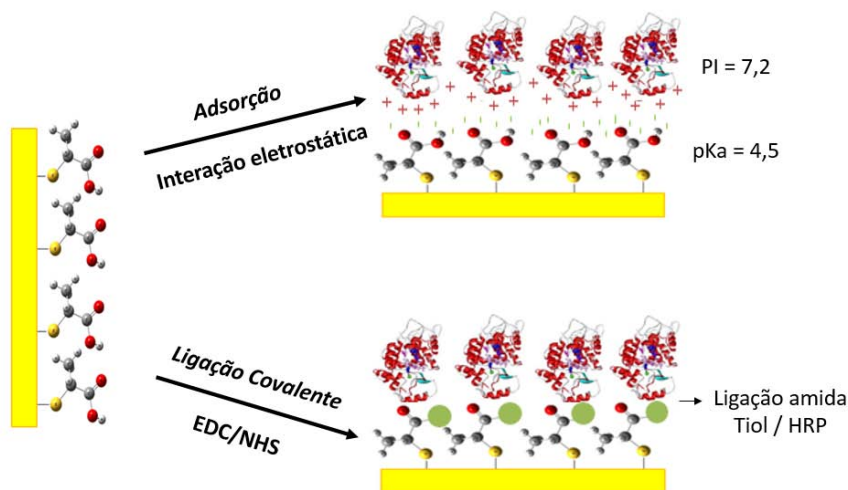
Fonte: A autora

Os resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) concordaram com aqueles obtidos por voltametria cíclica. Os voltamogramas cíclicos referentes às enzimas imobilizadas apresentam valores bem menores de corrente em comparação com o ouro liso e também com a monocamada de TLA. Pode ser também observado que o eletrodo Au/TLA/HRP obtido por adsorção apresentou um maior valor de  $I_p$  e menor  $R_{ct}$  quando comparado ao modificado por ligação covalente, indicando que na imobilização covalente a interação entre a enzima e a monocamada de TLA é mais estável, o que pode acarretar perda da atividade biológica do material.

#### **4.1.3 Avaliação do método de imobilização da HRP**

A imobilização é um desafio em termos de preservação da enzima, sem perda da atividade enzimática. O método escolhido para a imobilização enzimática interfere em parâmetros de desempenho do biossensor, tais como seletividade, sensibilidade e principalmente na estabilidade. Os dois métodos avaliados para a imobilização da HRP estão esquematizados na Figura 12.

**Figura 12.** Representação esquemática da interação entre a SAM e a enzima HRP utilizando os dois métodos de imobilização.

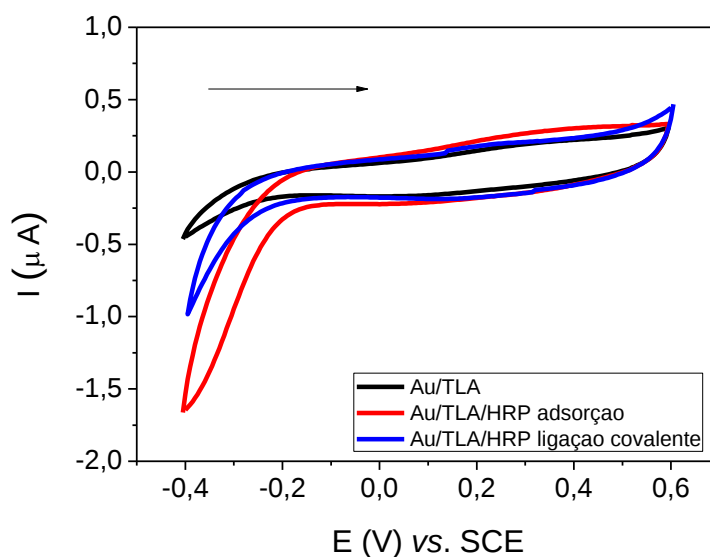


Fonte: a autora

O princípio envolvido no método de adsorção é a atração da enzima pela superfície da monocamada por meio de forças de Van der Waals, que são fracas. Neste caso, a atividade enzimática normalmente é preservada, entretanto pode ocorrer lixiviação da enzima da superfície do eletrodo <sup>[26]</sup>. A molécula de tiol na superfície confere um ambiente carregado negativamente ( $pK_a = 4,5$ ), possibilitando uma interação eletrostática com a enzima HRP (ponto isoelétrico de  $pH = 7,2$ ) <sup>[75]</sup>, conforme Figura 12. O método da ligação covalente baseia-se na formação de uma ligação forte entre a enzima e o suporte, dificultando a lixiviação da enzima <sup>[76]</sup>. O EDC ativa o tiol que contém o grupo terminal carboxílico, ligando-se diretamente ao grupo amina da HRP para formar a ligação amida, o NHS reage formando um intermediário éster <sup>[77]</sup>. A imobilização ocorre por deslocamento deste grupo por resíduos de lisina da HRP, formando uma ligação amida. O método é frequentemente mais complexo e os procedimentos mais laboriosos com consumo de tempo, quando comparado ao método de adsorção <sup>[27]</sup>.

Nesse contexto, procurando manter a enzima ativa e estável depois de incorporadas no eletrodo, utilizou-se a voltametria cíclica para estudar a possibilidade de aplicação do biossensor obtido pelos diferentes métodos de imobilização: por adsorção e pela ligação covalente na presença do peróxido de hidrogênio, segundo Figura 13.

**Figura 13.** Voltamogramas cíclicos para os eletrodos Au/TLA e Au/TLA/HRP obtidos pelos diferentes métodos na presença de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio, em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5.

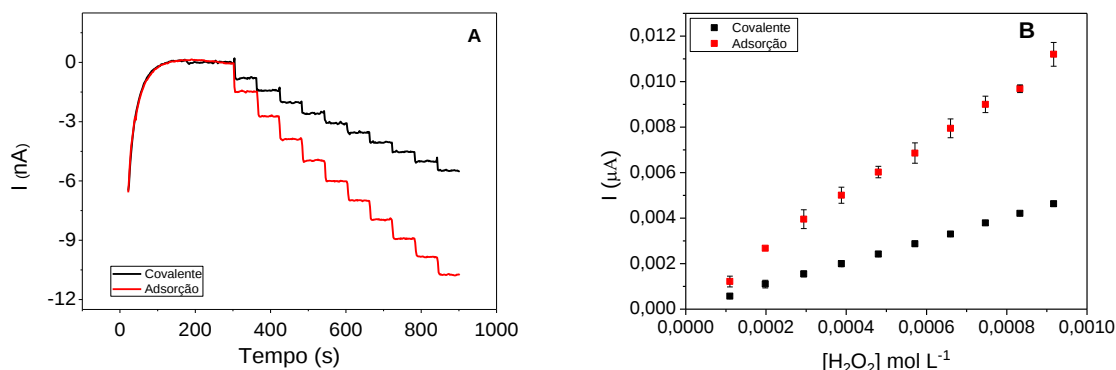


Fonte: A autora

Pode ser observado na Figura 13, que o eletrodo apenas com a monocamada (Au/TLA) não apresenta resposta considerável, no entanto, observa-se que há um incremento da corrente catódica quando ocorre a imobilização da enzima peroxidase no dispositivo. Ao analisar o comportamento dos dois biossensores na presença do  $\text{H}_2\text{O}_2$  é possível constatar o perfil voltamétrico do processo redox em torno de -0,2 V, evidenciando a atividade da enzima HRP já que a monocamada de TLA sem a HRP imobilizada, não apresentou resposta na redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para a modificação por adsorção há um aumento significativo na intensidade do pico de redução quanto comparada a modificação com a ligação covalente, provavelmente por proporcionar menor desnaturação ao material biológico, tornando a enzima mais disponível para a reação redox.

Para uma análise mais detalhada da atividade enzimática em função do método de imobilização, utilizou a técnica de cronoamperometria monitorando a corrente de redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em função da sua concentração. Experimentos amperométricos em potenciais fixos foram realizados na faixa de 0,0 a -0,4 V, apresentando melhores respostas em potenciais mais negativos. Embora os biossensores apresentem uma maior sensibilidade em -0,4 V, são preferíveis baixos potenciais a fim de evitar ou reduzir a interferência causada por algumas espécies eletroativas <sup>[78]</sup>. Assim, o potencial de -0,2 V foi escolhido para ser utilizado nas medidas amperométricas para a redução eletroquímica do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a fim de avaliar os dois métodos de imobilização (Figura 14).

**Figura 14.** (A) Cronoamperogramas dos biossensores obtidos pelos métodos de imobilização covalente e adsorção. (B) Relação entre corrente em função da concentração do  $\text{H}_2\text{O}_2$  na faixa de  $1,98$  a  $9,17 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , potencial de  $-0,2 \text{ V}$ .

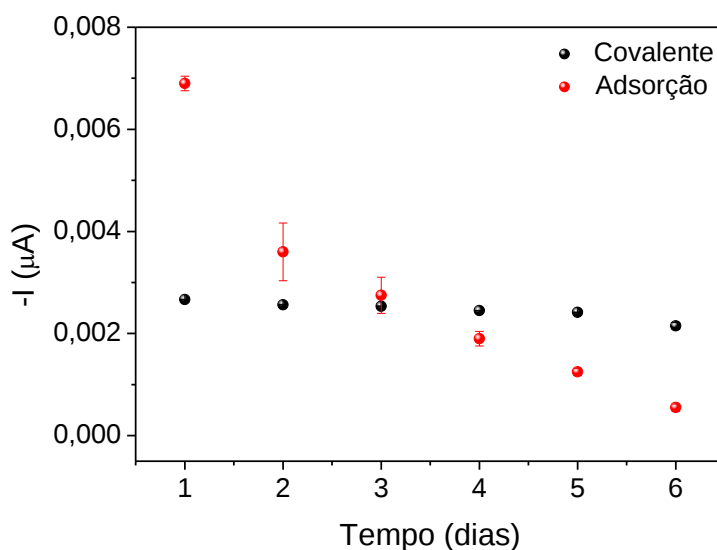


Fonte: A autora

Observa-se pelas curvas de amperometria (Fig. 14) que a sensibilidade obtida para modificação por adsorção ( $y = 3,52 \times 10^{-4} + 11,45x$ ;  $r = 0,9978$ ) é mais elevada que no método da ligação covalente ( $y = 3,43 \times 10^{-5} + 5,01x$ ;  $r = 0,9996$ ). No método de adsorção a atividade enzimática normalmente é preservada, fato que explica as maiores correntes de redução. Entretanto, neste método a taxa de lixiviação para a solução é maior, comprometendo a estabilidade do sistema e reprodutibilidade das correntes de redução <sup>[26]</sup>. No método da ligação covalente, as correntes de redução apresentam uma menor intensidade, fato explicado pela diminuição ou mesmo perda da atividade enzimática devido à reação com grupos funcionais do centro ativo da enzima. Este método fornece vantagens, pois confere a minimização da lixiviação e uma maior estabilidade do complexo enzima-suporte.

Desta forma para avaliar o funcionamento dos biossensores obtidos a partir dos diferentes métodos de imobilização, estes foram estocados em temperatura de aproximadamente  $4^\circ\text{C}$  em tampão PBS pH 6,5. O tempo de vida assim como a estabilidade na resposta eletroquímica dos métodos de imobilização foram investigadas em um período de 6 dias, com medidas realizadas em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5 na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $5,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . A Figura 15 apresenta o tempo de vida dos biossensores.

**Figura 15.** Estudo do tempo de vida dos biossensores obtidos pelos diferentes métodos de imobilização no tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,5 na presença de 5,7x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Fonte: A autora

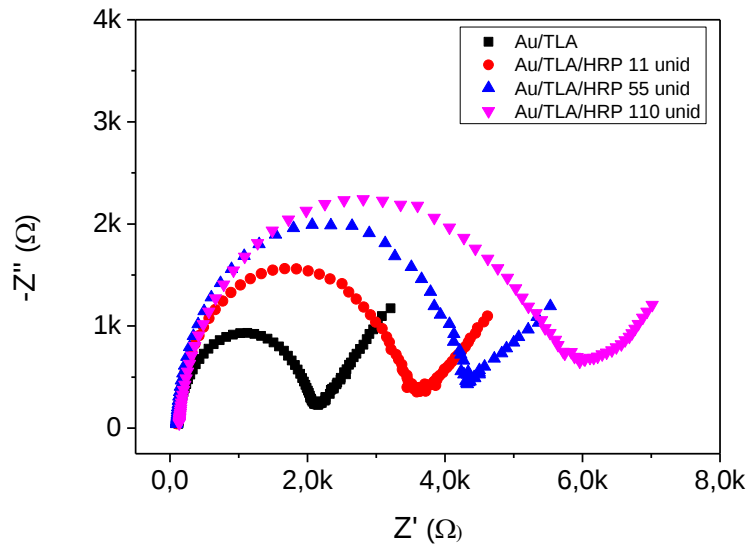
Na Figura 15, no método de adsorção observa-se que o sinal diminui com o aumento do número de dias, indicando a alta taxa de lixiviação da enzima da superfície do eletrodo. Durante as medidas amperométricas, verifica-se que esta diminuição ocorre nas medidas efetuadas no mesmo dia, o que comprova a lixiviação da enzima HRP imobilizada pela método de adsorção. Quando este biossensor foi armazenado, a perda da resposta no segundo dia foi superior a 50%, mostrando-se instável.

Em relação à imobilização por ligação covalente, nota-se que apesar da menor sensibilidade apresentada, esta proporciona uma maior reprodutibilidade nas correntes de redução durante o intervalo de tempo estudado, apresentando perda de 18 % no sinal eletroquímico. Segundo a literatura, o método de ligação covalente é o mais amplamente utilizado para eletrodos modificados com grupos funcionais carboxílicos, devido a forte ligação entre estes grupos e a enzima <sup>[59]</sup>. O método pela ligação covalente proporcionou um desempenho melhor na reprodutibilidade da corrente de redução quando comparado ao método de adsorção. Este fato pode ser explicado pela presença de fortes forças de atração formadas por ligações químicas entre a enzima peroxidase e a molécula de ácido tioláctico. Assim, neste estudo o método de ligação covalente foi definido para ser utilizado para a imobilização da enzima HRP.

#### 4.1.4 Efeito da concentração da enzima HRP sobre a resposta do biossensor

A concentração da enzima HRP no desenvolvimento do dispositivo é um parâmetro importante [76]. Com a finalidade de analisar o efeito da quantidade de enzima imobilizada sobre a monocamada de TLA para a confecção do biossensor, variou-se a concentração de HRP na faixa de 11 a 110 unidades enzimáticas, utilizando-se o método da ligação covalente. Com base nisso, a Figura 16 apresenta o efeito da quantidade de HRP em termos de resistência de transferência de carga, obtidos a partir de estudos de EIE.

**Figura 16.** Diagramas de Nyquist dos eletrodos Au/TLA e Au/TLA/HRP construídos com diferentes quantidades de unidades enzimáticas na presença de  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4}$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de PBS, pH = 6,5.



Fonte: A autora

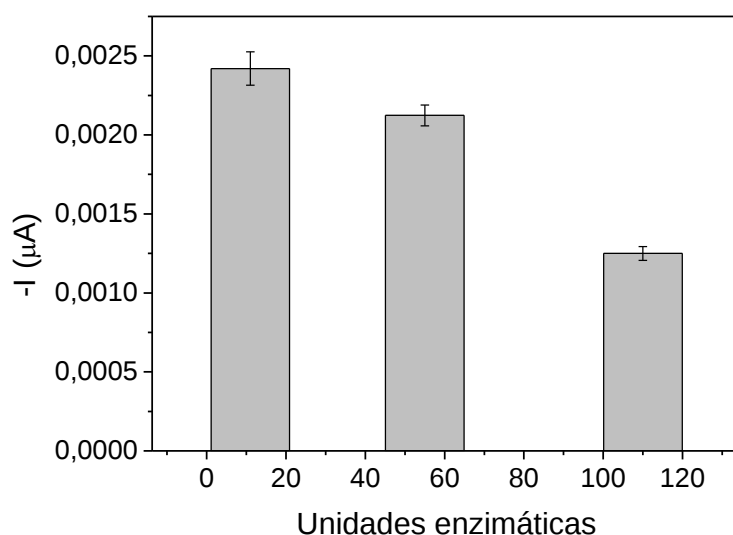
Conforme a quantidade de unidades enzimáticas imobilizadas na monocamada do Au/TLA aumenta, a resistência de transferência de carga vai aumentando. A monocamada com TLA apresenta  $R_{ct} = 2029,92 \, \Omega$ , após a imobilização enzimática os valores de  $R_{ct}$  aumentam para  $3400,00 \, \Omega$ ,  $4126,91 \, \Omega$  e  $5832,10 \, \Omega$  quando as unidades enzimáticas foram 11, 55 e 110 unidades, respectivamente. A partir dos valores das resistências de transferência de carga do eletrodo modificado com TLA e os modificados com a enzima HRP é possível calcular grau de recobrimento enzimático, a partir da equação 1 [79]:

$$\Theta = 1 - \left( \frac{R_{ct}^{SAM}}{R_{ct}^{SAM-HRP}} \right) \quad \text{Eq. 1}$$

Onde  $\Theta$  é o recobrimento superficial,  $R_{ct}^{SAM}$  e  $R_{ct}^{SAM-HRP}$  são os valores de resistência de transferência de carga obtidos a partir do diagrama de impedância dos eletrodos modificados com a monocamada de TLA e o com o TLA/HRP, respectivamente. O recobrimento enzimático obtido foi de 40,29% para 11 unidades, 52,15% para 55 unidades e 65,19% para 110 unidades. Os resultados mostram que o aumento na quantidade de enzima sobre a monocamada de TLA promove um maior recobrimento da superfície. Este resultado sugere a eficiente imobilização enzimática sobre a superfície do eletrodo, uma vez que existe um efeito de inibição da macromolécula para o processo de transferência de elétrons.

A quantidade de enzima utilizada para construção do biossensor deve ser suficiente para garantir a reação com o substrato, sendo que elevadas quantidades de enzima podem limitar o processo difusional levando a um decréscimo na resposta do biossensor [80]. Com base nisso, a Figura 17 apresenta o efeito da quantidade de HRP imobilizada na resposta amperométrica do eletrodo de Au/TLA/HRP.

**Figura 17.** Efeito da quantidade de HRP imobilizada na resposta amperométrica (n = 3) do eletrodo de Au/TLA/HRP em tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,5 contendo 3,88x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>. Potencial fixo de -0,2 V vs SCE.



Fonte: A autora

Conforme Figura 17, a corrente de redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decresce com o aumento das unidades da enzima HRP imobilizada sobre o TLA. Este comportamento está relacionado ao excesso de unidades enzimáticas, o qual pode proporcionar o bloqueio do sítio ativo causando

impedimento estérico e dificultando a transferência eletrônica do substrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) na superfície do eletrodo. Comportamento similar foi descrito por Hua *et al* <sup>[81]</sup>, onde o efeito da concentração da enzima HRP foi analisada no intervalo de 0,66 a 20,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Neste trabalho da literatura, as correntes de redução aumentaram rapidamente com o aumento da concentração de HRP no intervalo de 0,66 para 6,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mas, diminuiu acima desta concentração.

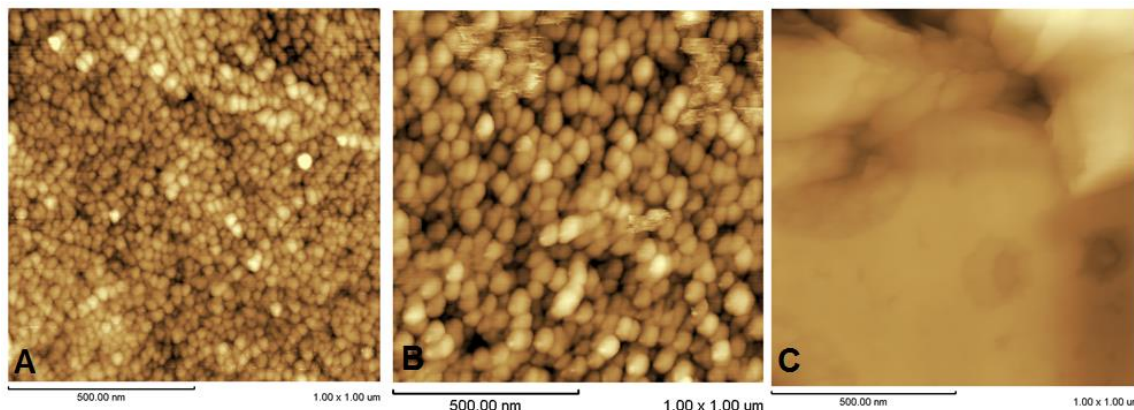
O excesso da enzima HRP pode bloquear alguns sítios ativos dificultando o acesso do  $\text{H}_2\text{O}_2$  como uma consequência do impedimento estérico, ou ainda pode dificultar a comunicação eletrônica na superfície do eletrodo, o que explica o decréscimo significativo no valor de corrente para 110 unidades enzimáticas.

A quantidade de HRP utilizada para modificar o eletrodo, que produziu a maior corrente de redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi com 11 unidades enzimáticas. No entanto, baixas concentrações de enzima não são suficientes para completa reação eletrocalítica e também podem dificultar a reprodutibilidade da resposta eletroquímica. Assim, a quantidade de 55 unidades enzimáticas foi selecionada para a construção dos biossensores, pelo fato que suas correntes apresentaram valores próximos aos encontrados para 11 unidades enzimáticas, com um menor erro de reprodutibilidade.

#### **4.1.5 Caracterização do biossensor do Au/TLA/HRP**

A estrutura policristalina do substrato pode ser diretamente influenciada pela microestrutura do filme depositado <sup>[82]</sup>. A formação e a estrutura da biossensor formado no substrato de ouro pela imersão no ácido tiolático e posterior imobilização da enzima HRP, foi verificada pela microscopia de força atômica (AFM), a qual forneceu as informações da morfologia granular dos filmes com resolução em escala nanométrica, conforme Figura 18.

**Figura 18.** Imagens de AFM do (A) eletrodo de Au sem modificação, (B) do Au/TLA e (C) do Au/TLA/HRP

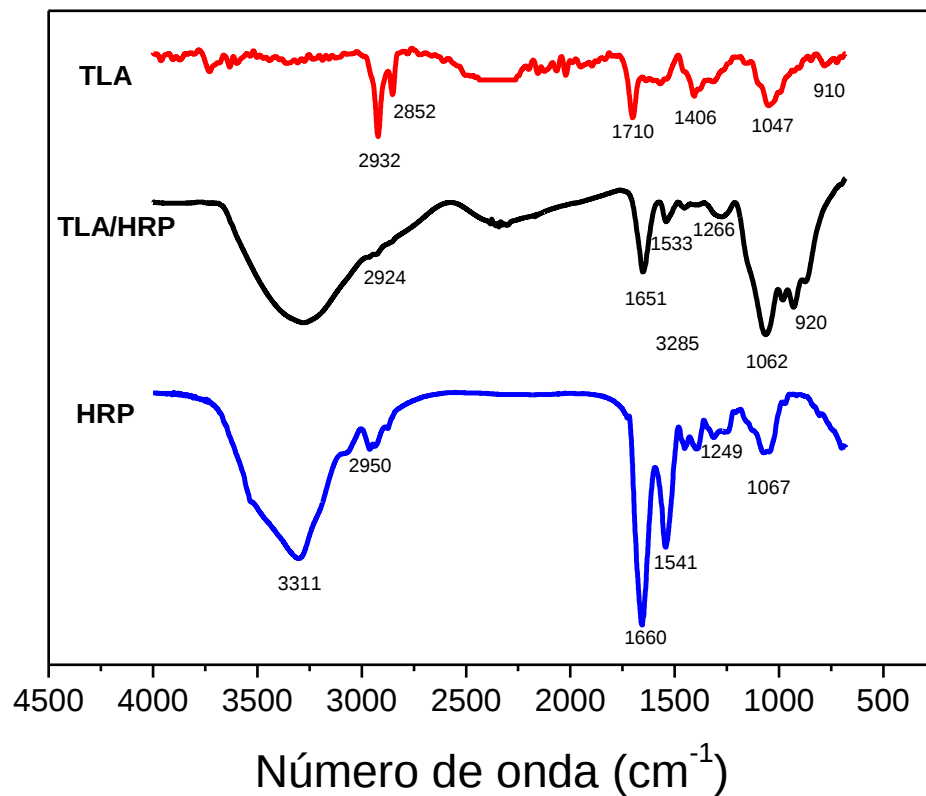


Fonte: a autora

A partir da Figura 18 foi possível comprovar as etapas de formação do biossensor, pela mudança na topologia da superfície do substrato de ouro. Na Fig. 18-A, apresenta a imagem típica da superfície de ouro não modificado com formas predominantemente esféricas. Após a imersão da monocamada sobre o substrato, a topologia do ouro mudou bruscamente (Fig. 18-B) indicando que ocorreu a formação da monocamada de TLA sobre a superfície de ouro. Nesta imagem, ocorre um aumento nas formas esféricas, provavelmente ocasionado pelo recobrimento da monocamada auto-organizada, sobre o ouro. Na Fig. 18-C, mostra a imagem do Au/TLA com a enzima HRP. O TLA forma uma monocamada bidimensional que adota uma estrutura bem organizada e orientada, o que favorece a imobilização enzimática. No entanto, pela imagem obtida não foi possível caracterizar a enzima, pois esta proteína é volumosa, o que pode ter acarretado distorção na imagem. Estes resultados corroboram com a literatura para sistemas contendo biomoléculas <sup>[90]</sup>.

Os espectros de FTIR foram obtidos para a monocamada TLA sobre o eletrodo de Au, da enzima HRP imobilizada sobre Au/TLA e também da enzima HRP nativa (Figura 20). No espectro para a monocamada de TLA é possível observar que não ocorrem bandas de grande intensidade, característica para compostos contendo o grupo S-H, o que é coerente com a literatura <sup>[83, 84]</sup>. O grupo (H<sub>2</sub>C-S) origina bandas referentes aos estiramentos simétricos ( $\approx 2852\text{ cm}^{-1}$ ) e assimétricos ( $\approx 2932\text{ cm}^{-1}$ ). O estiramento C=O de ácidos carboxílicos apresenta uma banda em  $1710\text{ cm}^{-1}$ . O grupo C-O aparece na região de  $1420$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$  sendo duas bandas de deformação axial, devido ao acoplamento da deformação angular no plano da ligação O-H e a deformação axial de C-O. Outra banda característica aparece em  $910\text{ cm}^{-1}$  da deformação angular do grupo O-H.

**Figura 19.** Espectro de FTIR para o eletrodo Au/TLA, Au/TLA/HRP e a enzima HRP em pastilha de KBr.



Fonte: a autora

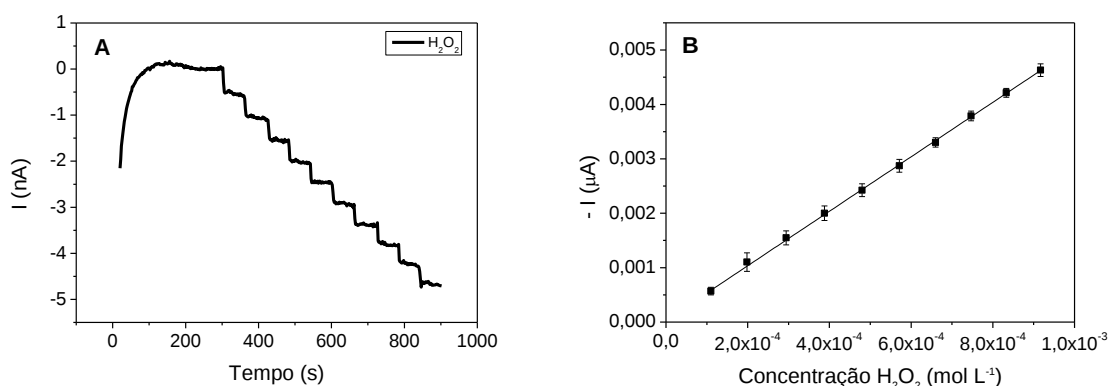
Um dos grupamentos importantes para o estudo espectral das proteínas são as amidas. As bandas de amida, podem contribuir de maneira essencial para a informação estrutural contidas nas bandas de infravermelho, pois o aparecimento ou desaparecimento assim com a variação da intensidade e deslocamento podem fornecer informações relevantes da estrutura da proteína <sup>[85]</sup>. Conforme Figura 19, a enzima HRP apresenta a banda amida I ( $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ), originada principalmente pelo estiramento vibracional  $\text{C}=\text{O}$  das ligações peptídicas, ocorrendo em  $1660\text{ cm}^{-1}$  correspondente às  $\alpha$ -hélices da proteína. O pico em  $1541\text{ cm}^{-1}$  refere-se a banda característica de amida II ( $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ ), sendo atribuída pela combinação da deformação no plano do grupo  $\text{N-H}$  e o estiramento vibracional  $\text{C-N}$  das ligações peptídicas, correspondentes às  $\beta$ -folha da proteína <sup>[86, 87]</sup>. Após a imobilização da enzima HRP sobre o TLA as bandas características apresentaram algumas pequenas alterações. O espectro TLA/HRP apresenta as bandas características da amida I e II em  $1651\text{ cm}^{-1}$  e  $1533\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, sendo bem próximas aos valores encontrados para a enzima nativa. As similaridades desses espectros indicam que a estrutura secundária da HRP nativa foi mantida no TLA/HRP. Portanto

o TLA pode proporcionar uma boa plataforma para a imobilização da enzima, sem que ocorra desnaturação da biomolécula.

#### 4.1.6 Detecção de peróxido de hidrogênio usando o biossensor Au/TLA/HRP

Após a otimização das condições experimentais para a construção do biossensor Au/TLA/HRP, este foi avaliado em diferentes concentrações do peróxido de hidrogênio, conforme Figura 20.

**Figura 20.** (A) Cronoamperogramas do biossensor Au/TLA/HRP para variação da concentração do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , em potencial fixo de  $-0,2 \text{ V}$  e (B) Curva de corrente de redução em função da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na faixa de concentração de  $1,1$  a  $9,17 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$



Fonte: A autora

O biossensor Au/TLA/HRP apresenta bom comportamento eletroquímico, sendo sensível com a variação de concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no potencial de trabalho aplicado em  $-0,2 \text{ V}$ . No intervalo de concentração de  $1,1$  a  $9,17 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  obteve-se uma sensibilidade de  $5,01 \mu\text{A/mol L}^{-1}$  e coeficiente de correlação de  $0,9996$  para valores médios de intensidade de corrente obtidos (Figura 18-B). A partir da curva de calibração da resposta amperométrica, foi possível determinar o limite de detecção ( $\text{LD} = 3.S_B/b$ ) e os limites de quantificação ( $\text{LQ} = 10.S_B/b$ )<sup>[88]</sup>. Foi realizado um estudo de dez medidas do branco onde foi obtido um desvio-padrão ( $S_B$ ) de  $9,12 \mu$  e  $b$  é o valor do coeficiente angular da curva analítica. Nestas condições, o limite de detecção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi estimado em  $5,46 \mu\text{mol L}^{-1}$  e o de quantificação foi de  $18,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . O valor de limite de detecção obtido para este eletrodo está de acordo com os obtidos na literatura, conforme Tabela 2.

**Tabela 2.** Comparação dos diferentes eletrodos utilizando a enzima HRP para detecção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

| <i>Eletrodo</i> | <i>Modificação</i>                 | <i>Faixa linear</i>               | <i>LD (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</i> | <i>Ref</i>    |
|-----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|---------------|
| Ouro            | MWCNTCOOH/Pan/HRP                  | 0,086 – 10,0 mmol L <sup>-1</sup> | 86,0                                          | [81]          |
| Ouro            | Ácido tioláctico/HRP               | 0,1 – 1,0 mmol L <sup>-1</sup>    | 5,46                                          | Este trabalho |
| Ouro            | PAMAM-G4/cistamina/<br>AuNps/HRP   | 0,01 - 2,5 mmol L <sup>-1</sup>   | 2,0                                           |               |
| Ouro            | MUA-MCH/ Cyt c/ DNA/ Cyt c-<br>HRP | 0,05 – 90,0 mmol L <sup>-1</sup>  | 27,3                                          | [90]          |

MWCNTCOOH/PAn/HRP = nanotubos de carbono funcionalizados com grupos carboxílicos/polianilina; MUA-MCH/ Cyt c/ DNA/ Cyt c-HRP = ácido 11-mercaptoundecanóico e 6-mercapto-1-hexanol/citocromo c/DNA/citocromo c-HRP.

Fonte: a autora

O valor do limite de detecção encontrado para o biossensor desenvolvido, Au/TLA/HRP, é comparável aos biossensores apresentados na Tabela 2, os quais apresentaram bons limites de detecção. Contudo, ao comparar os valores próximos de LD entre o Au/TLA/HRP com o biossensor a base do dendrímero PAMAM com AuNps descrito por Liu *et al* <sup>[89]</sup>, verifica-se que a construção do dispositivo PAMAM-G4/cistamina/AuNps/HRP requer um número maior de etapas em relação ao desenvolvido neste trabalho, além disso é necessária a presença de AuNps para uma melhor resposta do mesmo. O Au/TLA/HRP torna-se atraente, pois a facilidade de preparo é levada em conta quando o biossensor desenvolvido é aplicado como dispositivo comercial, onde a fabricação requer rapidez no processo de preparação. Além disso, a repetibilidade da medida para o biossensor foi testada para o mesmo dispositivo a partir de cinco ensaios em dias diferentes mantendo-se a concentração fixa de 0,48 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, obtendo desvio-padrão relativo (RSD) de 4,87 %. Desta forma, o biossensor apresentou boa repetibilidade, estabilidade e sensibilidade para a determinação do peróxido de hidrogênio.

## 4.2 Monocamadas auto-organizadas mistas de ácido tioláctico e ácido 11-mercaptoundecanóico

### 4.2.1 Formação das monocamadas auto-organizadas mistas de ácido tioláctico e ácido 11-mercaptoundecanóico ( $SAM_{mista}$ )

Uma outra estratégia para confecção de biossensores é a formação das monocamadas auto-organizadas mistas ( $SAM_{mista}$ ) contendo uma mistura definida de diferentes estruturas moleculares. As  $SAM_{mista}$  são atraentes devido seu *design*, modelagem e controle das propriedades da superfície do eletrodo <sup>[39, 91]</sup>, o que proporciona a estabilidade e ancoramento das biomoléculas.

As moléculas utilizadas nesse estudo apresentam estruturas de cadeia carbônica distintas, mas ambas com os grupos terminais ácidos carboxílicos. O grupo funcional carboxílico favorece o caráter hidrofílico para o sistema, portanto, ajuda a melhorar a sua solubilidade e favorece a ligação de biomoléculas <sup>[92]</sup>. O ácido tioláctico apresenta apenas três átomos de carbono, sendo escolhido como molécula de cadeia curta e o ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA -  $HS(CH_2)_{10}COOH$ ) foi utilizado como molécula de cadeia longa. As SAMs formadas com o ácido tioláctico, são relativamente mais desordenadas, tornando mais acessível a superfície do eletrodo. Esse fato ocorre devido à pequena distância entre a superfície metálica e a monocamada. No entanto para moléculas de cadeia mais longa <sup>[93]</sup> como o MUA, ocorre maior passivação dificultando o processo de transferência de elétrons. A inserção da molécula de cadeia curta (TLA) torna interessante neste estudo, pois facilita a transferência eletrônica na molécula de MUA que possui um comportamento isolante. Desta forma, espera-se que o TLA possibilite o aumento da condutividade da  $SAM_{mista}$ , enquanto o MUA confere a estabilidade à monocamada e o posterior ancoramento do material biológico. Segundo Mendes *et al* <sup>[59]</sup> a utilização de eletrodos de ouro modificados com cadeias curtas até 4 átomos de carbono, a transferência de elétrons ocorre através da SAM, produzindo perfis voltamétricos muito similares aos observados com o eletrodo de ouro sem modificação. No caso das cadeias longas, tal como o MUA a transferência de elétrons é parcialmente bloqueada, não apresentando sinais faradaicos.

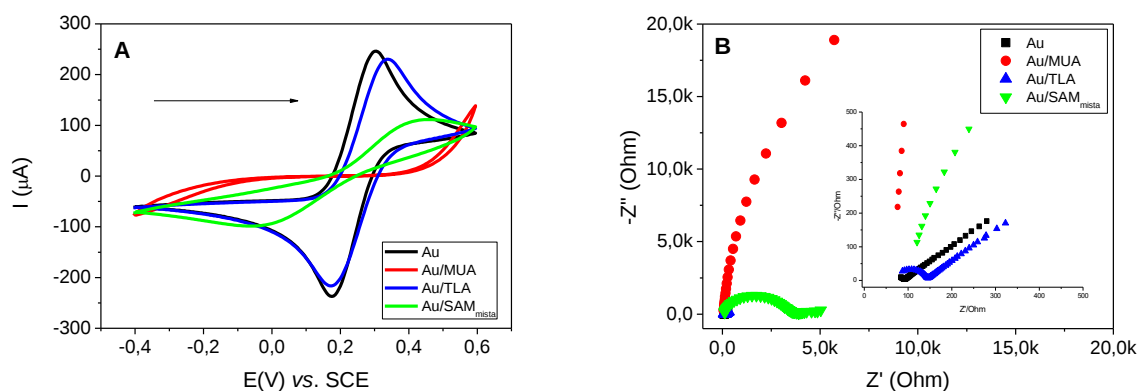
Uma vez que o comportamento eletroquímico dos adsorbatos são diferentes, em geral, as concentrações de grupos funcionais terminais nas superfícies  $SAM_{mistas}$  e as distribuições dos domínios moleculares na escala nanométrica não dependem linearmente das proporções de concentração na solução mista <sup>[94]</sup>. Assim, na formação da  $SAM_{mista}$ , a quantidade moléculas de

TLA não pode ser muito pequena, pois dificultaria a resistência de transferência eletrônica imposta pelo MUA. Ao contrário, se a quantidade de moléculas de TLA for muito grande, o comportamento eletroquímico da SAM<sub>mista</sub> torna-se equivalente ao comportamento do eletrodo Au/TLA.

Dessa forma como pretende-se obter uma SAM<sub>mista</sub> com uma configuração que permita a transferência de elétrons e possibilite o aumento da estabilidade da monocamada, optou-se por trabalhar com concentrações menores dos tióis quando comparado aos estudos anteriores. Segundo relatos na literatura, para a formação das monocamadas binárias, normalmente utilizam-se concentração das moléculas em torno de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> <sup>95</sup>. Dessa forma, para os estudos realizados foram escolhidas as concentrações de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> para as SAM de TLA e MUA, e para SAM<sub>mista</sub> 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de TLA e 0,25 mmol L<sup>-1</sup> de MUA.

O efeito da adsorção de cada molécula na formação das monocamadas foi avaliado por medidas eletroquímicas na presença da molécula sonda [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>-3/-4</sup>, conforme Figura 21. Na voltametria cíclica, os eletrodos modificados apresentaram correntes faradaicas mais baixas em comparação com a superfície de ouro não modificada. Isto ocorre, devido à presença de grupos carboxílicos na monocamada os quais dificultam a transferência de elétrons da molécula sonda para a superfície do eletrodo (Fig.21-A).

**Figura 21.** (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo de Au, das monocamadas isoladas (Au/TLA e Au/MUA 1,0 mmol L<sup>-1</sup>) e SAM<sub>mista</sub> (obtida a partir de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de TLA e 0,25 mmol L<sup>-1</sup> de MUA). Eletrólito suporte: solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo 5,0 mmol L<sup>-1</sup> do par redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>-3/-4</sup> e  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  (B) Gráficos de Nyquist do eletrodo de ouro, Au/MUA, Au/TLA e Au/SAM<sub>mista</sub> em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo 0,05 mol L<sup>-1</sup> de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>-3/-4</sup>, amplitude de pulso de 10 mV e faixa de frequência de 100 mHz a 10 kHz.



Fonte: a autora

Pode ser observado na Figura 21-A a presença um par de picos ( $E_{pa} = 0,35 \text{ V}$  e  $E_{pc} = 0,17 \text{ V}$ ) semelhante ao eletrodo de ouro sem modificação ( $E_{pa} = 0,31 \text{ V}$  e  $E_{pc} = 0,17 \text{ V}$ ), entretanto com uma diminuição da corrente de pico. Esta diminuição está relacionada ao processo cinético de transferência de elétrons, indicando que o TLA foi imobilizado sobre a superfície de ouro. Como a organização e orientação das moléculas de cadeias longas são mais demoradas, o eletrodo Au foi deixado imerso durante um período de 24 h na solução de tiol MUA. Para o eletrodo Au/MUA, não foi possível determinar os parâmetros eletroanalíticos devido à falta de picos de oxidação e redução em todos os tempos de imersão estudados. Isto é devido provavelmente ao elevado grau de empacotamento da monocamada de cadeia longa, conferindo alto recobrimento superficial, dificultando a transferência de elétrons entre as espécies  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e a superfície do metal <sup>[96]</sup>. Para a SAM<sub>mista</sub>, quando há mistura entre o TLA e o MUA o voltamograma apresentou um deslocamento nos potenciais ( $E_{pa} = 0,45 \text{ V}$  e  $E_{pc} = -0,05 \text{ V}$ ), assim como uma diminuição da corrente de pico em comparação com o Au/TLA.

Estes resultados foram confirmados por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) utilizando o par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  como molécula sonda. A EIE é amplamente utilizada para avaliar a integridade estrutural da monocamada e também para determinar a resistência de transferência de elétrons das monocamadas <sup>[97]</sup>. Na Figura 21-B observa-se que os espectros de impedância dos eletrodos mostram duas regiões distintas, o semicírculo (frequências elevadas) corresponde o processo de transferência de elétrons, enquanto a linha (frequências mais baixas) representa o processo de difusão <sup>[98, 99]</sup>.

Como discutido anteriormente pelos dados VC, observou-se um perfil muito diferente para o Au/MUA em comparação com o Au/TLA e eletrodo de ouro sem modificação. A monocamada mista apresentou novamente um perfil intermediário em relação às SAMs isoladas. Os valores de resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ) obtidos com EIE para o Au/MUA foram  $46400,0 \, \Omega$ , Au/TLA  $77,3 \, \Omega$  e para SAM<sub>mista</sub>  $3300,0 \, \Omega$ . Isto indica que com o aumento do comprimento da cadeia de carbono do tiol adsorvida, a energia necessária para os elétrons tunelarem até à superfície metálica aumenta drasticamente <sup>[100]</sup>.

A capacitância pode ser obtida através da seguinte equação (Eq. 2). Para tanto, faz-se uma extrapolação do semicírculo para o eixo real ( $Z'$ ), enquanto a capacitância é obtida relacionando-se a frequência no máximo do semicírculo com a resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ) <sup>[101]</sup>.

$$C = \frac{1}{2\pi \omega_{m\acute{a}x} R_{ct}} \quad \text{Eq. 2}$$

Sendo que  $C$  é a capacitância (F),  $\omega_{m\acute{a}x}$  corresponde à frequência no ponto máximo (Hz) do arco capacitivo e  $R_{ct}$  é a resistência de transferência de carga. A capacitância do filme SAM representa a soma em série das capacitâncias do filme e das duplas camadas nas interfaces substrato/filme e filme/solução. Os valores obtidos para as monocamadas foram 0,067  $\mu\text{F}$  para o MUA, 0,449  $\mu\text{F}$  para o TLA e 0,161  $\mu\text{F}$  para a SAM<sub>mista</sub>. Pode ser constatado que os valores de capacitância aumentam enquanto os valores de resistência de transferência de carga dos filmes SAMs diminuem. Esse fato indica que as SAMs formaram um filme protetor sobre a superfície do ouro, dificultando o processo de transferência de carga na interface metal/meio.

Adicionalmente, os experimentos de EIE permitem avaliar a influência das SAMs sobre a constante aparente de velocidade do par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ . Considerando que a reação eletroquímica está em equilíbrio e a concentração do oxidante e redutor são iguais, a constante aparente de velocidade ( $k_{app}$ ) pode ser expressa como equação 3 [102].

$$k_{app} = \frac{RT}{F^2 R_{ct} C} \quad \text{Eq. 3}$$

Sendo que  $C$  é a concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ ) do complexo  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ ,  $R_{ct}$  é a resistência de transferência de carga,  $R$  é a constante física dos gases,  $T$  é a temperatura e  $F$  é a constante de Faraday. O eletrodo Au/SAM<sub>mista</sub> ( $k_{app} = 1,60 \times 10^{-10} \text{ cm s}^{-1}$ ) apresenta um valor intermediário em comparação ao Au/TLA ( $k_{app} = 6,88 \times 10^{-9} \text{ cm s}^{-1}$ ) e Au/MUA ( $k_{app} = 1,15 \times 10^{-11} \text{ cm s}^{-1}$ ). O valor intermediário do eletrodo Au/SAM<sub>mista</sub> na constante aparente de velocidade é decorrente das propriedades sinérgicas que surgiram com a imobilização do TLA junto à monocamada de MUA sobre o eletrodo de ouro, o que possibilitou a diminuição da resistência de transferência de carga comparada ao Au/MUA, acelerando a velocidade da reação redox. Esse aumento no valor de  $k_{app}$  está em concordância com os experimentos de VC e EIE, que mostraram que o SAM<sub>mista</sub> melhora a reversibilidade do processo redox em relação ao eletrodo Au/MUA além de ocasionar uma diminuição no valor de  $R_{ct}$ , indicando que a transferência de elétrons é facilitada no Au/SAM<sub>mista</sub> [103].

O recobrimento da superfície pelas monocamadas foi determinado pelas medidas de impedância através da resistência de transferência de carga. Considerando que a corrente faradaica do processo redox das espécies eletroativas ocorre somente sobre os sítios ativos

existentes sobre o eletrodo modificado, pode-se estimar a taxa de recobrimento por meio da equação 1. O eletrodo com a maior cobertura de superfície foi o Au/MUA  $\Theta = 0,999$ , que tem uma cobertura muito densa e homogênea, sendo assim sua  $k_{app}$  é menor em comparação aos outros eletrodos. Este comportamento está de acordo com a literatura para monocamadas de cadeia longa. O revestimento do eletrodo Au/TLA foi  $\Theta = 0,580$ , enquanto o Au/SAM<sub>mista</sub>  $\Theta = 0,990$  foi próximo ao eletrodo Au/MUA, praticamente cobrindo toda a superfície, confirmando que as moléculas de cadeia longa, mesmo na menor concentração em comparação a TLA, tornam a superfície mais ordenada e compacta. Assim, os resultados de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica mostram que o comportamento eletroquímico do Au/TLA e Au/MUA são extremamente distintos e que ao misturarmos ambos, obtém-se um comportamento misto, indicando que ocorreu a co-adsorção dos tióis.

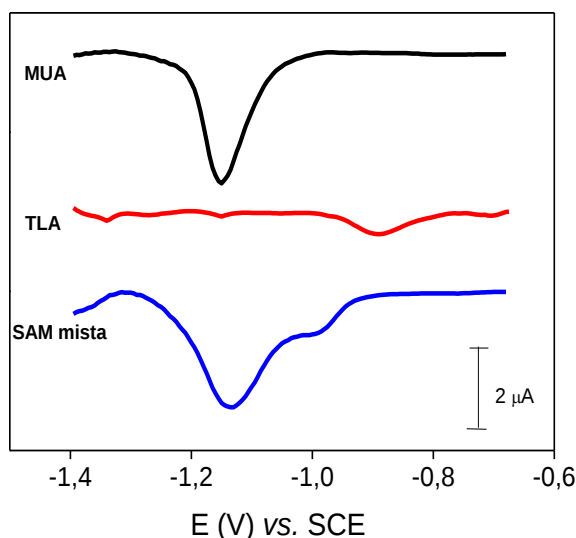
#### **4.2.2 Dessorção redutiva das monocamadas auto-organizadas de ácido tioláctico, ácido 11-mercaptopundecanóico e mistura de ambos**

Embora a montagem de alcanotióis sobre o Au é um processo espontâneo, a sua estabilidade varia em diferentes faixas de potenciais eletroquímicos. Em potenciais muito negativos ou positivos pode fazer com que os tióis sofram dessorção (redutiva ou oxidativa). Os tióis sofrem dessorção redutiva quando potenciais mais negativos são aplicados em eletrodos modificados. Os estudos do mecanismo deste processo sugerem que a dessorção ocorre primeiramente nas regiões de defeitos das SAMs para prosseguir para regiões com maior organização e empacotamento <sup>[104]</sup>. O processo físico-químico de dessorção redutiva eletroquímica pode ser descrito seguinte reação <sup>[105]</sup>:



O potencial na qual ocorre a dessorção das SAMs depende de vários fatores, tal como o tamanho da cadeia carbônica, o grau de ordenamento e o número de interações intermoleculares com o filme orgânico e a cristalinidade do substrato. Os eletrodos modificados com diferentes SAMs apresentam potenciais de redução entre -0,6 e -1,4 V em solução aquosa em meio básico. Pela voltametria de pulso diferencial foi possível caracterizar as diferentes SAMs, conforme Figura 22.

**Figura 22.** Voltamogramas de pulso diferencial das diferentes monocamadas em NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>,  $\nu = 20$  mVs<sup>-1</sup>.



Fonte: a autora

Pela Figura 22, foi possível caracterizar as monocamadas pela diferença no potencial do pico de redução. Quando a molécula adsorvente contém um pequeno número de metilas em sua cadeia, as interações laterais não são suficientes para estabilizar a estrutura [106]. Como o crescimento uniforme das monocamadas é dependente das interações intermoleculares, os tamanhos das cadeias carbônicas desempenham um papel importante na formação de estruturas bem ordenadas. O TLA possui apenas um grupo metileno, logo, a interação lateral entre esses grupos é fraca e não estabiliza tão fortemente como uma molécula de cadeia longa. Esse fato explica o pico de redução do TLA ocorrer em potenciais menos negativos (-0,89 V) devido essas interações serem mais fracas quando comparada ao MUA. Como observado na literatura as moléculas contendo maior número de grupos metilenos, as interações entre as cadeias laterais são mais intensas, conferindo maior estabilidade a monocamada formada [107].

Na Figura 22, a dessorção da monocamada do eletrodo Au/MUA confirma a modificação do ouro, o qual apresenta um intenso pico de redução em -1,15V. Esta molécula contém um número maior de metilas, portanto as interações laterais entre suas moléculas são mais intensas, logo seu pico de redução ocorre em potenciais mais negativos, pois maior é a energia para sua dessorção redutiva.

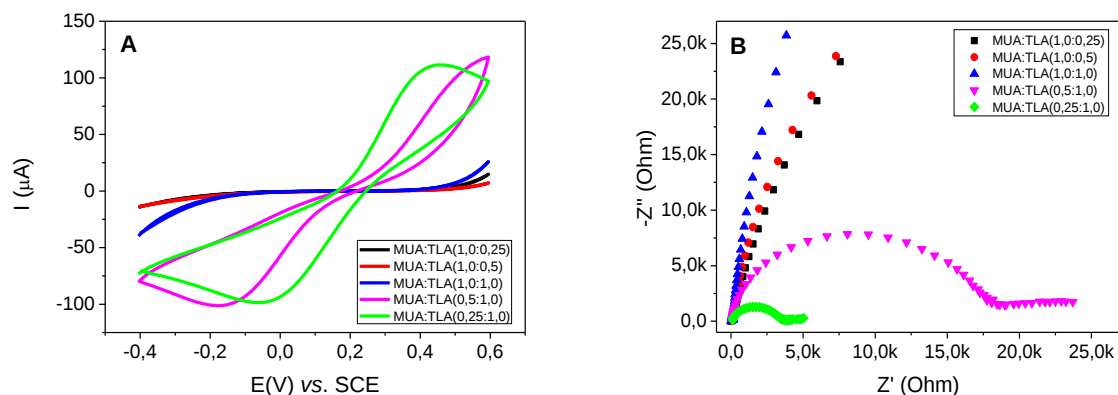
Para a SAM<sub>mista</sub>, foi observado que o voltamograma de dessorção apresenta um perfil misto dos picos de redução em relação as duas moléculas (TLA e MUA). Para esta modificação

foi possível verificar um alargamento do pico de redução característico do MUA e um leve deslocamento do  $E_p$  para potenciais menos negativos (-1,13 V), assim como um deslocamento do pico de redução característico da molécula de TLA de -0,89 para -0,99 V. Isso ocorre devido à interação entre o tiol de cadeia curta com o de cadeia longa, o que comprova a formação da SAM<sub>mista</sub> sobre a superfície do eletrodo de ouro. No entanto, para analisarmos com maiores detalhes a formação da monocamada mista, faz-se necessário um estudo mais detalhado da composição dessa superfície pelas técnicas de voltametria cíclica e EIE.

#### ***4.2.3 Influência da concentração dos tióis na formação da monocamada mista***

A obtenção da SAM mista pela co-adsorção dos tióis normalmente produz monocamadas com componentes misturados homogeneamente <sup>[108]</sup>. Para tanto, exige atenção a alguns fatores importantes, tal como a concentração dos tióis precursores em solução. Neste estudo verificou-se como a concentração de cada tiol influencia no comportamento da transferência eletrônica da espécie redox. Dessa forma, foram avaliadas cinco diferentes configurações para o eletrodo de Au-SAM<sub>mista</sub>, sendo obtidas pela imersão do eletrodo de ouro em uma solução etanólica contendo MUA juntamente com TLA variando-se as concentrações de ambos entre 0,25 a 1 mmol L<sup>-1</sup>. Estudos experimentais demonstram que a velocidade de transferência de elétrons pode ser sensivelmente afetada em função da modificação da superfície dos eletrodos <sup>[109]</sup>, sendo relacionada com base no grau de interação entre o modificador e a superfície do eletrodo. Na Figura 23-A, estão apresentados o comportamento voltamétrico desses eletrodos. A fim de confirmar esse comportamento, foram realizados também estudos de espectroscopia de impedância eletroquímica (Figura 23-B).

**Figura 23.** (A) Voltamogramas cíclicos das monocamadas mistas obtidas em diferentes concentrações dos tióis (0,25 a 1,0 mmol L<sup>-1</sup>). Eletrólito suporte: solução KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo 0,5 mol L<sup>-1</sup> do par redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup>,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Gráficos de Nyquist dos eletrodos Au/(MUA:TLA) nas diferentes proporções, em solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo 0,5 mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>, amplitude de pulso de 10 mV e faixa de frequência de 10 kHz a 100 mHz.



Fonte: a autora

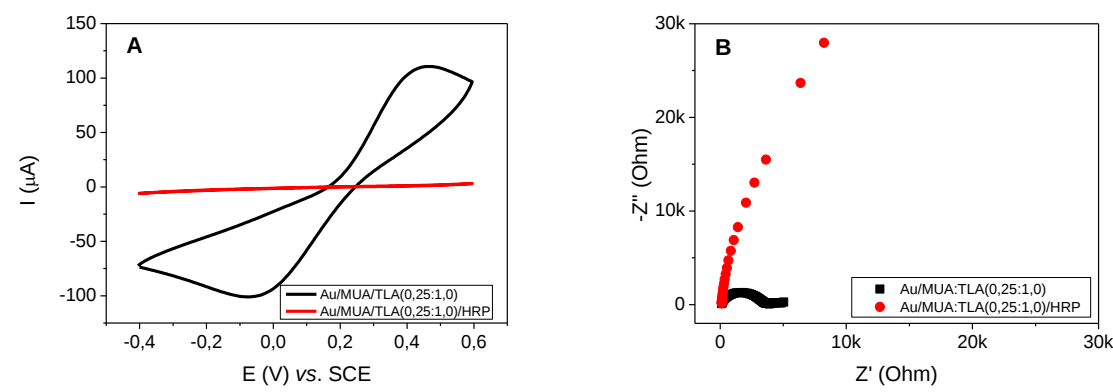
De acordo com as Figuras 23-A e 23-B a molécula de cadeia longa (MUA) como esperado exerce um efeito isolante para a superfície eletródica, principalmente quando sua concentração é de 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, mesmo na presença da molécula de cadeia curta. Somente quando a concentração de MUA é diminuída, como no caso das seguintes proporções (0,5:1,0 e 0,25:1,0 MUA:TLA), o comportamento eletroquímico tende a se aproximar do perfil do TLA. Quando a concentração de MUA permanece constante e aumenta-se a de TLA a corrente de pico aumenta e a resistência de transferência de carga diminui, pois a molécula de cadeia curta facilita a transferência eletrônica. No intuito de verificar a eficiência da SAM mista como plataforma para imobilização de enzima, utilizou a proporção de 0,25 mmol L<sup>-1</sup> de MUA para 1,0 mmol L<sup>-1</sup> TLA nos estudos posteriores.

#### 4.2.4 Imobilização da enzima HRP sobre a SAM<sub>mista</sub>

As monocamadas mistas de ácidos carboxílicos foram utilizadas para a imobilização da enzima horseradish peroxidase (HRP). As moléculas de cadeia carbônica longa (MUA) favorecem o ancoramento da enzima enquanto as moléculas de cadeias curtas (TLA) auxiliam no processo de transferência eletrônica. Através de estudos anteriores, foi comprovado experimentalmente que o método da ligação covalente, no qual a reação dos grupos terminais carboxílicos da SAM com os ligantes EDC/NHS favorece uma imobilização mais estável da

enzima, assim optou-se por este método para a obtenção do biossensor. Para uma prévia constatação da imobilização da HRP na superfície eletródica da SAM<sub>mista</sub>, estudos de VC e EIS foram realizados (Figura 24), para acompanhar o processo de formação do biossensor.

**Figura 24.** Caracterização por (A) voltametria cíclica e (B) espectroscopia de impedância eletroquímica para o eletrodo Au/MUA:TLA e Au/MUA:TLA/HRP, na presença de 5 mmol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH = 6,5).



Fonte: a autora

Com a imobilização da enzima HRP sobre a SAM<sub>mista</sub>, observa-se que ocorre alterações significativas no comportamento eletroquímico do biossensor na presença da molécula Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-/3-</sup>. Os parâmetros eletroquímicos obtidos experimentalmente pelas duas técnicas estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Parâmetros eletroquímicos dos diferentes eletrodos na presença da molécula sonda

| Superfície               | Ip (μA) | Rct (Ω)   |
|--------------------------|---------|-----------|
| Au/MUA:TLA(0,25:1,0)     | 50,87   | 3.308,0   |
| Au/MUA:TLA(0,25:1,0)/HRP | -       | 260.547,2 |

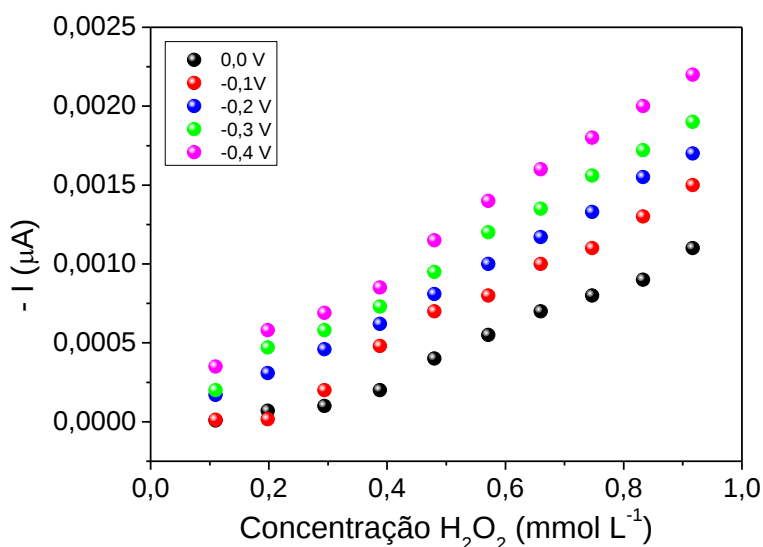
Fonte: a autora

Pode ser observado que após a imobilização da enzima na monocamada mista, Au/(MUA:TLA)/HRP, houve um aumento significativo na resistência de transferência de carga (Rct), sendo esta alteração no sinal de impedância relacionada com a automontagem da monocamada e imobilização da biomolécula. A incorporação de HRP no filme de SAM<sub>mista</sub> foi confirmada pelos dois métodos, voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Comportamento similar foi descrito no trabalho de Song *et al* <sup>[90]</sup> que pela EIE mostraram que as diferentes moléculas (11-mercaptoundecanóico-6-

mercaptohexanol/DNA/citrocromoC/HRP) foram imobilizadas com sucesso na superfície do eletrodo de Au, sendo acompanhada pelo aumento da Rct devido a inibição da transferência de eletrônica.

Medidas amperométricas foram utilizadas para verificar o comportamento do biossensor Au/(MUA:TLA)/HRP na presença do  $H_2O_2$ . O potencial aplicado tem uma influência importante sobre a resposta biossensor porque a sensibilidade e seletividade do sistema dependem em parte do potencial aplicado. O efeito do potencial aplicado na resposta do biossensor enzimático foi medido de 0,0 a -0,4 V, conforme Figura 25.

**Figura 25.** Curvas de intensidade de corrente em função da concentração de  $H_2O_2$  para o biossensor Au/MUA:TLA/HRP, obtidas por cronoamperometria em diferentes potenciais aplicados, em tampão PBS, pH 6,5.

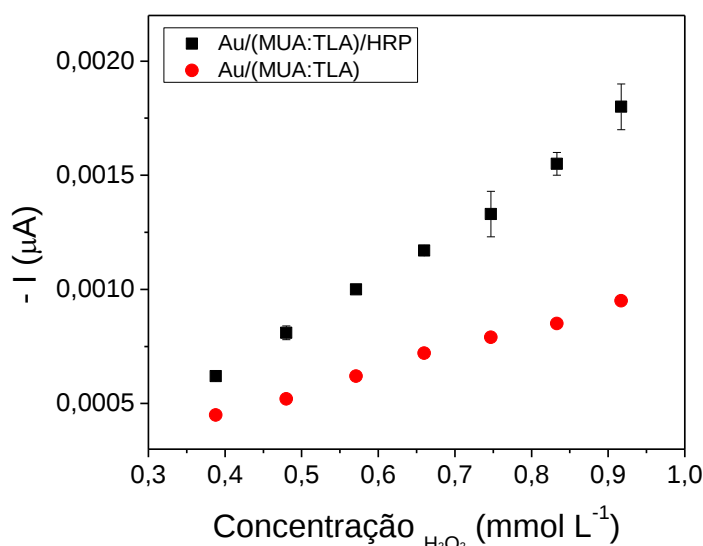


Fonte: a autora

Pode ser observado a partir da Figura 25 que a sensibilidade do biossensor aumenta com o aumento do potencial aplicado (potenciais mais negativos). Quando o biossensor foi analisado nos potenciais de -0,1 e 0,0 V, observou-se que os valores de intensidade de corrente em relação à concentração de  $H_2O_2$  não foram lineares (-0,1 V,  $R = 0,987$ ; 0,0 V,  $R = 0,974$ ). No entanto, nos potenciais aplicados entre -0,4 e -0,2 V, os biossensores apresentaram comportamento amperométrico linear (-0,4 V,  $R = 0,993$ ; -0,3 V,  $R = 0,995$ ; -0,2 V,  $R = 0,996$ ). Também nestes potenciais, pequenas mudanças na resposta da corrente foram observadas, portanto o potencial de -0,2 V foi selecionado para os estudos posteriores. O que justifica a escolha deste é que em valores de potenciais muito negativos, as moléculas de enzima podem ser inativadas, pois a estabilidade operacional do biossensor HRP é afetada pela polarização de potencial <sup>[110]</sup>.

A eficiência da imobilização da enzima HRP sobre a SAM<sub>mista</sub> foi avaliada por medidas amperométricas na presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como mostra a Figura 26. A sensibilidade do eletrodo Au/MUA:TLA/HRP para o substrato enzimático (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi maior comparado ao eletrodo somente com o filme MUA:TLA, indicando que os grupos carboxílicos favorecem a imobilização da enzima HRP mantendo sua atividade enzimática e eficiência.

**Figura 26.** Comparação da resposta amperométrica do Au/MUA:TLA(0,25:1,0) e Au/MUA:TLA(0,25:1,0)/HRP em diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na faixa de 0,45 a 0,95 mmol L<sup>-1</sup> em Tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,5 e potencial aplicado de -0,2 V.



Fonte: a autora

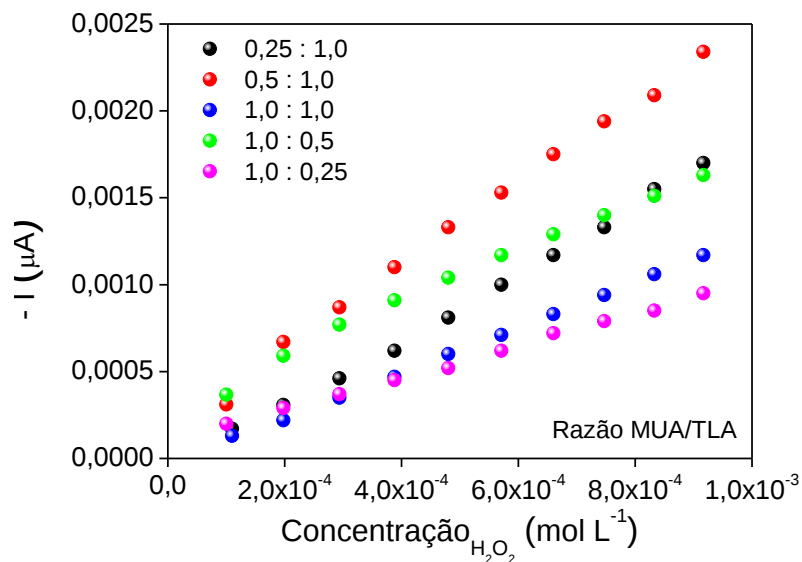
Segundo reportado na literatura <sup>[111]</sup>, a taxa de reação catalítica não depende somente da enzima imobilizada, mas também da difusão entre o substrato e a matriz. Portanto, um estudo amperométrico foi proposto para avaliar a influência das concentrações das monocamadas para a formação do biossensor Au/(MUA:TLA)/HRP que fornece uma imobilização mais eficiente da enzima.

#### 4.2.5 Monocamadas auto-organizadas mistas utilizadas como biossensores

Com a finalidade de verificar a eficiência do processo de formação do biossensor enzimático foram avaliadas as cinco diferentes configurações das monocamadas mistas (obtidas com diferentes proporções de tióis), no intuito de verificar qual delas fornece um ambiente mais

favorável para a imobilização da enzima *horseradish peroxidase* (HRP) sem prejudicar a sua atividade catalítica. Pela cronoamperometria avaliou-se o comportamento eletroquímico destes diferentes biossensores na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 27).

**Figura 27.** Relação da intensidade de corrente em relação à concentração do  $\text{H}_2\text{O}_2$  dos diferentes tipos de monocamadas mistas na faixa de concentração de  $1,1$  a  $9,17 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Potencial aplicado  $-0,2 \text{ V}$ , eletrólito suporte tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,5.



Fonte: a autora

De acordo com os gráficos da Figura 27 observa-se que a sensibilidade do eletrodo Au/MUA:TLA/HRP obtida para incorporação da enzima HRP ligada covalentemente sobre a monocamada mista preparada na proporção 0,5 MUA:1,0 TLA é mais alta ( $2,38 \mu\text{A mmol L}^{-1}$ ) em comparação as outras modificações. A Tabela 4 apresenta os valores de sensibilidade das diferentes SAMs mistas.

**Tabela 4.** Características dos biossensores obtidas com os diferentes eletrodos de SAM mistas.

| <i>Bbiossensor</i>        | <i>Sensibilidade</i>          | <i>Coefficiente de correlação (R)</i> |
|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| Au/MUA:TLA(0,25:1,0*)/HRP | $1,92 \mu\text{A mol L}^{-1}$ | 0,997                                 |
| Au/MUA:TLA(0,5:1,0*)/HRP  | $2,38 \mu\text{A mol L}^{-1}$ | 0,996                                 |
| Au/MUA:TLA(1,0:1,0*)/HRP  | $1,30 \mu\text{A mol L}^{-1}$ | 0,999                                 |
| Au/MUA:TLA(1,0:0,5*)/HRP  | $1,48 \mu\text{A mol L}^{-1}$ | 0,991                                 |
| Au/MUA:TLA(1,0:0,25*)/HRP | $0,91 \mu\text{A mol L}^{-1}$ | 0,998                                 |

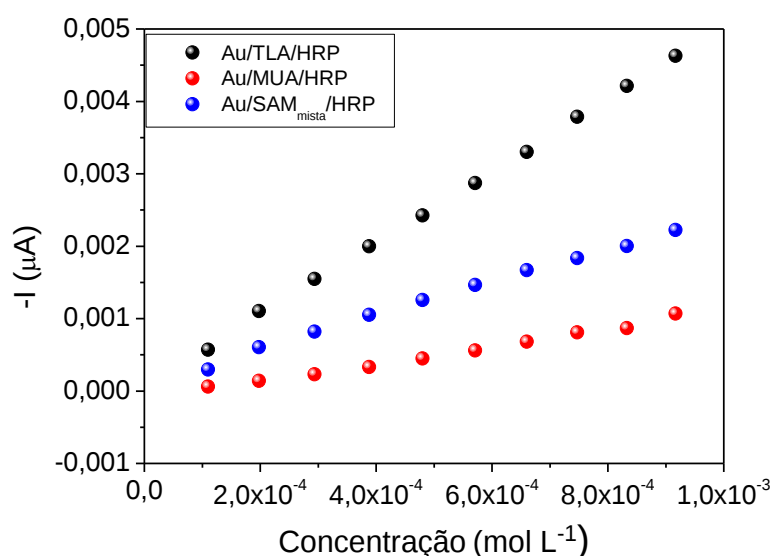
\* $\text{mmol L}^{-1}$  – concentrações das soluções para a formação das monocamadas

Fonte: a autora

A SAM mista obtida com MUA na concentração  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  apresentou as menores sensibilidades, pois a barreira imposta pelo comprimento da cadeia carbônica exige uma energia maior para que ocorra a transferência eletrônica, e consequentemente a corrente diminui. No entanto, quando a proporção entre as monocamadas são iguais Au/(MUA:TLA(1,0:1,0))/HRP verifica-se que a sensibilidade do biossensor diminui para  $1,30 \mu\text{A mol L}^{-1}$ , enquanto que para o eletrodo Au/(MUA:TLA(1,0:0,5))/HRP a sensibilidade foi de  $1,48 \mu\text{A mol L}^{-1}$ . Para a Au/(MUA:TLA(1,0:1,0))/HRP, esperava-se uma maior resposta de corrente, pois a concentração de TLA deveria favorecer a transferência eletrônica. Uma possível explicação para este comportamento é que apesar do aumento da concentração da solução de TLA, a quantidade de moléculas MUA adsorvidas provavelmente mantem-se a mesma para a proporção MUA/TLA(1,0:0,5) e desta forma não há variação na quantidade de moléculas de TLA adsorvidas. Portanto escolheu-se a proporção MUA  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e TLA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  para dar continuidade aos estudos, pois esta apresentou maior sensibilidade. A monocamada Au/(MUA/TLA(0,5:1,0))/HRP será a partir de agora designada Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP.

O comportamento eletroquímico do biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP foi comparado aos biossensores obtidos com as monocamadas isoladas (Au/TLA/HRP e Au/MUA/HRP) pela cronoamperometria na presença do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , conforme mostrado na Figura 28.

**Figura 28.** Dependência da intensidade de corrente em relação à concentração do  $\text{H}_2\text{O}_2$  dos diferentes biossensores Au/TLA/HRP, Au/MUA/HRP e Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP na faixa estudada de concentração de  $1,1$  a  $9,17 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Potencial aplicado  $-0,2 \text{ V}$ , eletrólito suporte tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,5.



Fonte: a autora

Segundo a Figura 28, verifica-se que os três biossensores apresentaram aumento linear da corrente de redução em função da concentração do  $H_2O_2$ . Os valores de sensibilidades destes diferentes biossensores estão apresentados na Tabela 5:

**Tabela 5.** Comparação de sensibilidade entre os biossensores Au/TLA/HRP, Au/MUA/HRP e Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP.

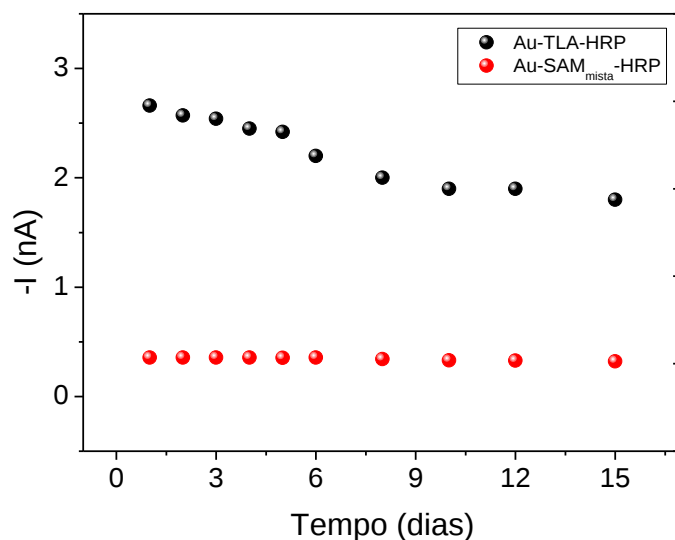
| <i>Biossensor</i>        | <i>Sensibilidade</i>            | <i>Coefficiente de correlação (R)</i> |
|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| Au/TLA/HRP               | 5,01 $\mu A \text{ mol L}^{-1}$ | 0,9996                                |
| Au/MUA/HRP               | 1,22 $\mu A \text{ mol L}^{-1}$ | 0,9954                                |
| Au/MUA:TLA(0,5:1,0*)/HRP | 2,38 $\mu A \text{ mol L}^{-1}$ | 0,9960                                |

\*mmol  $L^{-1}$  – concentrações das soluções para a formação das monocamadas

Fonte: a autora

O biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP apresenta uma menor sensibilidade quando comparado ao biossensor contendo somente a molécula de TLA. No entanto, em estudos anteriores, verificou-se que a estabilidade do biossensor Au/TLA/HRP é baixa (aproximadamente 6 dias) o que compromete a sua utilização por um longo período de tempo. Esta baixa estabilidade está relacionada ao fato do recobrimento da superfície dar-se com uma molécula de cadeia curta TLA, o que ocasiona menor organização da enzima devido à baixa compatibilidade geométrica [46]. Portanto, a fim de aumentar a estabilidade optou-se por trabalhar com a molécula de MUA. O biossensor construído somente com o MUA, proporciona uma inibição na resposta da enzima, isto é a cadeia longa dificulta o processo de elétrons do substrato  $H_2O_2$ , apresentando menor sensibilidade. A mistura dessas duas moléculas MUA/TLA na formação do Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP apresenta uma sensibilidade intermediária comparada aos biossensores obtidos com as monocamadas isoladas. A proposta da SAM mista (MUA/TLA) é proporcionar um maior ancoramento da enzima pela molécula de MUA, enquanto as moléculas de TLA auxiliam no processo de transferência eletrônica. Portanto, podemos comprovar que a plataforma MUA/TLA se comporta como um bom transdutor, pois facilita a transferência eletrônica quando comparada somente com o MUA e aumenta o tempo de vida do dispositivo, segundo Figura 29.

**Figura 29.** Estudo do tempo de vida dos biossensores Au/TLA/HRP e Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP em tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,5 na presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,4 mmol L<sup>-1</sup>.

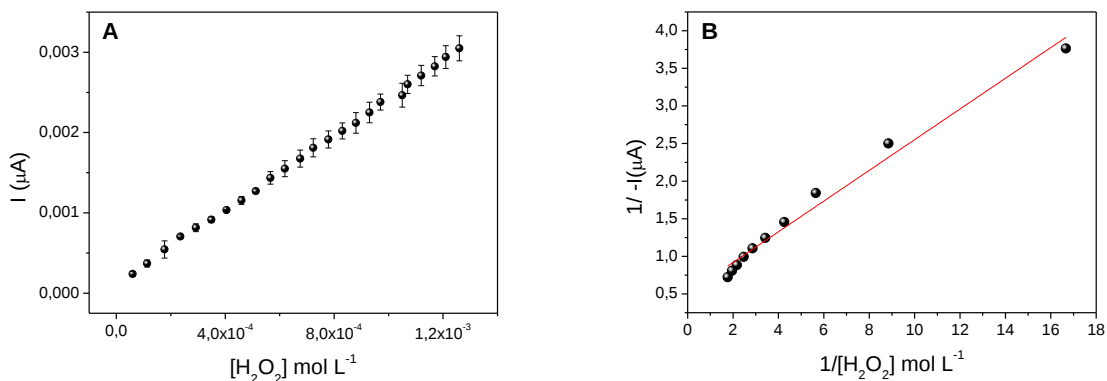


Fonte: a autora

Conforme Figura 29, verificamos que apesar dos sistema SAM<sub>mista</sub>/HRP apresentar menores valores de corrente de redução comparado ao TLA/HRP, a utilização desta plataforma confere maior número de determinações, sem alteração significativa nos valores de corrente.

Para o eletrodo Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP, calculou-se a constante aparente de Michaelis-Menten ( $K_M^{app}$ ), com base na curva analítica representada na Figura 30.

**Figura 30.** (A) Curva de adição de padrão obtida para a determinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em meio de solução tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,5 na faixa de  $5,83 \times 10^{-5}$  a  $1,26 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> para o biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP. Potencial aplicado = -0,2 V vs Ag/AgCl. (B) Gráfico de Duplo recíproco ou Lineweaver and Burk, obtido para o biossensor, Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP.



Fonte: a autora

O valor da constante de  $K_M^{app}$  fornece informações relativas à cinética enzimática, podendo indicar a atividade biológica das biomoléculas imobilizadas na superfície do eletrodo e a afinidade com o substrato, sendo obtida a partir da equação 4 de Lineweaver-Burk <sup>[112]</sup>:

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{k_m^{app}}{I_{max} C_{H_2O_2}} \quad \text{Eq. 4}$$

Sendo que,  $I_{ss}$  é a corrente de estado estacionário, após a adição do substrato,  $I_{max}$  é a corrente máxima obtida após a saturação do substrato e  $C$  é a concentração de peróxido de hidrogênio na solução <sup>[48]</sup>. Utilizando a equação, obtida a partir do gráfico da Figura 30-B, o valor do  $K_M^{app}$  para o biossensor foi de 0,40 mmol L<sup>-1</sup>. Em geral, quanto menor o valor de  $K_M^{app}$ , maior será a afinidade da enzima pelo substrato. Esse resultado foi mais baixo do que os relatados na literatura: 7,0 mmol L<sup>-1</sup> para um biossensor composto de nanotubos de parede simples e de quitosana para a imobilização de HRP <sup>[113]</sup>, 2,6 mmol L<sup>-1</sup> para o biocompósito de Au/grafeno/HRP/quitosana sobre eletrodo de carbono vítreo <sup>[114]</sup> e 1,1 mmol L<sup>-1</sup> para cisteína/AuNps/HRP sobre sílica sol-gel <sup>[115]</sup>. O valor de  $K_M^{app}$  obtido neste trabalho mostra que a imobilização da HRP sobre a SAM<sub>mista</sub> mantém sua atividade biocatalítica e que o eletrodo modificado cria uma superfície mais favorável para a interação com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Assim, o eletrodo obtido neste trabalho apresenta uma superfície favorável para a ligação da enzima HRP.

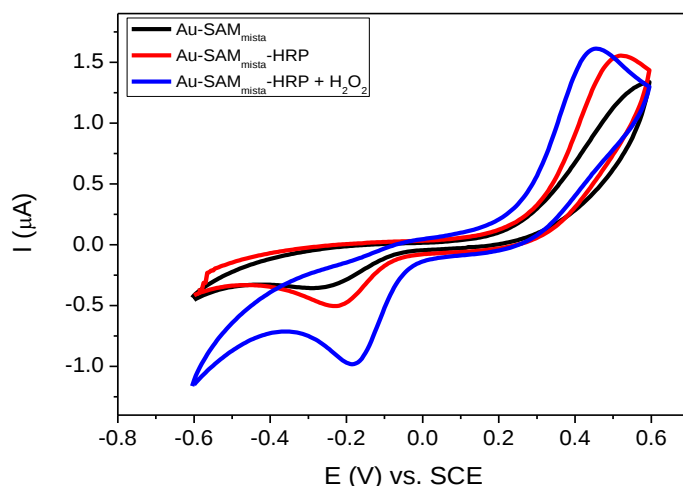
#### **4.2.6 Detecção da Hidroquinona utilizando o biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP**

O composto fenólico hidroquinona (HQ, 1,4-dihidroxibenzeno) é amplamente aplicado como componente dos reveladores fotográficos, inibidor de reações de polimerização de ácido acrílico, antioxidantes para borracha, antioxidante de alimentos e em medicina é usada no clareamento de pele. Então, existe amplamente em efluentes industriais, como os resíduos de refinarias de petróleo, plástico, couro, borracha e indústrias farmacêuticas <sup>[116, 117]</sup>. É relatado na literatura <sup>[66]</sup> que a HQ pode causar danos à saúde e contaminação ambiental, devido a sua genotoxicidade, carcinogenicidade e efeito cinético tóxico para os seres humanos e também seus efeitos tóxicos no ambiente. Dentro deste contexto, é importante dispor de metodologias de baixo custo para detecção e quantificação dos diversos tipos de fenóis, com rapidez, seletividade e sensibilidade, características encontradas nos biossensores <sup>[118]</sup>. Sendo assim

utilizou o biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP para detecção da hidroquinona pelos métodos eletroanalíticos.

A resposta dos biossensores a base da enzima peroxidase para compostos fenólicos é baseado em função da contribuição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e dos compostos fenólicos, que são doadores de elétrons <sup>[111]</sup>. A fim de elucidar o mecanismo para a determinação de HQ, os experimentos foram realizados tanto na presença quanto na ausência da enzima HRP e também do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Segundo a Figura 31, pode ser observado que ao imobilizar a enzima sobre a monocamada mista ocorre aumento nas correntes de pico da hidroquinona (HQ), em relação à SAM<sub>mista</sub>. Ao adicionar o peróxido de hidrogênio, há um aumento significativo na resposta do biossensor na redução da hidroquinona.

**Figura 31.** Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando os eletrodos (—) SAM<sub>mista</sub>, (---) SAM<sub>mista</sub>/HRP e (---) SAM<sub>mista</sub>/HRP na presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Solução Tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,5 na presença de 300 μmol L<sup>-1</sup> de hidroquinona.



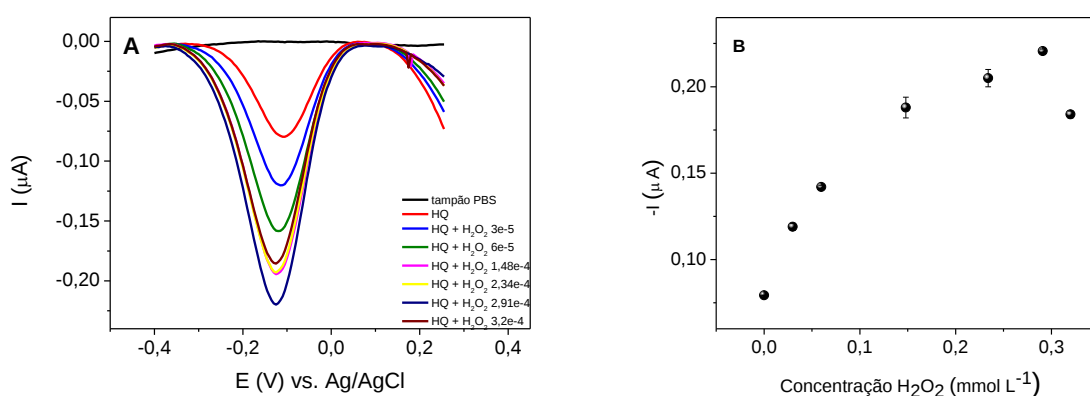
Fonte: a autora

A resposta do biossensor contendo peroxidase para detecção do composto fenólico é baseado no mecanismo de deslocamento duplo. A enzima imobilizada sobre a SAM<sub>mista</sub> é oxidada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formando o Composto I que compreende um centro oxoferril Fe (IV) e um cátion radical porfirínico. Neste primeiro passo de redução é necessário a participação da hidroquinona, que atua com agente doador de elétrons, gerando o Composto II, que contém espécies oxoferril Fe (IV). Por fim, um elétron doado por outra molécula de HQ faz com que a enzima retorne ao seu estado nativo (Fe<sup>+3</sup>). Segundo este mecanismo, os compostos fenólicos

oxidados podem ser reduzidos eletroquimicamente na superfície do eletrodo. A corrente de redução, portanto, é proporcional a concentração do hidroquinona na solução.

Como o peróxido de hidrogênio auxilia no processo de oxidação dos compostos fenólicos, o efeito da concentração deste na resposta da HQ foi investigado por voltametria de pulso diferencial (VPD), segundo Figura 32.

**Figura 32.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o biossensor SAM<sub>mista</sub>/HRP na presença da HQ (concentração fixa de  $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) variando a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na faixa de de  $3 \times 10^{-5}$  a  $3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . (B) Dependência da corrente de pico da HQ em função da concentração do  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

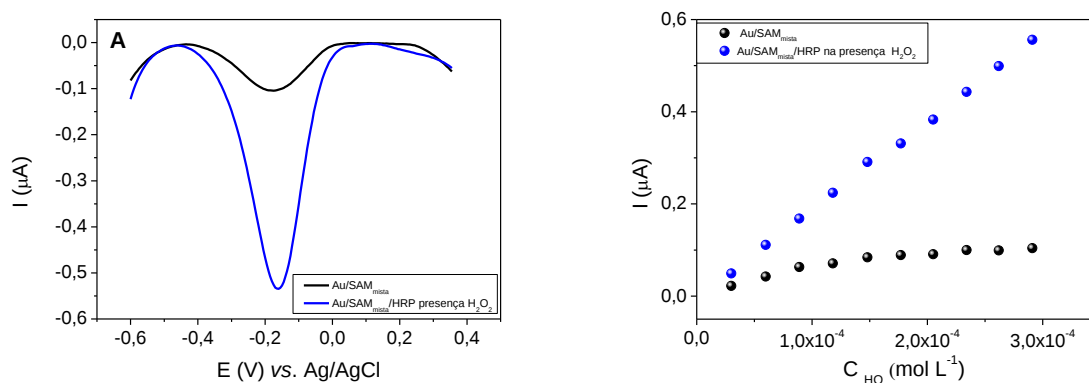


Fonte: a autora

Como pode ser observado na Figura 32, à medida que a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumenta, ocorre um aumento na corrente do biossensor até a concentração em  $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ , a partir do qual houve um decréscimo na corrente provavelmente devido a saturação da enzima. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  atua como mediador de elétrons da HQ no desempenho do sensor, até a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ . Assim, optou-se pela utilização desta concentração para estudos posteriores, uma vez que esta proporciona maior valor de corrente de redução.

A fim de verificar a eficiência do biossensor na detecção de HQ pela técnica voltamétrica de pulso diferencial, foram obtidas curvas analíticas somente para o eletrodo SAM<sub>mista</sub> e SAM<sub>mista</sub>/HRP na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A partir das curvas analíticas (Figura 33), pode-se observar que para estas configurações de eletrodo houve um aumento linear na corrente de pico em função do aumento da concentração de HQ.

**Figura 33.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial dos eletrodos Au/SAM<sub>mista</sub> e Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP na presença de 0,29 mmol L<sup>-1</sup> de HQ. (B) Curva analítica para HQ para os eletrodos na faixa de 3,0 a 29,1x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> na presença de 0,3 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



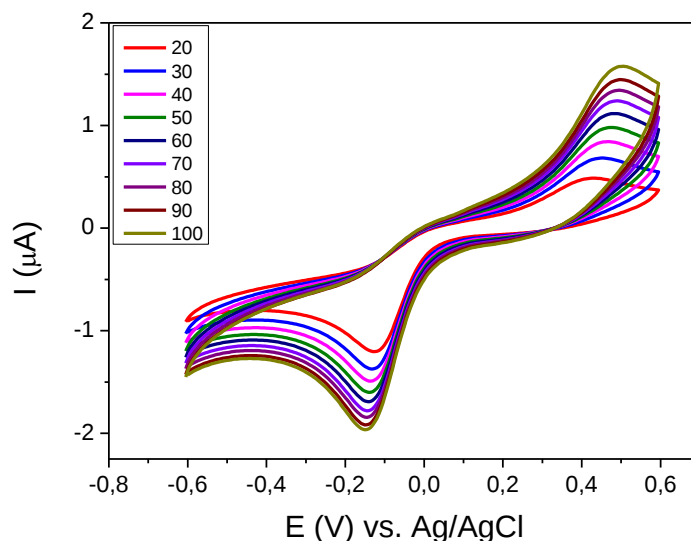
Fonte: a autora

No entanto, como mostrado na Figura 33-A, a maior resposta de corrente para a redução da hidroquinona foi observada para o eletrodo Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP. A superfície do eletrodo Au/SAM<sub>mista</sub> quando modificado com a enzima HRP apresenta um aumento no sinal analítico do pico catódico uma vez que as moléculas das monocamadas (TLA e MUA) conferem um ambiente favorável a imobilização da enzima HRP. Pelas curvas analíticas obtidas (Fig. 33-B) verificou que a sensibilidade do eletrodo de Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP (1889,80 μA mol L<sup>-1</sup>) foi muito maior do que a do eletrodo Au/SAM<sub>mista</sub> (290,53 μA mol L<sup>-1</sup>). Além disso, para o eletrodo Au/SAM<sub>mista</sub> com o aumento da concentração da HQ não foi observado o aumento significativo na corrente.

#### 4.2.7 Efeito da velocidade de varredura na presença da Hidroquinona

Com a finalidade de evidenciar o tipo de transporte de massa envolvido no processo de redução da HQ, foi realizado um estudo da velocidade de varredura (na faixa de 20 a 100 mVs<sup>-1</sup>), utilizando a técnica de VC. Este comportamento voltamétrico da HQ (0,29 mmol L<sup>-1</sup>) foi realizado como o biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, conforme Figura 34.

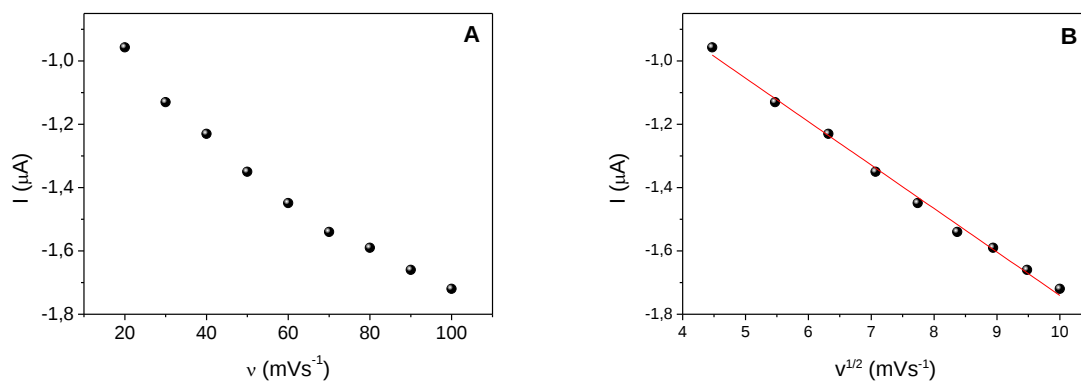
**Figura 34.** Voltamogramas cíclicos do biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP em diferentes velocidades de varredura em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> na presença de 0,29 mmol L<sup>-1</sup> de HQ e 0,3 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



Fonte: a autora

Segundo os dados obtidos na análise dos voltamogramas cíclicos (Figura 34), à medida que a velocidade de varredura aumenta, há um aumento tanto na corrente de pico anódica quanto na catódica da HQ e também um pequeno deslocamento do potencial de pico catódico em torno de 30 mV para valores mais negativos. A Figura 35 mostra a variação da corrente de pico catódica  $I_{pc}$  como função da velocidade de varredura ( $v$ ) e raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ).

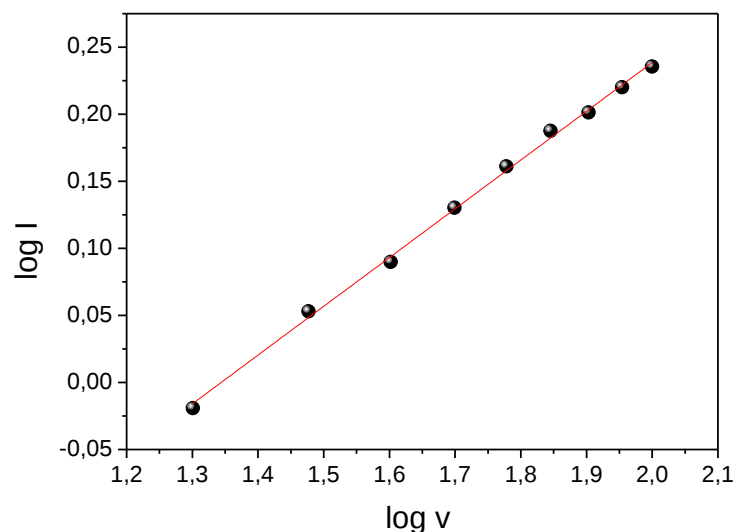
**Figura 35.** (A) Dependência  $I_{pc}$  com a velocidade de varredura,  $v$  (B) Dependência  $I_{pc}$  com a raiz quadrada da velocidade de varredura,  $v^{1/2}$  do Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP na presença de 0,3 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,29 mmol L<sup>-1</sup> de HQ em tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> no pH 6,5



Fonte: a autora

A relação entre a  $I_{pc}$  e a velocidade de varredura é descrita pela equação  $I_{pc} (\mu A) = -0,009 - 0,847 v (mV s^{-1})$ , com  $R = 0,967$ . Já para a raiz quadrada da velocidade:  $I_{pc} (\mu A) = -0,367 - 0,137 v (mV s^{-1})$ , com  $R = 0,995$ . Devido à linearidade apresentada pelos dois processos, não é tão evidente o tipo de transporte de massa apresentado por esse biossensor. Portanto para determinar o mecanismo, a relação entre o duplo recíproco da  $I_{pc}$  e a  $v$  foi aplicada, conforme Figura 36.

**Figura 36.** Dependência linear de  $\log I_{pc}$  vs  $\log v$  para o biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP.



Fonte: a autora

A relação do duplo logaritmo entre corrente de pico catódica ( $I_{pc}$ ) versus  $v$  foi adotada para compreender a natureza do processo (difusional ou adsorativo) de redução da HQ, com base nas seguintes equações simplificadas <sup>[119]</sup>:

- Para o processo controlado por difusão ( $I_{pc}$  vs  $v^{1/2}$ ):

$$\log(I_{pc}) = \text{constante} + \frac{1}{2}\log(v)$$

$$\text{coef. angular} = \frac{\partial \log(I_{pc})}{\partial \log(v)} = 0,5$$

- Para o processo controlado por adsorção ( $I_{pc}$  vs  $v$ ):

$$\log(I_{pc}) = \text{constante} + \log(v)$$

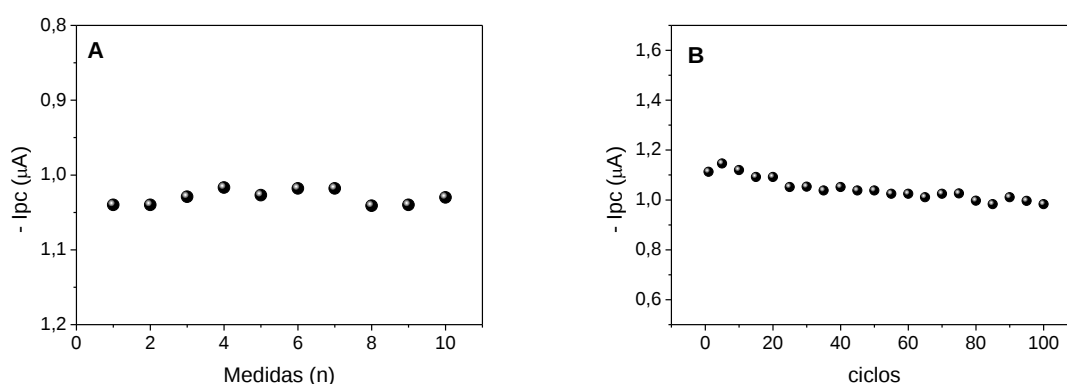
$$\text{coef. angular} = \frac{\partial \log(I_{pc})}{\partial \log(v)} = 1,0$$

Por meio da regressão linear de  $\log I_{pc}$  vs  $\log v$ , obteve-se um coeficiente de correlação,  $R = 0,997$  sendo a equação da reta  $y = -0,488 + 0,363x$ . Com este resultado obtido, *coef. angular* = 0,363, (resultado menor que 0,5) podemos afirmar que o processo de transporte de massa para a redução da hidroquinona é controlado por difusão das espécies até a superfície do eletrodo o que possibilita sua aplicação como <sup>[119]</sup>.

#### 4.2.8 Estudo da repetitividade e estabilidade da medida do biossensor

A repetitividade do biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP foi realizada a partir de uma série de 10 medidas ( $n=10$ ) em soluções diferentes (utilizando o mesmo eletrodo) contendo concentração de HQ 0,29 mmol L<sup>-1</sup> em meio de tampão PBS pela voltametria cíclica, onde o RSD foi de 0,99%, conforme Figura 37-A:

**Figura 37.** Voltamogramas cíclicos do Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP na presença de HQ 0,29 mmol L<sup>-1</sup> em tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 6,5, velocidade de varredura 50 mV s<sup>-1</sup>. (A) Repetitividade da medida (B) Estabilidade da medida.



Fonte: a autora

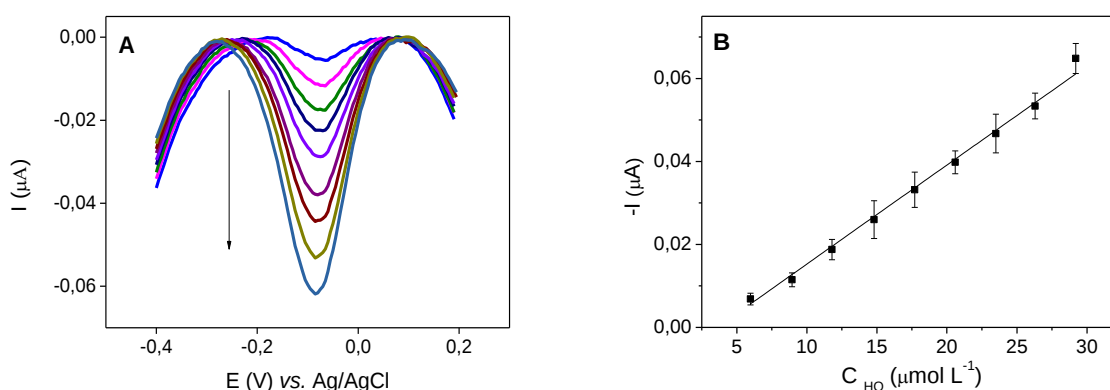
A estabilidade da medida do biossensor foi avaliada após 100 ciclos consecutivos pela voltametria cíclica na presença de HQ 0,29 mmol L<sup>-1</sup> em meio de tampão PBS. Observa-se na Figura 37-B um leve decaimento da corrente de pico catódica em torno de 14% onde o RSD foi

de 4,35%. Tais resultados indicam que este biossensor pode ser aplicado na detecção quantitativa de compostos fenólicos.

#### 4.2.9 Curva analítica obtida pela técnica de voltametria de pulso diferencial para o Biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP

Comprovada a eficiente imobilização da HRP sobre a monocamada mista, bem como estabilidade e repetitividade das medidas voltamétricas foram obtidas curvas analíticas para a hidroquinona. Para a determinação analítica da HQ utilizou a técnica de voltametria de pulso diferencial monitorando o sinal de corrente de pico de redução do eletrodo Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP em diferentes concentrações de hidroquinona no intervalo de 6,0 a 29,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  na presença de peróxido de hidrogênio. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 38:

**Figura 38.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos usando o Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 mmol L<sup>-1</sup> em diferentes concentrações de solução de hidroquinona na faixa de 6,0 a 29,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  utilizando os parâmetros otimizados:  $E_{\text{pulso}} = 0,05 \text{ V}$ , velocidade de varredura =  $0,05 \text{ V s}^{-1}$ , e tempo de pulso = 0,05 s. (B) Curva analítica da HQ.



Fonte: a autora

Nas condições otimizadas, a curva analítica obtida foi linear na faixa de concentração de 6,0 a 29,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de hidroquinona e a equação correspondente foi de  $-\Delta I = -0,00861 + 2387,53 [\text{HQ}]$ ; ( $r = 0,994$ ), onde  $-\Delta I$  é a corrente de pico resultante e  $[\text{HQ}]$  é a concentração da hidroquinona em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . O desvio padrão dos brancos foi estimado em  $\text{SB} = 0,001$ . Estes dados foram utilizados para calcular o limite de detecção<sup>[88]</sup> do biossensor, os quais foram  $\text{LD} = 1,26 \mu\text{mol L}^{-1}$  e o limite de quantificação<sup>[88]</sup>  $\text{LQ} = 4,23 \mu\text{mol L}^{-1}$ . O valor de LD apresentado

por este biossensor, foi comparado com outros sensores e biossensores descritos na literatura, como mostra a Tabela 6.

**Tabela 6.** Comparação com outros diferentes eletrodos modificados para determinação de HQ.

| <i>Eletrodo</i> | <i>Modificação</i>                                       | <i>Faixa linear</i><br>( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) | <i>LD</i><br>( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) | <i>Ref.</i>   |
|-----------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------|
| Silício         | Hexacianoferrato de cobre/platina                        | 10,0 – 100,0                                      | 2,20                                    | [120]         |
| Ouro            | Ácido 3-mercapto-1-propanosulfônico e LBL de Con A e HRP | 6,0 – 72,0                                        | 2,00                                    | [121]         |
| Ouro            | SAM <sub>mista</sub> -HRP                                | 6,0 – 29,0                                        | 1,26                                    | Este trabalho |
| Carbono vítreo  | nanocristais de CuS e quitosana                          | 4,5 – 450,0                                       | 1,50                                    | [116]         |
| Carbono vítreo  | Polivinilferroceno/polipirrol e HRP                      | 1,6 – 15,0                                        | 0,60                                    | [110]         |

Con A: *concanavalina A*.

Fonte: a autora

O tempo de vida útil do biossensor foi investigada mantendo em geladeira a 4 ° C em solução de PBS (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,5). O biossensor foi estável durante pelo menos 8 dias, sem mudança na resposta voltamétrica da redução da HQ, ocorreu decréscimo do sinal em 10% num período de 15 dias. Esta boa estabilidade possibilita a utilização deste dispositivo para determinação do analito HQ sem prejuízo a resposta eletroquímica.

## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi estudado o comportamento das monocamadas auto-organizadas sobre a superfície do eletrodo de ouro para a obtenção de biossensores. O desempenho do biossensor baseado na enzima HRP, imobilizada sobre a monocamada auto-organizada do tiol ácido tioláctico, mostrou-se eficiente para a determinação de peróxido de hidrogênio. A monocamada proporcionou um ambiente favorável para a imobilização da enzima. Este biossensor Au/TLA/HRP apresentou boa sensibilidade na faixa de concentração de 0,1 a 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, LD = 5,46 μmol L<sup>-1</sup>, LQ = 18 μmol L<sup>-1</sup>, repetitividade e estabilidade por um período de 6 dias. Como estratégia para aumentar a estabilidade deste biossensor utilizou a molécula de MUA juntamente com o TLA, para a formação das SAM<sub>mista</sub> (MUA:TLA). Na configuração da SAM<sub>mista</sub> a molécula de TLA possibilita o aumento da condutividade, enquanto o MUA apesar de bloquear parcialmente a superfície, ele confere a estabilidade à monocamada, para a imobilização da enzima HRP. A mudança nas concentração das moléculas, altera a velocidade de transferência eletrônica, pois quando varia a concentração de uma das moléculas observou-se que a superfície eletródica muda drasticamente seu perfil. O biossensor Au/MUA:TLA/HRP na proporção 0,5:1,0 mmol L<sup>-1</sup> apresentou a melhor sensibilidade em comparação as outras modificações. A SAM<sub>mista</sub> aumentou a estabilidade para 15 dias, sendo este mais robusto quando comparado ao biossensor somente com o TLA. Esses bons resultados obtidos com o biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP podem estar relacionado às interações mais eficientes entre as duas moléculas (MUA:TLA) com a enzima HRP, o que proporcionou ganho no tempo de uso do dispositivo proposto.

Adicionalmente este biossensor Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP foi aplicado na determinação da hidroquinona (HQ) na presença de uma quantidade fixa 0,3 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na solução. Pela técnica VPD o biossensor exibiu uma excelente atividade eletrocatalítica para HQ na faixa de 6,0 a 29,0 μmol L<sup>-1</sup>, com boa sensibilidade, LD = 1,26 μmol L<sup>-1</sup> e o LQ = 4,23 μmol L<sup>-1</sup>. Assim, uma nova plataforma nanoestruturada foi desenvolvida, tendo em vista os processos eletroquímicos em SAMs mistas e sistemas contendo materiais biológicos, conferindo um ambiente propício para imobilização de enzimas. Desta forma, tal sistema ser utilizado como plataforma para possíveis novos biossensores.

## **CAPÍTULO 2**

### **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO INCORPORADAS AO POLÍMERO INORGÂNICO CLORETO DE 3-N-PROPILPIRIDÍNIO SILSESQUIOXANO (Au-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>) PARA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS**

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Nanopartículas metálicas

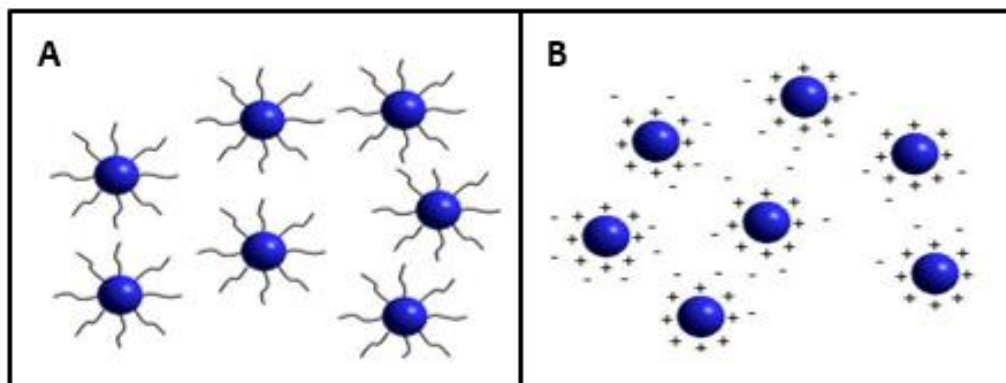
A aplicação de nanomateriais em vários campos da ciência e tecnologia tem sido extensivamente desenvolvida devido as propriedades únicas desses materiais <sup>[122]</sup>. As vantagens da utilização de materiais nanoestruturados vão além da possibilidade de miniaturização dos componentes, sendo a principal motivação para o desenvolvimento desses nanomateriais relacionada as alterações nas propriedades eletrônicas, óticas e mecânicas <sup>[123,124]</sup>.

As nanopartículas são um tipo de nanomaterial, no qual devido à diminuição de tamanho podem apresentar propriedades físico-químicas totalmente diferentes dos materiais em proporções maiores. Essas propriedades físico-químicas despertam interesse, devido à melhora na catálise, grande área superficial, boa biocompatibilidade, sendo utilizados na construção de sensores e biossensores eletroquímicos <sup>[125]</sup>. A utilização do nanomaterial para a fabricação desses dispositivos proporciona melhora nas respostas eletroquímicas para diversos compostos importantes quando comparadas ao eletrodo convencional. Por exemplo, nanopartículas metálicas, podem ser usadas para promover a transferência de elétrons entre as proteínas e os eletrodos <sup>[126]</sup>. Em particular, nanopartículas de ouro têm sido amplamente utilizadas como uma matriz imobilizadora para manter a atividade biológica de macromoléculas, como as proteínas, as enzimas e anticorpos <sup>[127, 128]</sup> e à promoção da transferência eletrônica direta das proteínas imobilizadas.

As propriedades físicas e químicas das nanopartículas estão diretamente relacionadas com suas composições, tamanhos e características estruturais de superfície e, portanto, a síntese, caracterização e aplicações de nanoestruturas são aspectos críticos do campo de nanomateriais <sup>[129]</sup>.

As nanopartículas são termodinamicamente instáveis, por apresentarem uma elevada área superficial <sup>[130]</sup>. Logo, as nanopartículas atraem-se mutuamente, favorecendo a formação de aglomerados de forma a tentar minimizar sua energia, diminuindo sua área superficial. Para que as nanopartículas se mantenham estáveis e dispersas em uma suspensão é essencial a presença de uma molécula estabilizante, que evite a aglomeração, seja por repulsão eletrostática ou por impedimento estérico. Desta forma, os dois mecanismos básicos de estabilização de dispersões coloidais estão esquematizados na Figura 39.

**Figura 39.** Mecanismos básicos de estabilização de dispersões coloidais: (A) impedimento estérico e (B) eletrostática.



Fonte: adaptado da fonte [www.olharnano.com](http://www.olharnano.com) <sup>[131]</sup>

Na Figura 39-A, as nanopartículas são estabilizadas estericamente, revestindo-as superficialmente com uma camada protetora de outro material (polímero, proteína ou dendrímero), conhecida como passivadora. Dessa forma, cria-se uma barreira mecânica que impede a aproximação. Uma classe utilizada para a estabilização de nanopartículas é o dendrímero PAMAM, a qual possui cavidades intramoleculares, que possibilita seu uso como nanoreator <sup>[132]</sup>. Outra classe utilizada, ainda relacionado a estabilização das nanopartículas (Nps) metálicas, vem sendo a dos tióis de cadeia longa, onde há a possibilidade de variar o grupo funcional terminal tornando a superfície do passivante hidrofóbica ou hidrofílica <sup>[133]</sup>.

Na estabilização eletrostática Fig. 39-B, utiliza-se um composto com carga que geralmente fica adsorvido sobre a superfície das nanopartículas, conferindo-lhes potencial eletrostático <sup>[134]</sup>. Um exemplo deste tipo de estabilização, foi mostrada no trabalho desenvolvido por Farren-Dai *et al* <sup>[135]</sup>, o qual utilizou o líquido iônico cloreto de benzildimetiltetradecilamônio para estabilizar nanopartículas de ouro (AuNps) via interações eletrostáticas.

Um efeito combinado é obtido por meio da utilização de polieletrólitos que estabilizam tanto por um mecanismo estérico quanto eletrostático <sup>[136]</sup>. Silva *et al* <sup>[137]</sup> utilizaram o polímero cloreto de 3-n-propil-4-picolina silsesquioxano para a síntese de nanopartículas de ouro. Segundo os autores, como o silsesquioxano apresenta capacidade de adsorver complexos metálicos aniônicos tais como os íons  $\text{AuCl}_4^-$ , este possibilita que as AuNps sejam obtidas de forma bem dispersa com um tamanho médio de partícula de 4,5 nm.

Várias estratégias sintéticas, adotando métodos físicos (bulk down) e métodos químicos (bottom up) tem sido reportados para a preparação de nanopartículas metálicas <sup>[138, 139, 140]</sup>. Um exemplo de método físico, foi descrito por Reed *et al* <sup>[141]</sup> para a síntese de nanopartículas de

ouro utilizando um banho ultrassônico. A taxa de redução do  $\text{HAuCl}_4$  em uma solução aquosa contendo apenas uma pequena quantidade de polietileno glicol foi controlada na presença de irradiação de ultrassom (200 kHz), permitindo que os tamanhos das nanopartículas formadas fossem controlados usando parâmetros tais como a temperatura da solução, a intensidade da irradiação de ultrassom, e o posicionamento do reator.

Dentre os métodos químicos, o mais comum e atrativo é pela redução química de sais de metais de transição na presença de agentes de estabilização. Esses estabilizantes podem ser polímeros <sup>[142]</sup>, surfactantes <sup>[143, 144]</sup>, tióis <sup>[145]</sup>, entre outros, os quais geram colóides metálicos de valência zero em meios aquosos ou orgânicos. O material é crescido com controle átomo a átomo, ou molécula a molécula, baseado na redução de sal metálico, onde este sal é reduzido pela adição de um agente redutor que conduz a nucleação dos íons metálicos às nanopartículas. Um agente passivante ou surfactante, tipicamente carregado, deve ser adicionado para se ligar à superfície das nanopartículas e garantir a estabilidade da solução coloidal através da repulsão entre as nanopartículas <sup>[146]</sup>. Como no trabalho descrito por Faria *et al* <sup>[147]</sup>, no qual a síntese de nanopartículas de prata foi estabilizada por um biossurfactante de baixo custo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* cultivadas em microemulsão água/óleo (2,5% de óleo vegetal e 2,5% de licor de infusão de milho e água destilada). As partículas foram inicialmente sintetizadas utilizando o  $\text{NaBH}_4$  como agente redutor nas micelas do biossurfactante e foram extraídas da solução micelar para dispersar em heptano.

Em outra rota, o ácido cítrico pode ser utilizado como agente redutor do sal metálico, acionando o processo de nucleação e se ligando à superfície as nanopartículas promovendo a estabilização do sistema coloidal através da repulsão das cargas negativas. Nesse caso o agente redutor também desempenha o papel passivante, como descrito no trabalho de Mikhlin *et al* <sup>[148]</sup> em que a redução do tetracloroaurato ocorre por íons citrato em solução aquosa produzindo as nanopartículas de ouro. Esse método baseado na redução e estabilização das nanopartículas pelo íon citrato foi desenvolvido por Turkevitch *et al* <sup>[149]</sup>, sendo considerado um dos principais métodos descritos na literatura para a síntese de nanopartículas de ouro.

No trabalho de Bonggotgetsakul *et al* <sup>[150]</sup>, o efeito do agente redutor foi avaliado no preparo de nanopartículas de ouro através de uma membrana polimérica de inclusão (PIM) consistindo de Aliquat 336, 1-dodecanol e PVC. O  $\text{AuCl}_4^-$  foi extraído da membrana através de troca iônica, o qual foi subsequentemente reduzido por ácido L-ascórbico, tri-citrato de sódio,  $\text{NaBH}_4$  ou EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) para formar AuNPs. Os estudos envolvendo estes quatro agentes redutores indicaram que o tamanho, a forma e localização das

AuNPs dentro da membrana dependiam do tipo de agente redutor. A descoberta mais significativa relatada pelos autores é que o EDTA, quando usado como o agente de redução, leva à formação de uma monocamada de AuNPs concentrada sobre a superfície da membrana, sem levar a formação de nanopartículas no interior da membrana. Possivelmente devido à natureza hidrofóbica do PIM e a consequente falta de quantidade de água, a qual deve ser suficiente para que ocorre a redução do íon metálico.

## 1.2 Aplicação de nanopartículas metálicas como sensores e biossensores

A fabricação de eletrodos modificados com nanopartículas metálicas tem sido o foco de atenção na eletroanálise devido a facilidade do transporte de massa, catálise, alta área superficial e também melhora a biocompatibilidade <sup>[151]</sup>. Na maioria dos trabalhos relatados nesta área utiliza metais como ouro, prata, platina. No entanto, o ferro, o níquel e o cobre também são analisados, assim como alguns exemplos de outros metais, tais como o irídio, rutênio, zircônia, cobalto, cromo e de paládio <sup>[152, 153, 154]</sup>.

Nanopartículas magnéticas são geralmente consideradas biologicamente e quimicamente inertes, sendo destaque na utilização de sensores/biossensores <sup>[155]</sup>. As investigações das MNPs tem atraído atenção devido às suas propriedades distintas, como efeito em pequena escala, de superfície e boas propriedades de biocompatibilidade <sup>[156]</sup>. Por exemplo, podemos destacar o estudo desenvolvido por Rawal *et al* <sup>[157]</sup>, que desenvolveram nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> recobertas por uma camada de Au, designadas como Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au, para a obtenção de um biossensor para sulfito. A vantagem desse sistema é a possibilidade do desenvolvimento de sistemas que possam combinar propriedades ópticas e magnéticas, e ainda o recobrimento das nanopartículas de ferro pelo AuNps que protege o mesmo contra a oxidação sem reduzir suas propriedades magnéticas, além de auxiliar a estabilização. O eletrodo proposto foi empregado para a medida dos teores de sulfito em vinhos tintos e brancos. O biossensor apresentou um bom desempenho analítico, um tempo de resposta curto (2s), baixo limite de detecção 0,15 µmol L<sup>-1</sup>, maior estabilidade de armazenamento (120 dias), maior faixa linear (0,5-1000 µmol L<sup>-1</sup>) e nenhuma interferência significativa de outras espécies quando comparado a outros biossensores.

Outro destaque na aplicação de dispositivos eletrônicos consiste na utilização de nanopartículas de metais nobres. As razões são as seguintes: as Nps de metais nobres tem boa performance elétrica e biocompatibilidade que resulta na aplicação potencial em bioeletrônica;

possuem propriedades catalíticas únicas, podendo catalisar uma ampla gama de reações orgânicas <sup>[158]</sup>. Um dos metais nobres, que tem sido destaque na literatura é o paládio <sup>[159]</sup>, o qual pode catalisar muitas reações químicas, assim Han *et al* <sup>[160]</sup> sintetizaram nanopartículas de paládio (PdNps) para utilizar na redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As PdNps não foram simplesmente usadas para ampliar a área de superfície e promover a transferência de elétrons, elas atuaram como substitutas da enzima HRP para a catálise do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, através da co-imobilização da glucose-oxidase (GOx) desenvolveu-se um biossensor sensível e seletivo da glicose.

Recentes avanços com as nanopartículas de metais nobres têm permitido o desenvolvimento de métodos de detecção altamente sensíveis e seletivos que são previstos para superar algumas limitações de procedimentos de detecção convencionais <sup>[161]</sup>. Neste contexto, as nanopartículas de prata (AgNps) tem sido consideradas promissoras para o desenvolvimento de biossensores, como no trabalho descrito por Evtugyn *et al* <sup>[162]</sup>. Neste trabalho, o biossensor de acetilcolinesterase (AChE) foi desenvolvido utilizando nanopartículas Ag estabilizadas com ligante macrocíclico tiacalix[4]areno o qual foi utilizado com sucesso para a detecção seletiva de pesticidas organofosforados e carbamatos. O eletrodo modificado com as AgNps apresentou a propriedade de eletrocatalisar a oxidação destas espécies, diminuindo o potencial de trabalho do biossensor de 350 para 50 mV.

Embora diversos tipos de nanopartículas tenham sido relatadas na construção de biossensores eletroquímicos, destaca-se o uso de nanopartículas de ouro devido a sua habilidade de promover uma estável imobilização de biomoléculas <sup>[163]</sup>, permitindo um melhor desempenho analítico em relação aos demais metais.

As nanopartículas de ouro, atualmente, são uma das mais utilizadas, por apresentarem alta estabilidade e também por não possuírem a tendência a formar óxidos como a grande maioria dos outros elementos metálicos. A importância da utilização das AuNps é destacada por uma ampla gama de aplicações em áreas como sistemas controlados de liberação de fármacos <sup>[164, 165]</sup>, dispositivos eletrônicos e ópticos <sup>[166]</sup>, diagnósticos médicos <sup>[128]</sup>, catálise <sup>[167]</sup>, sensores, e biossensores. Em particular, as propriedades físico-químicas das AuNps tornam estas atraentes e apropriadas para a modificação de eletrodos convencionais, tornando possível o desenvolvimento de novos materiais eletródicos. As propriedades ópticas, elétricas e eletroquímicas das AuNps podem ser utilizadas para intensificar o sinal detectado.

Segundo relatos de Caschera *et al* <sup>[168]</sup>, ao alterar as dimensões e/ou a forma das nanopartículas variando a concentração do HAuCl<sub>4</sub> e da polivinilpirrolidona, o comportamento da interface eletroquímica se altera. Portanto a fim de desenvolver sensores seletivos para

diferentes neurotransmissores, os autores alteraram a dimensão e a forma da AuNps modificadas sobre o eletrodo de carbono vítreo, o que tornou-se possível detectar cada molécula biológica (dopamina, ácido caféico, catecol, ácido úrico, epinefrina e serotonina).

As AuNps tem capacidade para promover um ambiente favorável a imobilização de biomoléculas garantindo estabilidade e mantendo suas atividades biológicas. Como no biossensor de tirosinase relatado por trabalho descrito Sanz *et al* <sup>[169]</sup>, baseado na imobilização da enzima sobre nanopartículas de ouro eletrodepositadas no eletrodo de carbono vítreo. A enzima imobilizada por ligação cruzada com glutaraldeído mantém uma alta bioatividade sobre este material de eletródico. Esta é apontada como uma das principais vantagens das AuNps para a preparação e aplicação em biossensores <sup>[170]</sup>. Venditti *et al* <sup>[171]</sup>, utilizaram uma metodologia simples e versátil para obter dois diferentes sistemas bioconjugados desenvolvidos a partir da imobilização da lipase de *Cândida rugosa* sobre nanopartículas de ouro funcionalizadas com cloridrato de 2-dietilaminoetanotiol e também com 3-mercaptopropil-sulfonato de sódio. Segundo os autores uma significativa quantidade de enzima fica imobilizada sobre as AuNps, aumentando sua atividade, além de conferir estabilidade na faixa de pH de 5,0 a 8,0 e no intervalo de temperatura de 20 a 60°C. Estes requisitos proporcionam perspectivas para utilizações industriais destes sistemas biocatalíticas.

Com o avanço da nanotecnologia, as SAMs foram utilizadas no desenvolvimento de eletrodos modificados com nanomateriais. Esta junção possibilita estender as características de monocamada tanto na forma bidimensional plana como para superfícies tridimensionais <sup>[172]</sup>. A mais importante aplicação da SAM neste campo é na síntese de nanopartículas metálicas, na qual as SAMs são utilizadas para estabilizar as nanopartículas. Um exemplo da modificação de AuNps estabilizadas pela SAM e imobilização enzimática é descrita por Chico *et al* <sup>[173]</sup>. Neste trabalho, a enzima HRP foi imobilizada sobre as AuNps estabilizadas com a SAM cisteamina, as quais foram incorporadas no eletrodo de ouro sobre alginato de sódio por interações eletrostáticas. O eletrodo foi utilizado para a construção de um biossensor amperométrico para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este apresentou resposta linear (-400 mV vs Ag/AgCl) entre 20 µmolL<sup>-1</sup> e 13,7 mmol L<sup>-1</sup> em pH 7,0. O biossensor atingiu 95% do estado estacionário em cerca de 15 s, e sua sensibilidade foi de 40,1 mA/mol L<sup>-1</sup>cm<sup>-2</sup>. O limite de detecção do eletrodo enzimático foi determinado como 3 µmol L<sup>-1</sup>.

Outra aplicação da SAM é conectar nanopartículas com substratos, na qual a SAM atua como molécula de ligação entre o substrato eletródico e as nanopartículas metálicas. Como um exemplo desta aplicação, podemos relatar o trabalho de Rajesh *et al* <sup>[174]</sup>, no qual as AuNps

foram imobilizadas sobre o eletrodo de ITO pela monocamada de 3-aminopropiltietoxissilano. Após a imobilização das AuNps, um SAM mista de MUA e ácido 3-mercaptopropiônico foi formada sobre as mesmas para imobilização da proteína mioglobulina.

Zhang *et al* imobilizaram biomoléculas sobre uma SAM formada tridimensionalmente sobre NPs <sup>[175]</sup>. Neste estudo, a imobilização da glicose oxidase (GOx) foi através da SAM de cistamina formada sobre nanopartículas de ouro estabilizadas na rede tridimensional de sílica em um eletrodo de ouro. As monocamadas de cistamina têm sido amplamente utilizadas para a ligação covalente da enzima glicose oxidase. A reação entre o grupo aldeído da enzima e o grupo amina da SAM prossegue facilmente em condições moderadas sem contaminação significativa e desativação da enzima. A enzima imobilizada na superfície do eletrodo exibiu excelentes atividades catalíticas para a oxidação de glicose quando o mediador de elétrons ferroceno metanol estava presente. Este sensor apresentou uma resposta amperométrica rápida (3 s) para a oxidação eletrocatalítica de glicose, e a corrente catalítica foi proporcional à concentração de glicose até 6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com uma elevada sensibilidade de 8,3  $\mu\text{A}/\text{mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ . O limite de detecção do sensor foi estimado em 23  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Além disso, o sensor apresentou boa reprodutibilidade, e permaneceu estável durante 60 dias.

## 2 OBJETIVO GERAL

Investigar as potencialidades do cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano ( $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ ) como agente estabilizante na síntese das nanopartículas metálicas de ouro. Após a dispersão coloidal formada, pretende-se fabricar um sensor utilizando a técnica de monocamadas auto-organizadas (SAM). Estes eletrodos serão aplicados no desenvolvimento de biossensores a partir da imobilização de enzimas (*horseradish peroxidase* - HRP), os quais serão utilizados em metodologias analíticas simples e de baixo custo, com o propósito de determinar o composto fenólico (catecol), utilizando técnicas voltamétricas e amperométricas.

### 2.1 Objetivos específicos.

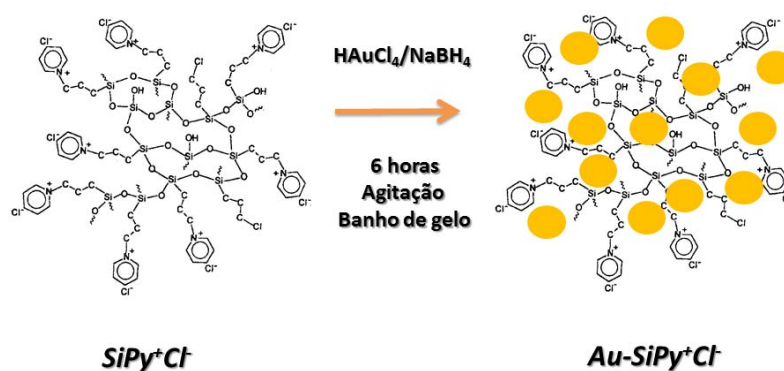
- ✓ Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro incorporadas a matriz de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ : Otimização das condições de síntese.
- ✓ Os filmes de  $\text{Au-SiPy}^+\text{Cl}^-$  formados serão explorados na obtenção de filmes SAM sobre o eletrodo de carbono vítreo (ECV). A formação de SAM de ácido tioláctico será realizada sobre  $\text{AuNps-SiPy}^+\text{Cl}^-$  para posterior obtenção de biossensores.
- ✓ Avaliar o comportamento dos biossensores  $\text{ECV/AuNps-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{TLA/HRP}$  para a determinação do peróxido de hidrogênio.
- ✓ Estudar o comportamento do eletrodo  $\text{ECV/AuNps-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{TLA/HRP}$  na determinação do composto fenólico – catecol por técnicas voltamétricas de análise tais como a voltametria cíclica e de pulso diferencial

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Síntese das nanopartículas

Na síntese de nanopartículas, o cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano ( $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ ) foi utilizado como agente estabilizador para a formação de AuNps obtidas pela redução dos íons  $\text{Au}^{3+}$  a partir do cloreto de ouro (III) trihidratado  $\text{HAuCl}_4$ , com borohidreto de sódio -  $\text{NaBH}_4$ , conforme Figura 40. As concentrações de  $\text{HAuCl}_4$  utilizadas foram de 0,1 a 5  $\text{mmol L}^{-1}$ , mantendo-se fixas as concentrações de  $\text{NaBH}_4$  10  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  3  $\text{g L}^{-1}$ . Para a formação das AuNps, primeiramente misturou 10 mL de solução  $\text{HAuCl}_4$  e 10 mL de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  em um recipiente com agitação magnética sob banho de gelo. Após gotejou-se lentamente 10 mL de  $\text{NaBH}_4$  sobre esta mistura com o auxílio de uma pipeta. A mistura final foi deixada durante 6 horas em agitação magnética sob banho de gelo para a formação da dispersão coloidal.

**Figura 40.** Representação esquemática da estabilização das AuNps no polímero  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ .



Fonte: a autora

#### 3.2 Caracterização pela Espectroscopia de UV-Vis

Os espectros de UV-Vis foram obtidos em solução aquosa utilizando-se cubetas de quartzo de caminho óptico medindo 1 cm. O equipamento utilizado para obtenção dos espectros foi um espectrofotômetro Varian – Cary 50. As medidas foram realizadas de 300 a 700 nm de comprimento de onda no modo absorbância.

### 3.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O espalhamento dinâmico a luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*) foi utilizado para medir o tamanho médio das nanopartículas sintetizadas. A análise foi realizada em equipamento da marca Malvern Instruments, Zetasizer Nano Serie, modelo Nano-ZS90, empregando-se uma cubeta de plástico e diluindo-se as dispersões de AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> em meio aquoso na proporção 1:50 V/V.

### 3.4 Potencial Zeta

A medida do potencial zeta foi utilizada para medir a carga superficial das nanopartículas, através da velocidade da partícula sob um campo elétrico. As medidas foram realizadas em célula capilar com diluição das dispersões de AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> em meio aquoso na proporção 1:50 V/V, utilizando-se o aparelho Malvern Instruments, Zetasizer Nano Serie, modelo Nano-ZS90.

### 3.5 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Para verificar o tamanho e a distribuição das nanopartículas foi realizada análise de TEM. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão, JEOL JEM 1200EX II, operando numa tensão de 120 kV. Para a análise a amostra de AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> foi depositada em tela de cobre recoberta com filme de carbono. A análise foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

### 3.6 Espectroscopia na região do Infravermelho

A espectroscopia de FTIR foi utilizada para o estudo da interação química entre as nanopartículas de ouro e o estabilizante SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>. Utilizou o equipamento FT-IR Spectrometer Frontier - Perkin Elmer, na região entre 500 a 4000 cm<sup>-1</sup>, sendo acumuladas 64 varreduras. Realizou-se a análise do AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> e SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> em pastilhas de KBr.

### 3.7 Microscopia Eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV/FEG)

A caracterização morfológica da formação do biossensor foi acompanhada a cada etapa de modificação, utilizando um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo FEG-SEM, modelo MIRA 3 LMH.

### 3.8 Preparo e caracterização do eletrodo ECV/AuNps/TLA/HRP

Primeiramente, a superfície do eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi pré-tratada em lixa 4000 $\mu$  e 2000 $\mu$ . Após realizou-se o polimento do eletrodo em alumina 0,5  $\mu$ m, seguida de lavagem e sonificação em água destilada e etanol por 5 min. Uma alíquota de 3  $\mu$ L da dispersão AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> foi então gotejada sobre a superfície do ECV. Em seguida, após a secagem da superfície em estufa (55 a 60°C), mergulhou-se o eletrodo ECV/AuNps na solução contendo o TLA 10 mmol L<sup>-1</sup> por um período de 180 minutos. Na etapa de imobilização da enzima HRP sobre o eletrodo ECV/AuNps/TLA seguiu-se as condições pré-estabelecidas, conforme discutido no Capítulo 1 desta tese.

As medidas de voltametria cíclica para caracterização das AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> sobre o ECV foi realizada na faixa de potencial entre 0,2 a 1,6 V a 50 mV s<sup>-1</sup> em solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi utilizada para a observação do comportamento eletroquímico das diferentes configurações de eletrodos (ECV, ECV/AuNps, ECV/AuNps/TLA e ECV/AuNps/TLA/HRP) na presença da molécula sonda de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>-4</sup>/Fe(CN)<sub>6</sub><sup>-3</sup> 0,5 mol L<sup>-1</sup> em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> e em solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,5. Na EIE foi aplicado ao eletrodo de trabalho uma onda senoidal com amplitude de 10 mV utilizando potencial de circuito aberto na faixa de frequência de 10 KHz a 100 mHz.

### 3.9 Estudo da potencialidade do eletrodo ECV/AuNps/TLA/HRP como sensor eletroquímico

Para os estudos do comportamento eletroquímico dos eletrodos obtidos ECV, ECV/AuNps, ECV/AuNps/TLA e ECV/AuNps/TLA/HRP foram registrados voltamogramas cíclicos na faixa de -0,6 a 0,6 V em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,5 contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,2 mmol L<sup>-1</sup> a 50 mV s<sup>-1</sup>. Também foi utilizada a técnica de voltametria de pulso diferencial para os diferentes sensores em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>,  $v = 25$  mV s<sup>-1</sup> na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 mmol L<sup>-1</sup>. Antes de todas as medidas foi necessário desaerar o eletrólito, durante 10 min

em fluxo de nitrogênio para retirar o  $O_2$  dissolvido na solução. Para a aplicação do biossensor para detecção do catecol (CT) utilizou-se as técnicas de voltametria cíclica e pulso diferencial. Nas medidas para detecção do catecol avaliou o efeito da concentração de  $H_2O_2$  na faixa de 10 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Após analisou o comportamento do biossensor para CT na faixa de concentração de entre 6,0 a 46,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

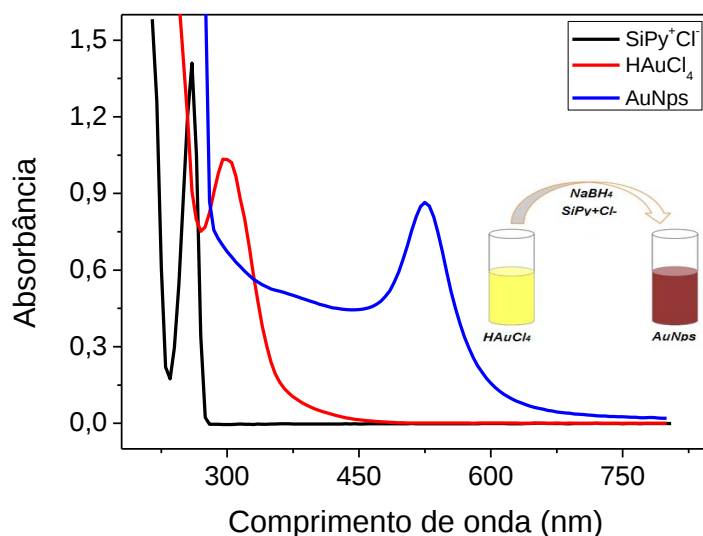
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Síntese e caracterização das Nanopartículas de Ouro

Neste trabalho, as nanopartículas de ouro foram produzidas pelo método de redução do cloreto de ouro (III) trihidratado ( $\text{HAuCl}_4$ ) pelo borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ). O  $\text{NaBH}_4$  é um forte agente redutor e a sua adição em excesso auxilia na estabilização da dispersão das nanopartículas <sup>[176]</sup>. Mesmo assim, as AuNps são instáveis após a redução e podem formar aglomerados. Portanto, foi utilizado um agente estabilizante, o polímero inorgânico/orgânico cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano ( $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ ) para manter as AuNps afastadas e assim conservar suas propriedades. Segundo a literatura, este funciona como um suporte para a formação das nanopartículas de ouro <sup>[177]</sup> e também de platina <sup>[178]</sup>. No trabalho de Santos *et al* <sup>[178]</sup> é descrito a síntese de nanopartículas de platina (PtNPs) obtidas via redução química dos íons Pt (IV) a partir ácido cloroplatínico ( $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ ) utilizando ácido fórmico como agente redutor, obtendo nanopartículas de 3 a 40 nm.

Ao final da síntese, as dispersões obtidas apresentaram uma coloração avermelhada indicando a provável formação da AuNps- $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ . Foram obtidos os espectros de absorção relativos às soluções dos precursores de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e solução  $\text{HAuCl}_4$ , bem como do complexo AuNps- $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  formado, conforme Figura 41.

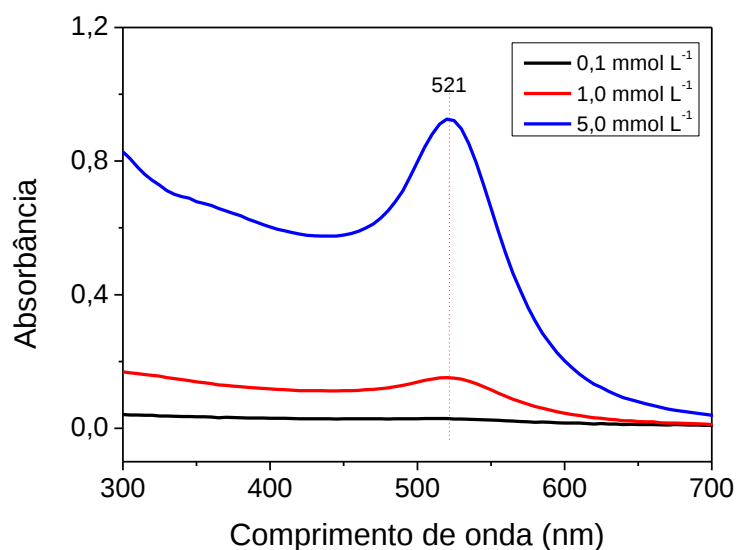
**Figura 41.** Espectros eletrônicos de UV-Vis da solução de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ ,  $\text{HAuCl}_4$  e dispersão coloidal de AuNps- $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$



O espectro de absorção do silsesquioxano  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  apresenta uma banda em 298 nm referente as transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos grupos piridínicos. A redução dos íons  $\text{Au}^{3+}$  a partir do complexo metálico  $\text{AuCl}_4^-$  pode ser acompanhada pelo decréscimo da banda em 300 nm referente à absorção da banda de transferência de carga metal-ligante e o aparecimento de uma banda bem definida em 521 nm característica de nanopartículas de ouro. A forte banda de absorção em 521 nm é atribuída às bandas plásmons de superfície <sup>[179]</sup>, que são oscilações de elétrons livres no metal que se unem com o campo eletromagnético. Segundo relatos na literatura <sup>[179]</sup>, as nanopartículas de ouro com dimensões entre 2 e 10 nm, apresentam intensa coloração vermelha, devido a transições entre as bandas eletrônicas que acomodam os elétrons superficiais (bandas de plásmons superficiais). No entanto, em tamanhos maiores as nanopartículas passam a exibir uma violeta, fato relacionado ao aumento na densidade de estados eletrônicos e consequente diminuição da energia de transição entre as bandas. As nanopartículas de ouro que apresentam máximos de absorção em 517, 520, 521, 533 e 575 nm, apresentam diâmetro médio iguais a 9, 15, 22, 48 e 99 nm, respectivamente, em meio aquoso <sup>[179]</sup>. De acordo com estes resultados, as  $\text{AuNps-SiPy}^+\text{Cl}^-$  preparadas podem apresentar diâmetro médio de aproximadamente 20 nm.

Como alternativa para melhorar as propriedades físicas e químicas da dispersão coloidal  $\text{AuNPs-SiPy}^+\text{Cl}^-$  avaliou-se o efeito da concentração do  $\text{HAuCl}_4$  na formação das nanopartículas. Estudos preliminares demonstraram que as melhores condições para formação de nanopartículas de ouro estáveis, com boa reprodutibilidade e com pequeno diâmetro são obtidas quando se utilizam  $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$  do redutor e  $3,0 \text{ g L}^{-1}$  do  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ . Para isso, fixou-se a concentração do redutor e estabilizante e variou-se a concentração do  $\text{HAuCl}_4$  entre 0,1 a  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , no intuito de obter uma suspensão estável e com boa uniformidade de tamanho. Medidas de UV-Vis foram obtidas de forma a avaliar a obtenção destas dispersões coloidais conforme Figura 42.

**Figura 42.** Espectros eletrônicos de UV-Vis das dispersões coloidais de AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> em diferentes concentrações do H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> entre 0,1 a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>

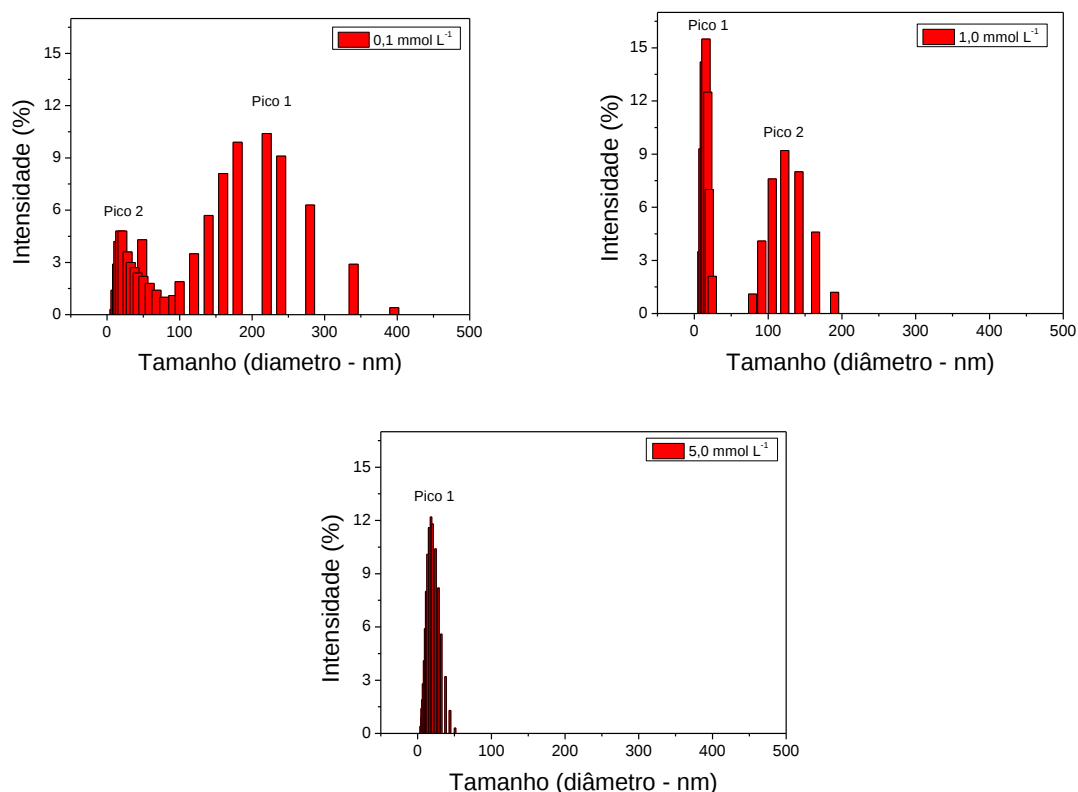


Fonte: a autora

Conforme Fig. 42, fica evidente que o aumento da concentração de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> favorece a formação das AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> sendo acompanhadas pelo aumento de absorbância da banda plásmon em 521 nm. O acompanhamento dessas sínteses foi realizado utilizando-se as técnicas de Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta.

Em geral, o DLS é aplicado na caracterização de partículas, emulsões e moléculas que foram dispersas ou dissolvidas em um líquido. O movimento browniano das partículas ou moléculas em suspensão faz com que a luz laser seja espalhada com intensidades diferentes. A análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do movimento browniano e assim, o tamanho de partícula<sup>[180]</sup>. A Figura 44 ilustra as distribuições de tamanho de partículas para as sínteses realizadas utilizando-se diferentes concentrações de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>.

**Figura 43.** DLS das dispersões coloidais de AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> em diferentes concentrações



Fonte: a autora

Conforme a Figura 43, pode-se concluir que o aumento da concentração do precursor HAuCl<sub>4</sub> favorece a homogeneidade na distribuição do tamanho das nanopartículas. O tamanho médio das nanopartículas e a intensidade dos picos estão informados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Tamanho e intensidade dos picos das diferentes sínteses AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>

| HAuCl <sub>4</sub>       |        | Tamanho (nm) | % Intensidade |
|--------------------------|--------|--------------|---------------|
| 0,1 mmol L <sup>-1</sup> | Pico 1 | 206,4        | 59,6          |
|                          | Pico 2 | 29,92        | 8,22          |
| 1,0 mmol L <sup>-1</sup> | Pico 1 | 15,68        | 64,2          |
|                          | Pico 2 | 125,84       | 35,8          |
| 5,0 mmol L <sup>-1</sup> | Pico 1 | 18,86        | 100           |

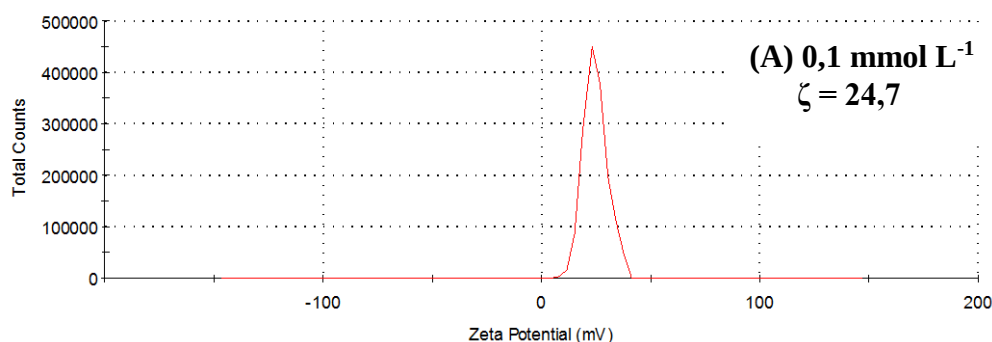
Ao analisar os resultados obtidos (Tabela 7), percebe-se que quando se prepara o híbrido com concentração de 0,1 e 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de HAuCl<sub>4</sub> ocorre o aparecimento de dois picos, os quais podem ser atribuídos a formação de agregados. No entanto quando a concentração de

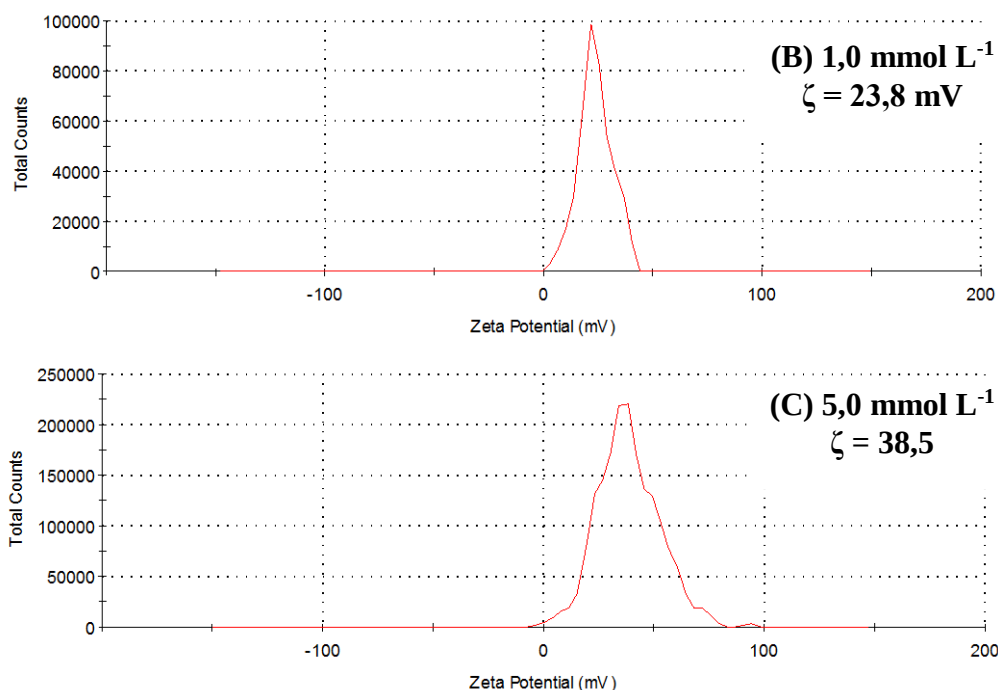
H<sub>2</sub>HAuCl<sub>4</sub> aumenta para 5,0 mmol L<sup>-1</sup>, as nanopartículas de ouro ficam bem mais distribuídas havendo apenas a formação de um pico. Em relação ao tamanho das partículas, pode-se estimar que em média a maioria das AuNps apresenta diâmetro entre 2 a 30 nm, tendo o máximo de intensidade em aproximadamente 18 nm. Na literatura, as AuNps utilizando silsesquioxanos são relatadas com tamanhos próximos aos obtidos neste estudo, com tamanho médio de 4,5 nm estabilizadas no cloreto de 3-n-propil-4-picolina silsesquioxano <sup>[137]</sup> e 5,5 nm estabilizadas no cloreto de 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano <sup>[181]</sup>. Essas também apresentam tamanhos próximos com os relatados utilizando diferentes estabilizantes: 44 nm estabilizadas com eugenol (2-metoxi-4-alilfenol) <sup>[182]</sup> e 25 nm estabilizadas com 4-aminotiofenol <sup>[183]</sup>.

A análise da estabilidade das nanopartículas foi realizada pelo Potencial zeta. A maioria dos materiais quando em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica superficial. O potencial zeta ( $\zeta$ ) pode ser considerado o potencial eletrostático gerado pela acumulação de íons na superfície de um material. É aplicado para determinação de carga de superfície de partículas <sup>[184]</sup>, como nanopartículas metálicas, enzimas e lipossomos.

Esse potencial reflete a carga efetiva nas partículas, que se correlacionam com a repulsão eletrostática entre elas, e com a estabilidade da suspensão. Quanto maior o potencial zeta, mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem, e superam a tendência natural à agregação. O valor ideal deve ser maior ou igual a +30 mV ou maior ou igual a -30 mV <sup>[180, 183]</sup>. Dessa forma, pode-se estimar a estabilidade de suspensões AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>, avaliando o potencial zeta das três sínteses, conforme Figura 44.

**Figura 44.** Potencial Zeta das dispersões coloidais AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> na concentração (A) 0,1 mmol L<sup>-1</sup> – (B) 1,0 mmol L<sup>-1</sup> - (C) 5,0 mmol L<sup>-1</sup>



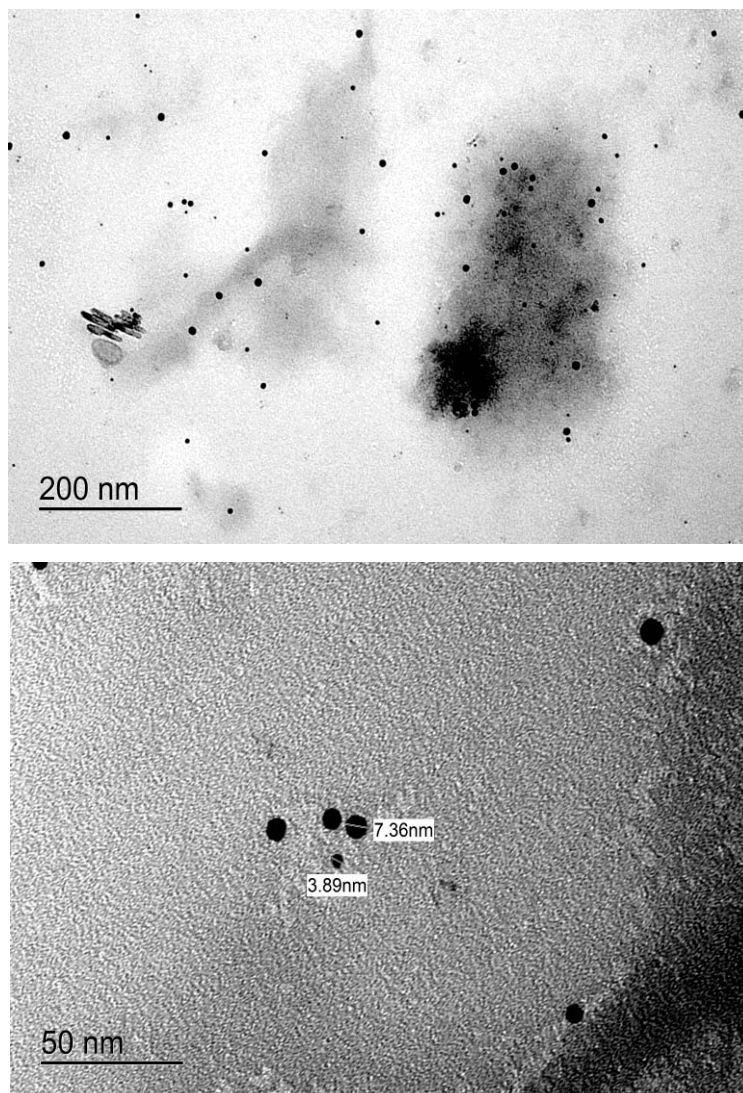


Fonte: a autora

O valor positivo do potencial zeta indica a existência de estruturas com cargas positivas na estrutura híbridas de AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>, fato esperado devido a estrutura do agente estabilizador possuir íons piridínio. Pelos resultados (Figura 44) é possível constatar a eficiência do SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> como agente estabilizante, para a formação das AuNps. O potencial zeta medido na dispersão com concentração de Au 0,1 mmol L<sup>-1</sup> foi de + 24,7 mV, e na concentração de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> foi de + 23,8 mV, enquanto que para a dispersão de 5,0 mmol L<sup>-1</sup>, o valor foi de + 38,5 mV, respectivamente. Este aumento nos valores de potencial zeta com o aumento da concentração do precursor metálico é um indicativo de que houve um aumento na quantidade de AuNps estabilizadas pelo silsesquioxano SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>. Como mencionado, esse valor reflete a repulsão eletrostática entre partículas, e que o valor padrão do potencial zeta +/- 30 mV é associado a soluções estáveis <sup>[183]</sup>. Dessa forma, pode-se afirmar que a dispersão coloidal AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> obtida com a concentração do precursor HAuCl<sub>4</sub> 5,0 mmol L<sup>-1</sup> é mais estável em relação às demais sínteses realizadas.

Outra confirmação do tamanho das AuNps foi obtida pela microscopia eletrônica de transmissão (MET) para a dispersão coloidal de 5,0 mmol L<sup>-1</sup>, conforme Figura 45.

**Figura 45.** Micrografias obtidas por MET da dispersão coloidal AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> de 5,0 mmol L<sup>-1</sup>, com diferentes magnificações.

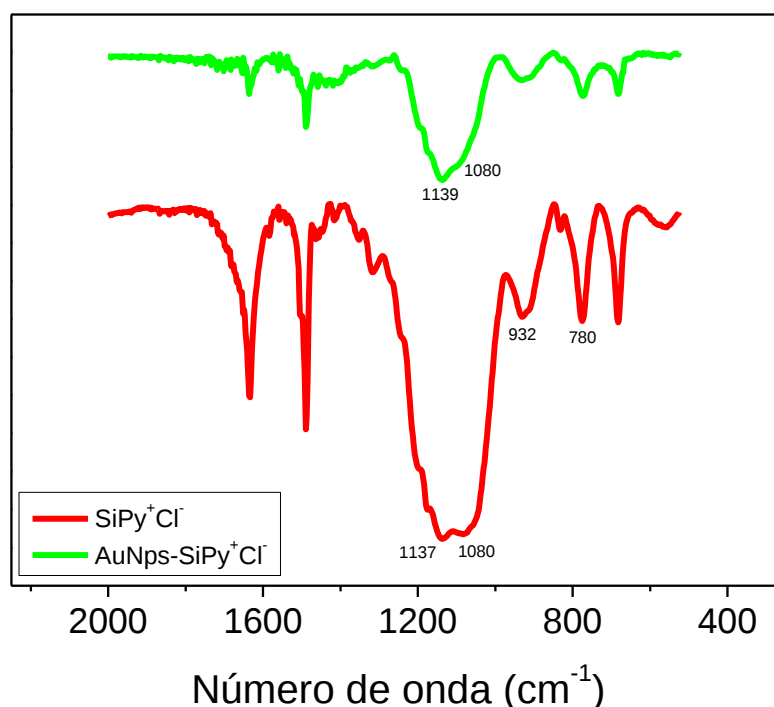


Fonte: a autora

Conforme Fig. 45-A as imagens de MET do nanohíbrido AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> obtidos a partir de HAuCl<sub>4</sub> 5,0 mmol L<sup>-1</sup>, indicam boa distribuição das AuNps estabilizadas no polímero SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> apresentando-se bem dispersas por toda a superfície analisada. Na Fig.45-B pode ser observado que as AuNps apresentaram tamanhos que variam entre 4 e 10 nm. Os resultados obtidos confirmam que o polímero SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> atua como agentes de estabilização, sendo importante não só para evitar a agregação, mas também para a forma e controle de tamanho das partículas. Resultados semelhantes de dispersão coloidal de AuNps foram obtidos no trabalho de Nunes *et al* <sup>[185]</sup>, no qual utilizou como agente estabilizante o silsesquioxano catiônico, cloreto de 1,4-diazoniabicyclo [2.2.2] octano (DABCO), para controle de tamanho e estabilização das nanopartículas com diâmetro inferior a 15 nm em meio aquoso.

A interação entre o polímero  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e o nanohíbrido  $\text{AuNps-SiPy}^+\text{Cl}^-$  foi investigada a partir de medidas de espectroscopia de absorção na região do Infravermelho, cujos espectros são mostrados na Figura 46.

**Figura 46.** Espectros de FTIR para o polímero  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e o nanohíbrido  $\text{AuNps-SiPy}^+\text{Cl}^-$  obtidos em pastilhas de KBr.



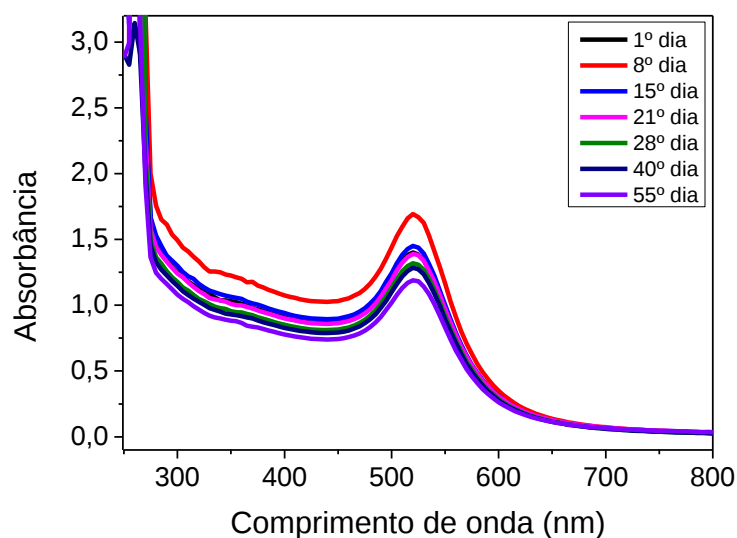
Fonte: a autora

O espectro na região do infravermelho do polímero silsesquioxano  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  apresentou no intervalo de 1000 a 1270  $\text{cm}^{-1}$ , duas bandas de absorção Si-O-Si, atribuídas à sobreposição das bandas relacionadas ao modo com o estiramento simétrico (1080  $\text{cm}^{-1}$ ) e estiramento assimétrico (1137  $\text{cm}^{-1}$ ) do esqueleto Si-O-Si <sup>[186]</sup>. Essas duas bandas são características de dois tipos de estrutura do Si-O-Si, sendo a primeira em 1080  $\text{cm}^{-1}$  atribuída à vibração da estrutura de rede e a segunda em 1137  $\text{cm}^{-1}$  conferida a estrutura de gaiola <sup>[178]</sup>. Outra região do espectro entre 700 a 950  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída aos diferentes modos de vibrações relativos à deformação angular do grupo Si-C-H (932  $\text{cm}^{-1}$ ) e da banda atribuída ao estiramento da ligação Si-C (780  $\text{cm}^{-1}$ ) <sup>[187]</sup>. O espectro ainda apresenta as bandas características do anel piridínio em 1634 e 1492  $\text{cm}^{-1}$ , cujos valores são similares aos apresentados na literatura <sup>[186]</sup>.

A incorporação das AuNps no  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  induz uma diminuição na intensidade de absorção característica na região entre 800 e 990  $\text{cm}^{-1}$  e da banda do estiramento simétrico Si-O-Si da vibração de rede (1080  $\text{cm}^{-1}$ ). Também foi observada uma diminuição na intensidade e leve deslocamento da banda (1137 para 1139  $\text{cm}^{-1}$ ) do estiramento assimétrico do Si-O-Si da estrutura de gaiola. Estas alterações indicam que a estabilização das AuNps- $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  provoca um impedimento nos modos vibracionais da estrutura do polímero, diminuindo os graus de liberdade e assim ocasionando um decréscimo nas deformações ou estiramentos <sup>[178]</sup>.

A estabilidade da dispersão coloidal foi acompanhada pela espectroscopia molecular na região do UV-vis monitorando a banda plasmônica (Figura 47). Quando as nanopartículas sofrem agregação com alteração do seu tamanho essa variação pode ser visualizada por meio da alteração da coloração da dispersão e consequente deslocamento da banda plásmon. As dispersões coloidais AuNps- $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  preparadas foram armazenados sobre refrigeração em frascos protegidos da luz.

**Figura 47.** Espectros de absorção na região do UV-vis da dispersão coloidal AuNps- $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  obtidos em diferentes dias.



Fonte: a autora

Os valores do máximo de absorbância da dispersão coloidal AuNps- $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  obtidos nos diferentes dias estão mostrados na Tabela 8.

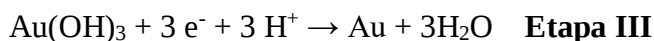
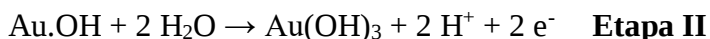
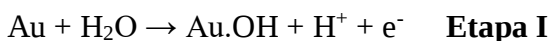
**Tabela 8.** Acompanhamento da estabilidade da dispersão coloidal.

| <i>Dia</i> | <i>Comprimento de onda (nm)</i><br><i>máxima absorção</i> | <i>Absorbância (u.a.)</i> |
|------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------|
| 1          | 520                                                       | 0,76                      |
| 8          | 520                                                       | 0,86                      |
| 15         | 520                                                       | 0,87                      |
| 21         | 520                                                       | 0,84                      |
| 28         | 520                                                       | 0,75                      |
| 40         | 520                                                       | 0,73                      |
| 55         | 520,7                                                     | 0,69                      |

Fonte: a autora

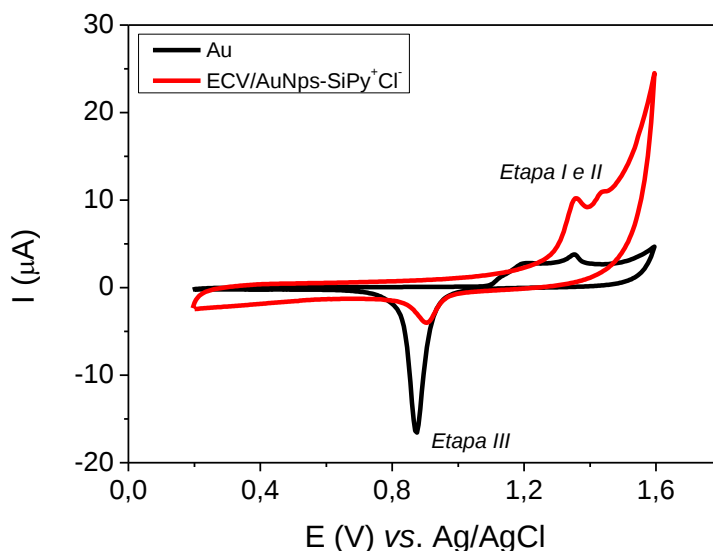
Na dispersão coloidal não houve a formação de precipitado e nem deslocamento da banda plasmon, conforme Figura 47, durante dois meses. Este resultado obtido pela espectroscopia de UV-Vis pelo acompanhamento da banda plásmon durante o período de armazenamento das AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> corrobora com o resultado de potencial zeta que indicou estabilidade da dispersão.

A voltametria cíclica foi utilizada para caracterizar as AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> imobilizadas na superfície do eletrodo de carbono vítreo, ECV/AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>. No caso do ouro, o processo de eletro-oxidação em meio ácido <sup>[188]</sup>, e o mecanismo de reação é descrito pelas equações <sup>[189]</sup>:



Onde as etapas (I) e (II) referem-se aos processos de oxidação e a etapa (III) ao processo de redução. O produto formado Au(OH)<sub>3</sub>, pode ser representado também na forma Au<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O, correspondendo, portanto, ao óxido de ouro hidratado <sup>[190]</sup>. Na varredura anódica o eletrodo não apresentou corrente faradaica até atingir aproximadamente o potencial 1,1 V, mostrando apenas a região de dupla camada elétrica, segundo Figura 48. A partir deste potencial encontra-se a região de formação dos óxidos de ouro originado da camada de hidratação, na qual se observa a formação de mais de um pico de oxidação, referente aos diferentes óxidos de ouro. Na varredura catódica, o óxido de ouro é reduzido na faixa de potencial de 0,98 V a 0,79 V (em aproximadamente 0,90 V) e, posteriormente, segue a região de dupla camada elétrica até o final da varredura.

**Figura 48.** Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo Au e o ECV-AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> em solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Velocidade de varredura: 50 mVs<sup>-1</sup>



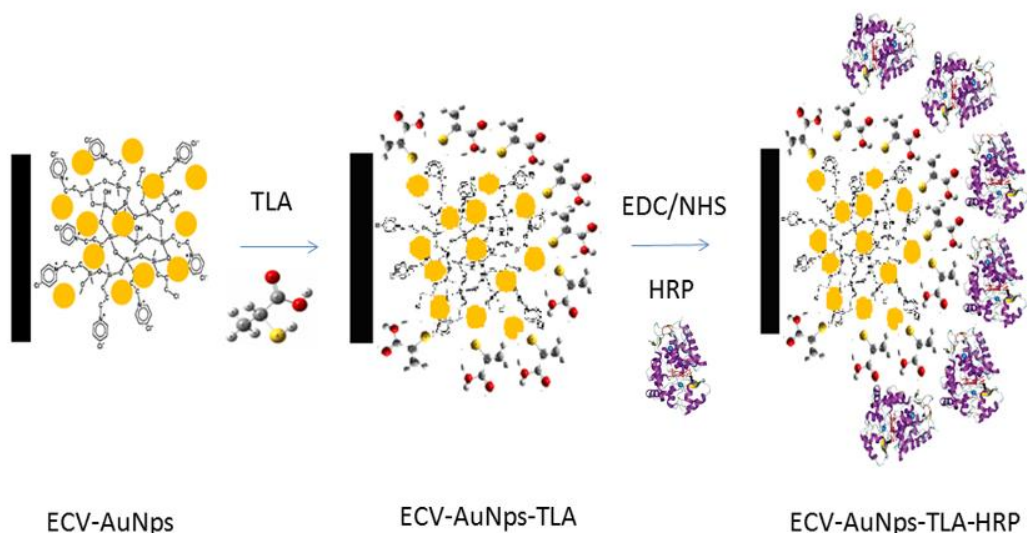
Fonte: a autora

Pode-se observar na Figura 48, que o eletrodo ECV/AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> demonstrou perfil característico da reação de redox do ouro em meio ácido, com picos de oxidação (em 1,43 V) e redução do óxido de ouro (em 0,90 V), o que comprova a presença das AuNps estabilizadas no polímero SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>. O filme obtido de AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> sobre o ECV apresentou boa estabilidade, mantendo seu perfil redox característico, mesmo após várias medidas eletroquímicas e também longo tempo de armazenamento (aproximadamente 30 dias).

#### 4.2 Preparação e caracterização do Biossensor enzimático

A molécula de TLA foi utilizada para modificar a superfície do eletrodo ECV/AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> para a formação do filme tridimensional da SAM. A quantidade de moléculas adsorvidas sobre as AuNps (tridimensional) é superior quando comparada ao eletrodo de ouro sólido (bidimensional). Segundo relatos na literatura, as monocamadas formadas tridimensionalmente em torno das nanopartículas apresentam atividade eletrocatalítica, promovendo a transferência de elétrons entre as biomoléculas e o eletrodo de forma mais efetiva, quando comparada a monocamada imobilizada bidimensional <sup>[172]</sup>. Sendo assim, imobilizou-se a enzima HRP sobre o filme tridimensional de TLA, utilizando os agentes de ligação EDC/NHS, conforme Figura 49.

**Figura 49.** Esquema representativo da formação do biossensor ECV/AuNps-TLA-HRP.

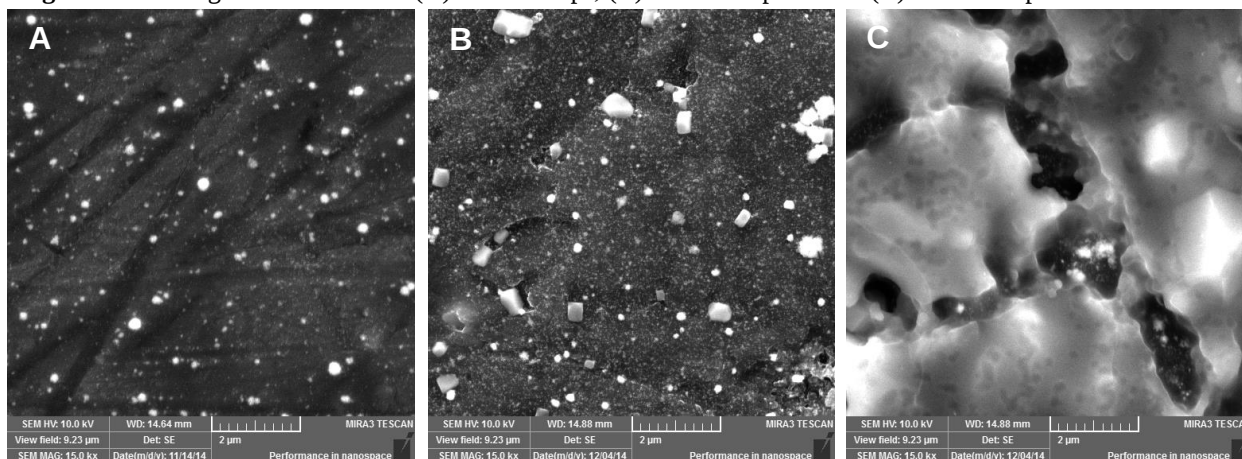


Fonte: a autora

A imobilização enzimática sobre o TLA oferece a possibilidade de controlar a orientação, distribuição e o espaçamento das enzimas, reduzindo a possibilidade de deformação da biomolécula quando imobilizadas. Segundo o esquema, as AuNps aumentam a quantidade de TLA ligado covalentemente, logo, haverá mais sítios de ligação no sensor, e assim mais enzimas possivelmente serão imobilizadas, que podem aumentar o sinal analítico.

A medida que ocorre cada modificação sobre o ECV a estrutura e a morfologia da superfície são alteradas, como mostram as imagens de FEG da Figura 50. Na micrografia (Fig 50-A) observa-se que as AuNps são depositadas de forma uniforme no substrato ECV. Com a imersão do ECV/AuNps na solução contendo o ácido TLA (Fig 50-B) ocorreu pequenas alterações na morfologia, devido esta molécula apresentar pequena cadeia carbônica.

**Figura 50.** Micrografias do eletrodo (A) ECV/AuNps, (B) ECV/AuNps/TLA e (C) ECV/AuNps/TLA/HRP

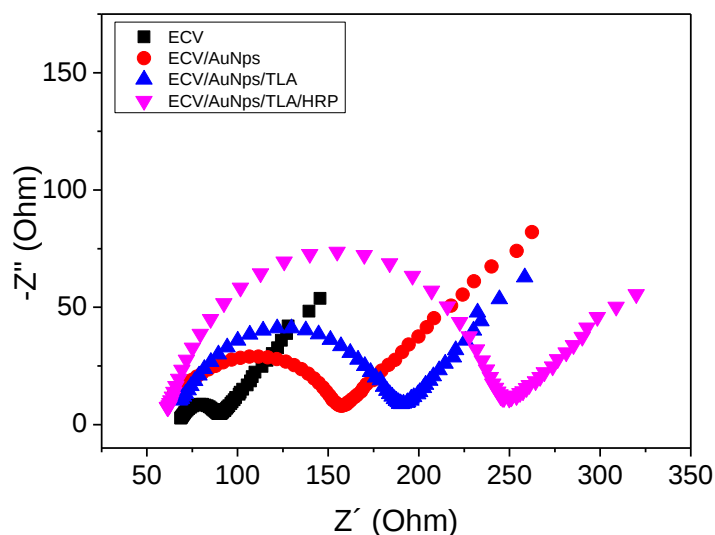


Fonte: a autora

No entanto, após a imobilização da enzima HRP, é possível observar na imagem (Fig 50-C), que a modificação ECV/AuNps/TLA/HRP altera drasticamente a morfologia da superfície. O filme tornou-se mais volumoso, apresentando cavidades irregularidades, comprovando assim, a modificação da superfície com a enzima.

A imobilização das AuNps, do TLA e da enzima HRP altera as propriedades interfaciais do eletrodo, tal como a resistência de transferência de elétrons. A cada etapa de formação do biossensor foi acompanhada por medidas de EIE, conforme Figura 51.

**Figura 51.** Diagramas de Nyquist para os diferentes eletrodos na presença de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,5



Fonte: a autora

A curva de impedância do ECV apresenta um diâmetro semicircular pequeno, o que indica a rápida cinética de transferência de elétrons da molécula sonda à superfície do eletrodo. No entanto, com as posteriores imobilizações, o estudo demonstrou que o diâmetro do semicírculo aumenta, implicando na elevada resistência de transferência de elétrons, possivelmente devido ao aumento da espessura, densidade, e propriedades dos materiais imobilizados. Os valores de resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ) obtidos a partir dos dados da EIE para as diferentes imobilizações estão na Tabela 9.

**Tabela 9.** Valores de resistência de transferência de carga dos diferentes eletrodos

| <i><b>Eletrodo</b></i> | <i><b>Rct (Ohm)</b></i> |
|------------------------|-------------------------|
| ECV                    | 24,77                   |
| ECV/AuNps              | 108,58                  |
| ECV/AuNps/TLA          | 130,08                  |
| ECV/AuNps/TLA/HRP      | 188,70                  |

Fonte: a autora

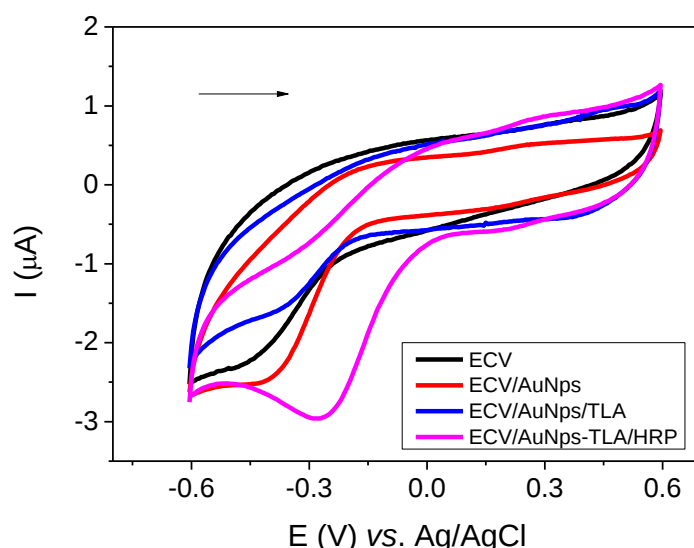
Segundo os resultados obtidos, ocorre o aumento de  $R_{ct}$  de 24,77  $\Omega$  do ECV para 108,58  $\Omega$  após a incorporação das AuNps. Esperava-se, que com a incorporação das AuNps a transferência de carga seria facilitada devido a sua natureza eletrocatalítica, logo o valor de  $R_{ct}$  diminuiria em comparação ao substrato contendo somente o ECV. No entanto, esse comportamento pode estar relacionado à estrutura não-eletroativa do seu agente estabilizante, o polímero  $SiPy^+Cl^-$  [191], o qual atua como uma barreira no processo de transferência de elétrons aumentando o valor de  $R_{ct}$ .

O comprimento da cadeia carbônica do tiol também afeta a velocidade de transferência de elétrons e a cobertura de superfície, sendo assim, quando a arquitetura do filme é alterada com o TLA (ECV/AuNps/TLA), observa-se um leve aumento no valor de  $R_{ct}$  130,08  $\Omega$  causado pelo efeito isolante da molécula. Esta pequena variação, está relacionada ao tamanho da cadeia carbônica, pois quanto menor o comprimento menor será a resistência de transferência de elétrons [103]. Ao final, na modificação com a enzima HRP promove um aumento no valor de  $R_{ct}$  188,70  $\Omega$ , confirmando a deposição da proteína sobre a superfície.

### 4.3 Caracterização eletroquímica dos diferentes sensores na presença do peróxido de hidrogênio

Inicialmente, a técnica de voltametria cíclica foi empregada para confirmar a viabilidade de aplicação do eletrodo ECV modificado como sensor eletroquímico para o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Um estudo comparativo foi realizado para analisar o comportamento de cada etapa de modificação na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na concentração  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ , segundo Figura 52.

**Figura 52.** Voltamogramas cíclicos obtidos para os diferentes sensores em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$



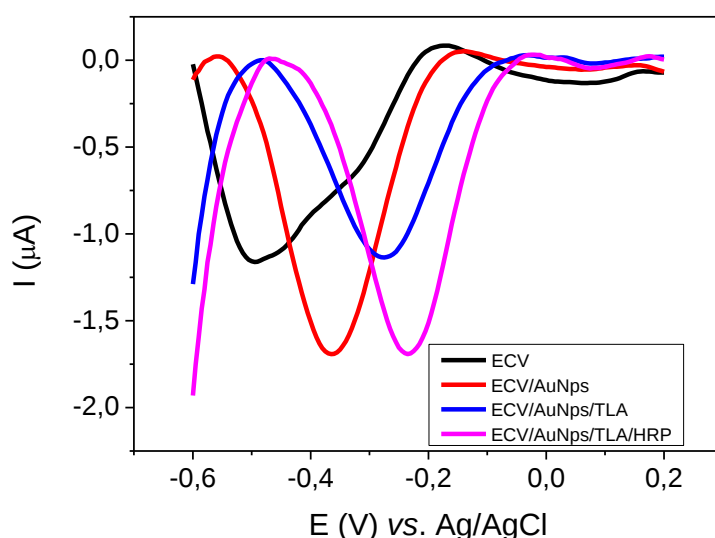
Fonte: a autora

Como pode ser observado na Figura 52, todos os filmes e o substrato ECV apresentam eletroatividade na redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para o substrato ECV percebe-se que o processo de redução é menos definido e ocorre em potenciais mais negativos ( $-0,45 \text{ V}$ ) quando comparado aos demais filmes. Entretanto para o ECV/AuNps um processo de redução com maior intensidade de corrente e mais bem definido é observado em torno de  $-0,35 \text{ V}$ . No entanto, com a imobilização da molécula de TLA ocorre um deslocamento do pico de redução para  $-0,4 \text{ V}$  e uma diminuição na intensidade de corrente devido ao efeito isolante da SAM. Para o filme ECV/AuNps/TLA/HRP obteve-se maiores valores de corrente em relação às demais modificações, além disso, o pico de redução para o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é deslocado em potenciais menos negativos ( $-0,28 \text{ V}$ ). Tais resultados confirmam a imobilização da enzima HRP na SAM

formada sobre as AuNps, o que acarreta o aumento na sensibilidade do dispositivo ECV/AuNps/TLA/HRP.

A técnica de voltametria de pulso diferencial também foi utilizada para caracterizar os diferentes eletrodos na presença do substrato enzimático –  $\text{H}_2\text{O}_2$ , conforme Figura 53. Os voltamogramas de pulso diferencial apresentaram um comportamento semelhante ao obtido pela voltametria cíclica.

**Figura 53.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para os diferentes sensores em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>,  $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$  na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3 mmol L<sup>-1</sup>.



Fonte: a autora

Como pode ser observado, a cada modificação no eletrodo ECV o potencial de pico de redução ( $E_{pc}$ ) desloca-se para valores próximos de 0,0 V (menos negativos) indicando eletrocatalise no sistema, favorecendo a transferência eletrônica com as modificações. Também são observadas alterações nas intensidades da corrente de pico, pois após a incorporação das AuNps sobre o ECV, a corrente aumenta de 1,10 para 1,69  $\mu\text{A}$ . Uma diminuição no valor de  $I_{pc}$  ocorre após a imobilização da SAM, fato ocasionado pela molécula de TLA, a qual promove uma barreira dificultando a transferência eletrônica. No entanto, apesar da perda da corrente de pico do ECV/AuNps/TLA ( $I_{pc} = 1,16 \mu\text{A}$ ) em comparação ao ECV/AuNps, o  $E_{pc}$  melhora significativamente, deslocando de -0,36 para -0,27 V, conforme dados da Tabela 10. A superfície do eletrodo ECV/AuNps/TLA quando modificado com a enzima HRP apresenta um aumento na corrente de pico catódico ( $I_{pc} = 1,72 \mu\text{A}$  e  $E_{pc} = -0,23 \text{ V}$ ) uma vez que a molécula

de tiol confere um ambiente favorável a incorporação da enzima HRP facilitando a resposta do analito a superfície do eletródica.

**Tabela 10.** Valores de  $E_{pc}$ ,  $I_{pc}$  e sensibilidade dos diferentes eletrodos na presença de  $H_2O_2$

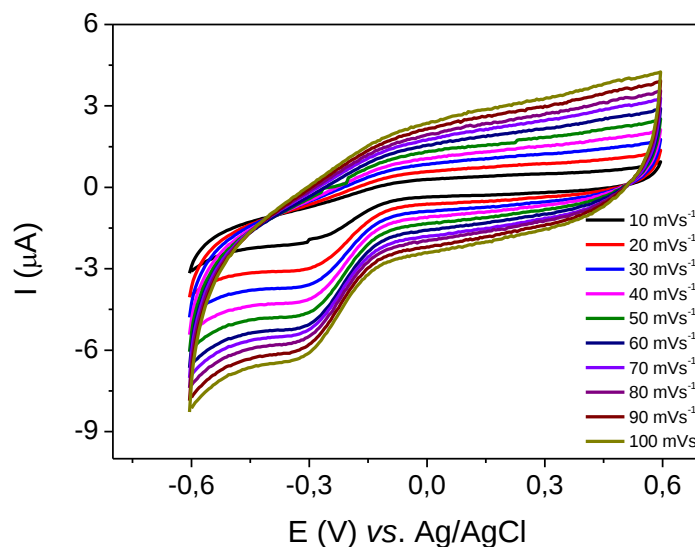
| <i>Eletrodos</i>  | <i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i> |                           |                            |                                              |
|-------------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------------------------|
|                   | <i>E<sub>pc</sub> (V)</i>         | <i>Equação da reta</i>    | <i>Coef. de correlação</i> | <i>Sensibilidade (μA/mol L<sup>-1</sup>)</i> |
| ECV               | - 0,49                            | -                         | -                          | -                                            |
| ECV/AuNps         | - 0,36                            | $y = 0,571 - 3102,93x$    |                            | 3123,14                                      |
| ECV/AuNps/TLA     | - 0,27                            | $y = 0,06388 - 4014,61x$  |                            | 4014,61                                      |
| ECV/AuNps/TLA/HRP | - 0,23                            | $y = -0,37528 - 4305,49x$ |                            | 4305,49                                      |

Fonte: a autora

A fim de avaliar a sensibilidade das diferentes configurações de eletrodos propostos para determinação do  $H_2O_2$ , curvas analíticas foram obtidas na faixa de concentração de 30 a 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Para o eletrodo ECV não ocorre o aumento linear da corrente com o aumento da concentração da  $H_2O_2$ , portanto sua sensibilidade não foi calculada. Pelas curvas analíticas obtidas verificou que a sensibilidade do eletrodo de ECV/AuNps/TLA/HRP (4305,49  $\mu\text{A/mol L}^{-1}$ ) foi mais elevada do que a do eletrodo ECV/AuNps/TLA (4014,61  $\mu\text{A/mol L}^{-1}$ ), comprovando que a imobilização enzimática melhora a sensibilidade do dispositivo.

Os voltamogramas cíclicos do biossensor em função da velocidade de varredura no intervalo de 10 a 100  $\text{mV s}^{-1}$  na presença do  $H_2O_2$  podem ser observados na Figura 54.

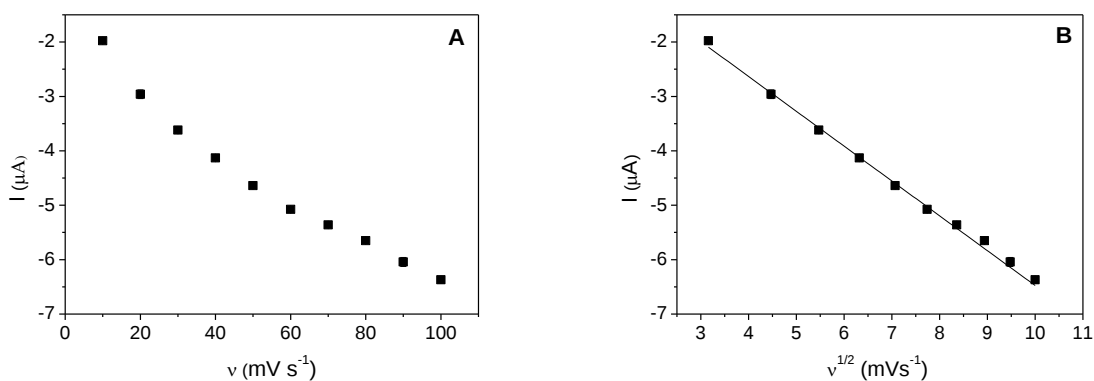
**Figura 54.** Voltamogramas cíclicos do biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP em diferentes velocidades de varredura em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> na presença de 2 mmol L<sup>-1</sup>



Fonte: a autora

Verificou-se um aumento do pico de redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em função do aumento da velocidade de varredura. Assim, analisou-se a relação entre a corrente de pico de redução em função da velocidade de varredura (Fig. 55-A) e em função da raiz quadrada de varredura (Fig. 55-B). Com este estudo, pode-se determinar se o processo de transferência de massa do analito até a superfície eletródica ocorre por adsorção ou difusão.

**Figura 55.** (A) Relação entre a corrente de pico de redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a velocidade de varredura; (B) Relação entre a corrente de pico de redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a raiz quadrada da velocidade de varredura.

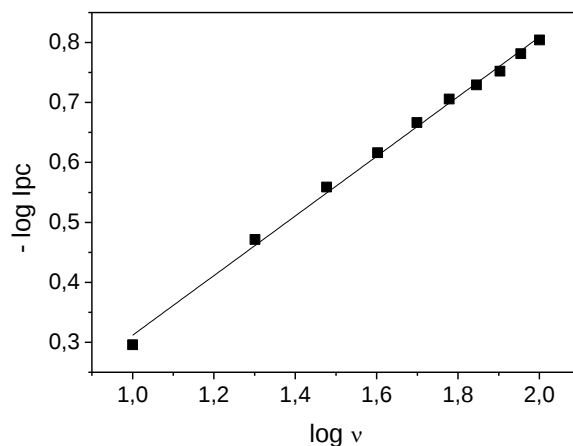


Fonte: a autora

Analisando os dois gráficos obtidos (Fig. 55-A e B), a relação linear foi obtida na corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (Coeficiente de

correlação  $I$  vs  $v^{1/2}$ ,  $r = 0,9958$  e  $I$  vs  $v$ ,  $r = 0,9462$ ). Esse comportamento é um indicativo que o transporte de massa é controlado pela difusão de espécies na superfície eletródica. A fim de comprovar esse comportamento, analisou-se a dependência de  $\log I_{pc}$  vs  $\log v$  para o biosensor <sup>[119]</sup>, conforme Figura 56.

**Figura 56.** Dependência linear de  $\log I_{pc}$  vs  $\log v$  para o biosensor ECV/AuNps/TLA/HRP.



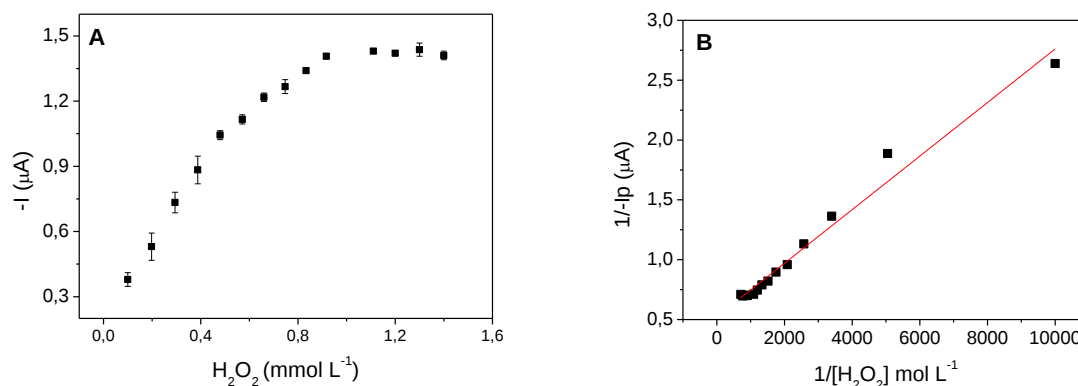
Fonte: a autora

O gráfico (Figura 56) do logaritmo da intensidade de corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura (equação da reta  $y = -0,185 + 0,49x$ ) com comportamento linear ( $r = 0,9965$ ) com inclinação de 0,49. Esse valor está próximo de previsto pela literatura (0,50) para sistemas controlados pela difusão de espécies <sup>[119]</sup>.

#### 4.4 Cinética enzimática

A constante aparente de Michaelis-Menten ( $K_M^{app}$ ) é um parâmetro importante, pois fornece informações sobre a cinética enzimática. Para o eletrodo ECV/AuNps/TLA/HRP o valor de  $K_M^{app}$  foi obtido a partir da equação 4 de Lineweaver-Burk, com base na curva analítica representada na Figura 57.

**Figura 57.** (A) Curva analítica obtida para a adição de padrão para  $\text{H}_2\text{O}_2$  em meio de solução tampão PBS 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 6,5 na faixa de 0,1 a  $1,4 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  para o biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP. (B) Gráfico de Duplo recíproco ou Lineweaver and Burk, obtido para o biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP.



Fonte: a autora

Utilizando a equação da reta ( $y = 0,522 + 2,237 \cdot 10^{-4}x$ ) obtida a partir do gráfico da Figura 50-B, o valor do  $K_M^{app}$  para o biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP foi de 0,43 mmol  $\text{L}^{-1}$ . Esse resultado é bem próximo ao obtido pelo sistema Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP ( $K_M^{app} = 0,40$  mmol  $\text{L}^{-1}$ ). Valores pequenos de  $K_M^{app}$  refletem afinidade elevada da enzima pelo substrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), sendo assim a máxima eficiência catalítica será alcançada em baixas concentrações. No entanto, valores altos de  $K_M^{app}$  refletem baixa afinidade da enzima pelo substrato [192]. Os parâmetros encontrados para este biossensor são similares a alguns encontrados na literatura, conforme Tabela 11.

**Tabela 11.** Comparação do valor de  $K_M^{app}$  para diferentes biossensores enzimáticos

| Eletrodo       | Modificação                                 | $K_M^{app}$               | Ref.          |
|----------------|---------------------------------------------|---------------------------|---------------|
| ITO            | AuS/TMB/HRP                                 | 2,2 mmol $\text{L}^{-1}$  | [193]         |
| Carbono vítreo | $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @poli(dopamine)/HRP | 3,05 mmol $\text{L}^{-1}$ | [194]         |
| Carbono vítreo | Dipeptídeos-AuNps/HRP/Nafion                | 0,7 mmol $\text{L}^{-1}$  | [195]         |
| Carbono vítreo | AuNps/TLA/HRP                               | 0,43 mmol $\text{L}^{-1}$ | Este trabalho |

ITO/AuS/TMB/HRP = óxido de estanho dopado com índio/(3-mercaptopropil)trimetoxissilano/AuNps/tetrametil benzidina/HRP;  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @ = nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.

Fonte: a autora

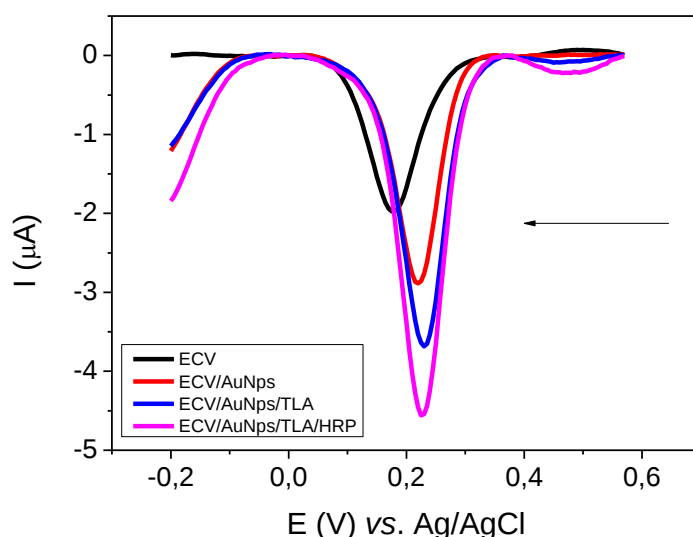
Verifica-se que o eletrodo ECV/AuNps/TLA/HRP apresenta o valor de  $K_M^{app}$  mais baixo do que alguns relatados na literatura, sem a necessidade da utilização de um mediador de elétrons como no trabalho de Lin *et al* [193] que utiliza o tetrametil benzidina e também no reportado por Gong *et al* [195] que utiliza a hidroquinona como mediador. Este resultado indica

que o sistema AuNps/TLA é uma promissora matriz para aplicação na fabricação de biossensores eletroquímicos.

#### 4.5 Determinação do Catecol utilizando o ECV/AuNps/TLA/HRP

O catecol (1,2-dihidroxibenzeno) (CT) é um composto polifenólico natural, que é encontrado na natureza, em diversas plantas, tais como chás, vegetais, frutas, tabaco e alguns medicamentos tradicionais. O CT tem sido amplamente estudado devido à importância biológica, como antioxidante, antivírus [66]. No entanto, o CT é altamente tóxico para os seres humanos, animais, plantas e vida aquática quando presentes em altas concentrações [196]. A absorção de CT a partir do trato gastrointestinal pode induzir algumas doenças, tais como a degeneração do tubo renal e diminuição da função hepática [197]. Sendo assim utilizou o biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP também foi aplicado para detecção do catecol, conforme Figura 58.

**Figura 58.** Voltamogramas cíclicos do ECV, ECV/AuNps, ECV/AuNps/TLA e ECV/AuNps/TLA/HRP na presença de catecol  $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  em tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5.



Fonte: a autora

Conforme analisado na Figura 58, a cada modificação do eletrodo ECV ocorre o aumento da corrente de pico catódica, sendo o máximo obtido para o biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP. O potencial de pico também apresenta deslocamento, evidenciando as modificações, os parâmetros eletroanalíticos ( $E_{pc}$  e  $I_{pc}$ ) obtidos estão apresentados na Tabela 12.

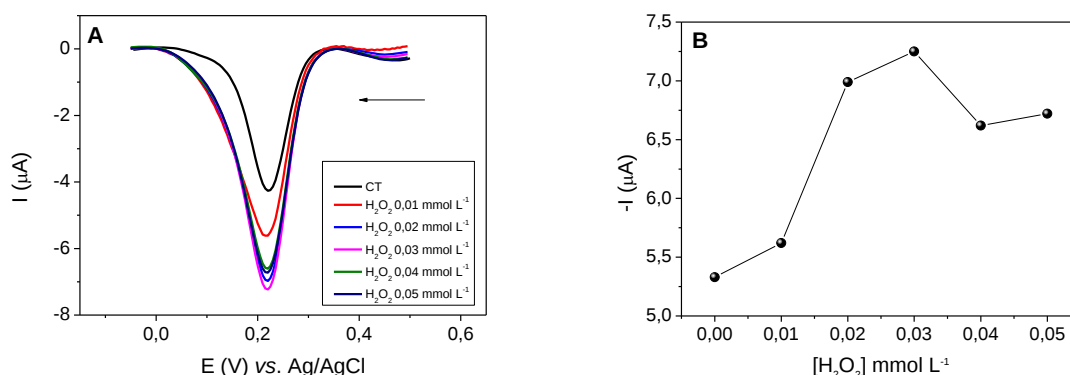
**Tabela 12.** Parâmetros eletroanalíticos (potencial e corrente de pico) dos diferentes eletrodos na presença de CT

| <i>Eletrodos</i>  | <i>E<sub>pc</sub> (V)</i> | <i>I<sub>pc</sub> (μA)</i> |
|-------------------|---------------------------|----------------------------|
| ECV               | 0,179                     | - 1,955                    |
| ECV-AuNps         | 0,218                     | - 2,912                    |
| ECV-AuNps-TLA     | 0,230                     | - 3,698                    |
| ECV-AuNps-TLA-HRP | 0,225                     | - 4,554                    |

Fonte: a autora

No intuito de melhorar o desempenho do biossensor, adicionou o substrato enzimático  $\text{H}_2\text{O}_2$  para a determinação do CT. Segundo relatado na literatura, a enzima HRP na presença do  $\text{H}_2\text{O}_2$  proporciona um aumento significativo na corrente do processo redox dos compostos fenólicos<sup>[118]</sup>, devido uma melhor regeneração da enzima, como descrito na Figura 6 (Capítulo 1). Neste sentido, Hernández-Cancel *et al*<sup>[65]</sup> avaliaram o efeito da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para a otimização e sensibilidade do biossensor, pois segundo os autores a inativação de HRP por concentrações elevadas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem de ser evitada. Desta forma para evitar a inativação da enzima e melhorar a resposta eletroquímica do catecol, um estudo sobre o efeito da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi investigado por voltametria de pulso diferencial (VPD), segundo Figura 59.

**Figura 59** (A) Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo de ECV/AuNps/TLA/HRP variando-se a concentração  $\text{H}_2\text{O}_2$  na faixa de 0,01 a 0,05  $\text{mmol L}^{-1}$  na presença de uma concentração fixa de CT 0,18  $\text{mmol L}^{-1}$ ; (B) Dependência da corrente de pico da CT em função da concentração do  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



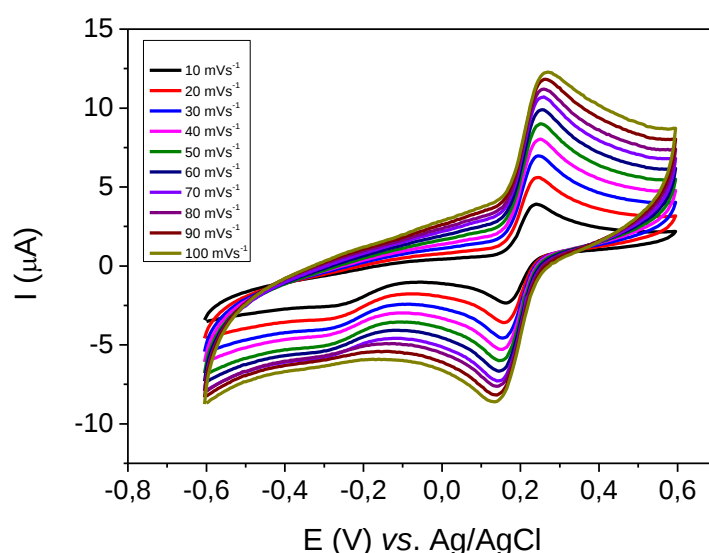
Fonte: a autora

Como pode ser observado na Figura 59, à medida que a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumenta, ocorre um aumento não linear na corrente do biossensor até atingir 0,03  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a partir desta concentração houve um decréscimo na corrente provavelmente devido a saturação ou desnaturação da enzima. Sendo assim, pode-se concluir que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  atua como mediador de elétrons do CT no desempenho do sensor, até a  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$ . Esta concentração foi

escolhida para estudos posteriores uma vez que esta proporciona bons resultados e também evita a inativação enzimática.

No intuito de analisar o tipo de transporte de massa envolvido no processo redox do CT, foi realizado um estudo da variação da velocidade de varredura (na faixa de 10 a 100 mVs<sup>-1</sup>), utilizando a técnica VC. Os voltamogramas obtidos em função da velocidade de varredura podem ser observados na Figura 60.

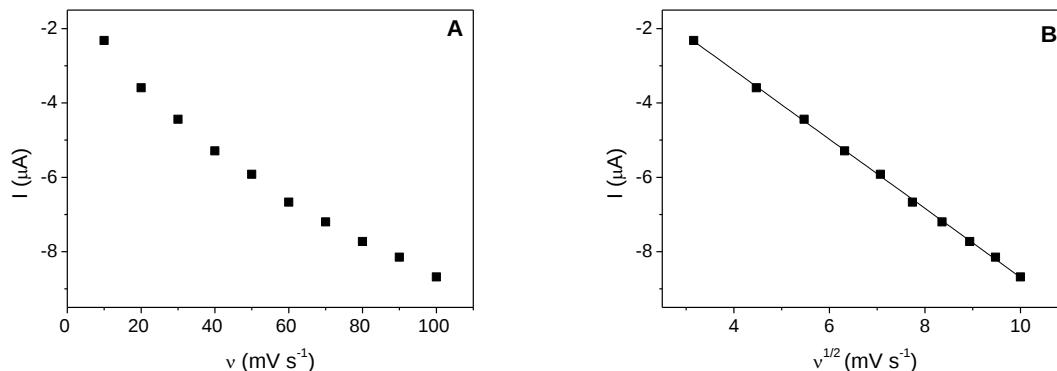
**Figura 60.** Voltamogramas cíclicos do biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP em diferentes velocidades de varreduras na presença de 0,03 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,03 mmol L<sup>-1</sup> de CT em tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> no pH 6,5.



Fonte: a autora

Verifica-se que há um aumento nas correntes de pico à medida que aumenta a velocidade de varredura. A Figura 61 mostra a variação da corrente de pico catódica como função da velocidade de varredura e raiz quadrada da velocidade de varredura

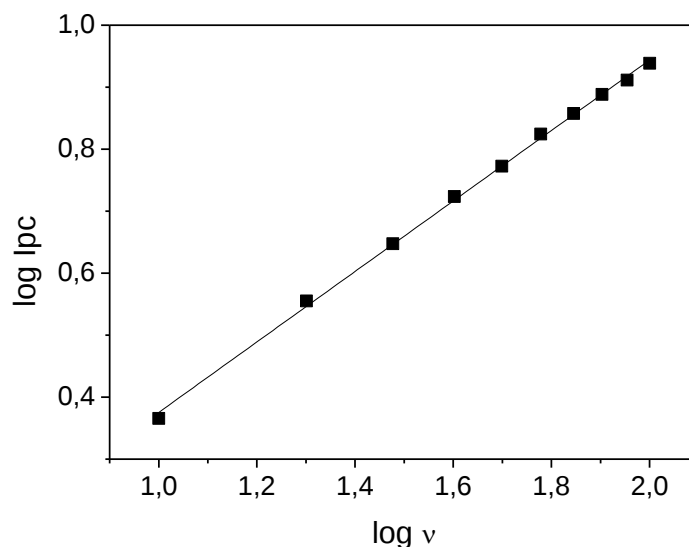
**Figura 61.** (A) Dependência  $I_{pc}$  com a velocidade de varredura, (B) Dependência  $I_{pc}$  com a raiz quadrada da velocidade de varredura, do ECV/AuNps/TLA/HRP na presença de  $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$  de CT em tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  no pH 6,5



Fonte: a autora

A relação linear entre a  $I_{pc}$  e a velocidade de varredura é descrita pela equação  $I_{pc} (\mu\text{A}) = -2,26 - 0,067 v (\text{mV s}^{-1})$ , com  $R = 0,974$ . Já para a raiz quadrada da velocidade:  $I_{pc} (\mu\text{A}) = 0,596 - 0,928 v (\text{mV s}^{-1})$ , com  $R = 0,999$ , indicativo de um processo de transporte de massa difusional. Para confirmar esse processo aplicou-se a relação entre o duplo recíproco da  $I_{pc}$  e a  $v$ , conforme Figura 62.

**Figura 62.** Dependência linear de  $\log I_{pc}$  vs  $\log v$  para o biosensor ECV/AuNps/TLA/HRP.



Fonte: a autora

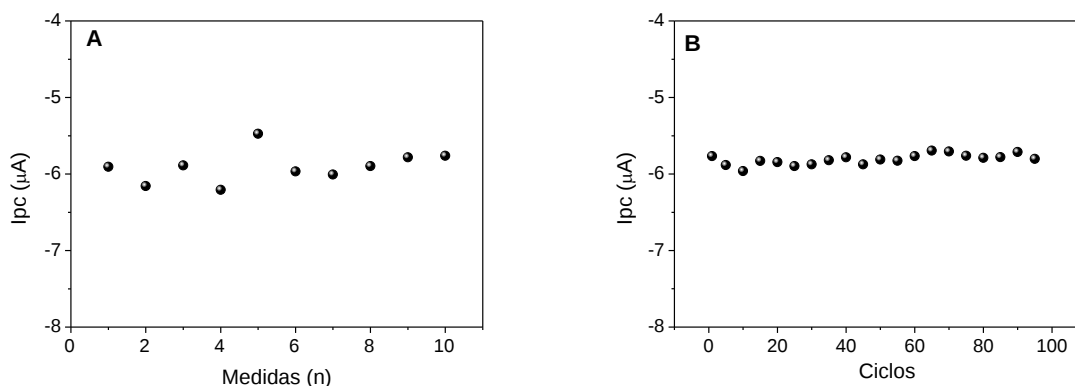
O gráfico (Figura 62) do logaritmo da intensidade de corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura ( $y = -0,1932 + 0,56 x$ ) apresentou comportamento linear ( $r = 0,9987$ ) com inclinação de 0,56. Esse valor está próximo de previsto pela literatura (0,50)

[119] para sistemas controlados pela difusão de espécies, comprovando o processo difusional do CT para o biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP.

#### 4.6 Estudo da repetitividade e estabilidade da medida do biossensor

A repetitividade do biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP foi realizada a partir de uma série de medidas ( $n=10$ ) em soluções diferentes (utilizando o mesmo eletrodo) contendo concentração de CT  $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$  em meio de tampão PBS pela voltametria cíclica, onde o RSD foi de 3,52% conforme Figura 63-A:

**Figura 63.** Voltamogramas cíclicos do ECV/AuNps/TLA/HRP na presença de CT  $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . (A) Repetitividade de medida (B) Relação entre  $I_{pc}$  e o número de ciclos voltamétricos.



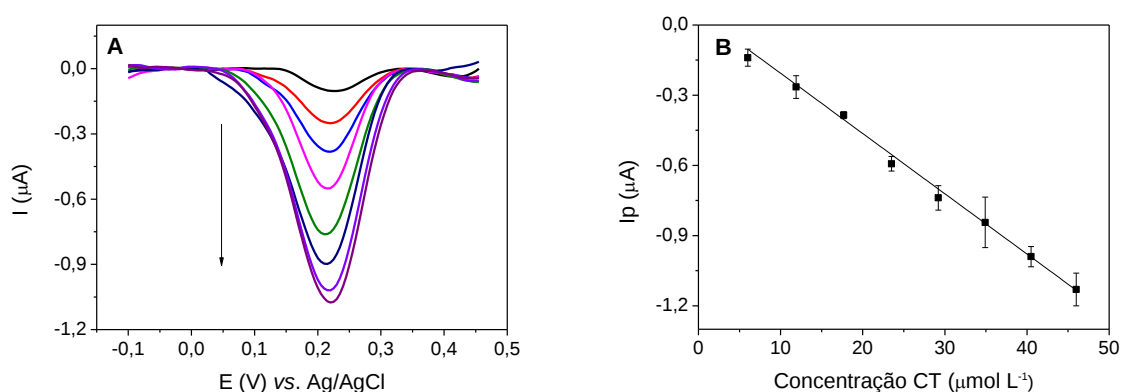
Fonte: a autora

A estabilidade de medida do biossensor foi avaliada após 100 ciclos consecutivos pela voltametria cíclica na presença de CT  $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$  em meio de tampão PBS. Observa-se na Figura 56-B que a corrente de pico catódica se mantém constante em função do número de ciclos, com RSD (ou DPR) foi de 1,17 %. Os valores obtidos de repetitividade e estabilidade são satisfatórios para aplicação deste biossensor na detecção quantitativa de compostos fenólicos.

#### 4.7 Aplicação analítica voltamétrica para o biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP

Para a determinação analítica do CT foi escolhida a técnica de voltametria de pulso diferencial, pela qual analisou o sinal de corrente de pico de redução do eletrodo ECV/AuNps/TLA/HRP em diferentes concentrações de catecol no intervalo de 6,0 a 46,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  na presença de 0,03  $\text{mmol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio, conforme Figura 64.

**Figura 64.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo ECV/AuNps/TLA/HRP na presença de  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$  em diferentes concentrações de solução de catecol na faixa de 6,0 a 46,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  utilizando os parâmetros otimizados:  $E_{\text{pulso}} = 0,05 \text{ V}$ , velocidade de varredura =  $0,05 \text{ V s}^{-1}$ , e tempo de pulso = 0,05 s. (B) Relação entre a corrente de pico e a concentração de catecol.



Fonte: a autora

Nas condições otimizadas, a curva analítica obtida foi linear na faixa de 6,0 a 46,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de catecol e a equação correspondente foi de  $-\Delta I = 0,0515 + 0,026 [\text{CT}]$ ; ( $r = 0,994$ ), onde  $-\Delta I$  é a corrente de pico resultante e  $[\text{CT}]$  é a concentração do catecol em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . O desvio padrão dos brancos (medidas realizadas com o ECV/AuNps/TLA/HRP apenas no eletrólito suporte) para as curvas foi estimado o qual foi de  $\text{SB} = 0,00732$ . Estes dados foram utilizados para calcular o limite de detecção do biossensor por  $\text{LD} = 0,852 \mu\text{mol L}^{-1}$  e o limite de quantificação  $\text{LQ} = 2,84 \mu\text{mol L}^{-1}$  segundo método IUPAC <sup>[88]</sup>. O valor de LD apresentado por este biossensor foi comparado com outros sensores e biossensores descritos na literatura, como mostra a Tabela 13.

**Tabela 13.** Comparação com diferentes eletrodos modificados para determinação de CT.

| <i>Eletrodo</i> | <i>Modificação</i>                                | <i>Faixa linear (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</i> | <i>LD (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</i> | <i>Ref.</i>   |
|-----------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------|
| Ouro            | F <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiPGMA-HRP         | 500,0 a 11000,0                                         | 46,0                                          | [198]         |
| Platina         | Cloreto de 2,2'-bipiridina-cloro-p-cimeno rutênio | 5,0 a 100,0                                             | 2,385                                         | [199]         |
| Carbono vítreo  | II/1,2diaminobenzeno/PPO                          |                                                         |                                               |               |
| Carbono vítreo  | Polianilina/Glutaraldeído/Laccase                 | 3,2 a 19,6                                              | 2,070                                         | [63]          |
| Carbono vítreo  | AuNps/TLA/HRP                                     | 6,0 a 46,0                                              | 0,852                                         | Este trabalho |
| Carbono vítreo  | MWCNTs/PDA/AuNps/quitosana                        | 0,1 a 10,0                                              | 0,047                                         | [62]          |

F<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiPGMA-HRP – nanopartículas de óxido de ferro estabilizados no silano poliglicidil metacrilato; PPO – polifenol oxidase; MWCNTs/PDA/AuNps – nanotubos de carbono de parede múltipla/polidopamina/nanopartículas de ouro.

Fonte: a autora

O biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP desenvolvido apresentou um bom desempenho analítico em termos de faixa linear e limite de detecção quando comparado os outros biossensores/sensor relatados para detecção do catecol. Esta modificação do eletrodo ECV com as nanopartículas e o TLA proporcionou uma plataforma atrativa para imobilização da HRP, sendo promissora para futuras investigações empregando outras enzimas.

A estabilidade a longo prazo do biossensor foi investigada acompanhando sua resposta eletroquímica na presença de 0,3 mmol L<sup>-1</sup> de CT durante 25 dias. Após o uso, o biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP foi mantido estocado em geladeira a 4 °C em solução de PBS (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,5). O biossensor foi estável e manteve sua resposta eletroquímica inicial em 90% após a estocagem durante 25 dias. O decréscimo na resposta da corrente pode ser explicado pela diminuição da atividade enzimática, devido ao longo tempo de estocagem. Esta boa estabilidade possibilita a utilização deste dispositivo para determinação do analito CT sem prejuízo a resposta eletroquímica.

## 5 CONCLUSÕES

Neste capítulo, abordaram-se a síntese da dispersão coloidal AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> bem como a sua aplicação como plataforma para obtenção de biossensores. Com os resultados obtidos pelas medidas espectroscópicas e também eletroquímicas, comprovou-se que o silsesquioxano atua como estabilizante das AuNps apresentando boa distribuição, com diâmetro aproximado de 18 nm e relativa estabilidade ( $\zeta$  +38,5 mV). Com a imobilização das AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> sobre o eletrodo de carbono vítreo foi possível modificá-las com a molécula de TLA, proporcionando uma plataforma adequada, simples e de baixo custo que pode ser efetivamente utilizada para imobilizar a enzima HRP. A etapa de formação da monocamada de TLA foi comprovada pelo aumento da resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ) medido pela espectroscopia de impedância eletroquímica. As AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> aumentaram a área superficial favorecendo a formação da SAM de TLA de forma tridimensional, proporcionando uma maior disponibilidade de sítios de ligação entre os grupos carboxílicos do TLA com a enzima HRP. O uso do TLA e das AuNps proporcionou um efeito sinérgico ao combinar a biocompatibilidade da SAM com a atividade eletrocatalítica e/ou aumento do sinal analítico promovido pelas AuNps. O biossensor ECV/AuNps/TLA/HRP foi utilizado para determinação do peróxido de hidrogênio e também para o catecol. Na determinação de catecol utilizou a técnica de VPD com respostas lineares na faixa de concentração de 6,0 a 46,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e limite de detecção de 0,852  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , além de apresentar boa estabilidade. Em particular, o tempo de vida útil de aproximadamente 25 dias desse biossensor, revela uma considerável estabilidade a qual é consequência das AuNps e TLA, que são facilmente acessíveis para enzima. A aplicação do dispositivo desenvolvido como biossensor apresenta viabilidade, o que foi reforçado pela sua estabilidade operacional, fácil preparo e possibilidade de plataforma para outras biomoléculas.

### CAPÍTULO 3 – CONCLUSÃO GERAL

O estudo da eficiência dos biossensores (Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP e ECV/AuNPs/TLA/HRP) foi acompanhado pelo estudo cinético de Michaelis-Menten, na presença do peróxido de hidrogênio. Os valores de  $K_M^{app}$  para os dois biossensores não variaram, o que leva a conclusão que a imobilização da monocamada de ácido tioláctico independente do substrato utilizado como suporte para imobilização enzimática não altera a afinidade entre a enzima e o substrato.

No entanto, os resultados voltamétricos e amperométricos deste estudo para peróxido de hidrogênio, mostraram que a monocamada de ácido tioláctico imobilizada no eletrodo de ouro assim como no eletrodo de carbono vítreo, apresenta comportamentos distintos na resposta eletroquímica tal como potencial de redução (-0,4 V para Au e -0,2 V para ECV) e corrente de redução. Desta forma, pode-se afirmar que o comportamento eletroquímico do biossensor na presença do analito de interesse é dependente também do suporte ao qual a monocamada foi formada.

Os biossensores propostos para detecção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se caracterizam pela transferência direta, sem a necessidade de mediador de elétrons. No biossensor em que há a presença da nanopartículas, a sensibilidade do dispositivo foi maior em comparação ao biossensor de ouro sólido, fato explicado pela eletrocatalise do processo de redução do peróxido, além do aumento da área superficial proporcionado pela AuNps.

O desempenho dos biossensores enzimáticos baseados na enzima HRP, mostraram-se eficiente para a detecção do peróxido de hidrogênio, assim como compostos fenólicos. Sendo que o Au/SAM<sub>mista</sub>/HRP foi sensível para hidroquinona e o ECV/AuNPs/TLA/HRP para o catecol.

Ressalta-se que os sistemas desenvolvidos promovem um ambiente favorável para a imobilização enzimática, sendo reforçado pela estabilidade operacional, fácil preparo e possibilidade de plataforma para outras biomoléculas.

## CAPÍTULO 4 - PERSPECTIVAS FUTURAS

Com o intuito de aprimorar as propriedades dos biossensores aqui descritos, a seguir tem-se algumas propostas para a continuidade deste trabalho:

- Incorporação da molécula do ácido 11-mercaptoundecanóico para a formação da SAM<sub>mista</sub> sobre as AuNps-SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> para a obtenção do biossensor.
- Testar aplicabilidade dos biossensores na detecção de compostos fenólicos em formulações farmacêuticas.
- Imobilização de anticorpos incorporados ao filme SAM para o desenvolvimento de imunossensores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 
- [1] TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T.; Polímeros biomiméticos e, química analítica, parte 2: aplicações de MIP ("Molecularly imprinted polymers") no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, v. 28, p. 1087-1101, 2005.
- [2] SHAIDAROVA, L. G.; BUDNIKOV, G. K.; Chemically modified electrodes based on noble metals, polymer films, or their composites in organic voltammetry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 63, p. 922-942, 2008.
- [3] MENDES, R. K.; FERREIRA, D. C. M.; CARVALHAL, R. F.; PERONI, L. A.; MACHADO, D. R.; KUBOTA, L. T. Development of an electrochemical immunosensor for *Phakopsora pachyrhizi* detection in the early diagnosis of soybean rust. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 795-801, 2009.
- [4] ARYA, S. K.; SOLANKI, P. R.; SINGH, R.; PANDEY, M. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Application of octadecanethiol self-assembled monolayer to cholesterol biosensor based on surface plasmon resonance technique. **Talanta**, v. 69, p. 918-926, 2006.
- [5] BAEUMNER, A. J.; Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, p. 434-445, 2003
- [6] WANG, L.; RAN, Q.; TIAN, Y.; YE S.; XU, J.; XIAN, Y.; PENG, R.; JIN, L. Covalent grafting tyrosinase and its application in phenolic compounds detection. **Microchimica Acta**, v. 171, p. 217-223, 2010.
- [7] SIQUEIRA, Jr J. R.; CASELI, L.; CRESPILO, F. N. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing. **Biosensor and Bioelectronics**, v. 25, p. 1254-1263, 2010.
- [8] MENDES, P. M.; YEUNG, C. L.; PREECE, J. A. Bio-nanopatterning of surfaces. **Nanoscale Res Letter**, v. 2, p. 373-384, 2007.
- [9] YADAV, R.; DWIVEDI, S.; KUMAR, S.; CHAUDHURY, A. Trends and Perspectives of biosensors for food and environmental virology. **Food Environ Virol**, v. 2, p. 53-63, 2010.
- [10] KIM, B. K.; LI, J.; IM, J.; AHN, K.; PARK, T. S.; CHO, S. I.; KIM, Y.; LEE, W. Impedometric estrogen biosensor based on estrogen receptor alpha-immobilized gold electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 671, p. 106-111, 2012.
- [11] RICCARDI C. S., COSTA P. I., YAMANAKA H. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, v. 25, p. 316-320, 2002.
- [12] GRABOWSKA, I.; SINGLETON, D. G.; STACHYRA, A.; GÓRA-SOCHACKA, A.; SIRKO, A.; ZAGÓRSKI-OSTOJA, W.; RADECKA, H.; STULZ, E.; RADECKI, J. A highly sensitive electrochemical genosensor based on Co-porphyrin-labelled DNA. **Chemical Communications**, v. 50, p. 4196-4199, 2014.
- [13] CHUNG, D. J.; KIM, K. C.; CHOI, H. Electrochemical DNA biosensor based on avidin-biotin conjugation for influenza virus (type A) detection. **Applied Surface Science**, v. 257, p. 9390-9396, 2011.
- [14] MOCCELINI, S. K.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on bean sprout homogenate immobilized in chitosan microspheres and silica for determination of chlorogenic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 381-387, 2008.
- [15] GRASSINO, A. N.; MILARDOVIC, S.; GRABARIC, Z.; GRABARIC, B. S. Amperometric assessment of glucose electrode behavior in mixed solvents and determination of glucose in dairy products. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1335-1339, 2011.
- [16] AHUJA, T.; KUMAR, D.; SINGH, N.; BIRADAR, A. M.; RAJESH, C. Potentiometric urea biosensor based on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs)/silica composite material. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p. 90-94, 2011.

- 
- [17] FERNANDES, S. C.; MOCCELINI, S. K.; SCHEEREN, C. W.; MIGOWSKI, P.; DUPONT, J.; HELER, M.; MICKE, G. A.; VIEIRA, I. C. Biosensor for chlorogenic acid based on an ionic liquid containing iridium nanoparticles and polyphenol oxidase. **Talanta**, v. 79, p. 222-228, 2009.
- [18] SUGIMOTO, Y.; KITAZUMI, Y.; TSUJIMURA, S.; SHIRAI, O.; YAMAMOTO, M.; KANO, K. Electrostatic interaction between an enzyme and electrodes in the electric double layer examined in a view of direct electron transfer-type bioelectrocatalysis. **Biosensor and Bioelectronics**, v. 63, p. 138-144, 2015.
- [19] CAO, A.; AI, H.; DING, Y.; DAI, C.; FEI, J. Biocompatible hybrid film of B-cyclodextrin and ionic liquids: A novel platform for electrochemical biosensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 155, p. 632-638, 2011.
- [20] CRESPILO, F. N.; GHICA, M. E.; GOUVEIA-CARIDADE, C. Enzyme immobilisation on electroactive nanostructures membranes (ENM): Optimised architectures for biosensing. **Talanta**, v. 76, p. 922-928, 2008.
- [21] NALLANI, M.; BENITO, S.; ONACA, O.; GRAFF, A.; LINDEMANN, M.; WINTERHALTER, M.; MEIER, W.; SCHWANEBERG, U. A nanocompartment system (Synthosome) designed for biotechnological applications. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 50-59, 2006.
- [22] FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. A.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1808-1825, 2013.
- [23] XU, J.; SHANG, F.; LUONG, J. H. T.; RAZEED, K. M.; GLENNON, J. D. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on a monolayer modified nanowire array electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 1313-1318, 2010.
- [24] MOCCELINI, S. K.; VIEIRA, I. C.; LUCCA, B. G.; BARBOSA, A. M. J.; FERREIRA, V. S. Determination of thiodicarb using a biosensor based on alfalfa sprout peroxidase immobilized in self-assembled monolayers. **Talanta**, v. 82, p. 164-170, 2010.
- [25] CONZUELO, F.; GAMELLA, M.; CAMPUZANO, S.; RUIZ, M. A.; REVIEJO, A. J.; PINGARRÓN, J. M. An integrated amperometric biosensor for the determination of lactose in milk and dairy products. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 7141-7148, 2010.
- [26] SHIN, Y. J.; KAMEOBA, J. Amperometric cholesterol biosensor using layer-by-layer adsorption technique onto electrospun polyaniline nanofibers. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, p. 193-197, 2012.
- [27] YADAV, S.; KUMAR, A.; PUNDIR, C. S. Amperometric creatinine biosensor based on covalently immobilized enzymes onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline composite film. **Analytical Biochemistry**, v. 419, p. 277-283, 2011.
- [28] SANTOS, C. S.; MOSSANHA, R.; PESSOA, C. A. Biosensor for carbaryl based on gold modified with PAMAM-G4 dendrimer. **Journal Applied Electrochemistry**, v. 45, p. 325-334, 2015.
- [29] BRADY, D. JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1639-1650, 2009.
- [30] ULMAN, A.; **Thin films – self-assembled monolayers of thiols**. Academic Press, New York, v. 24, 1998.
- [31] GOODING, J. J.; MEARNES, F.; YANG, W.; LIU, J. Self-assembled monolayers into the 21(st) century: Recent advances and applications. **Electroanalysis**, v. 15, p. 81-96, 2003.
- [32] ARYA, S.; SOLANKI, P. R.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronics devices. **Biosensor and bioelectronics**, v. 24, p. 2810-2817, 2009.
- [33] CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 1-12, 2002.
- [34] NIRMALYA, K.; CHAKI, K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayer as tunable platform for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 1-12, 2002.

- 
- [35] KHAN, A. Y.; NORONHA, S. B.; BANDYOPADHYAYA, R. Superior performance of a carbon-paste electrode based glucose biosensor containing glucose oxidase enzyme in mesoporous silica powder. *Advance Powder Technology*, v. 27, p. 85-92, 2016.
- [36] PATIL, B.; KOBAYASHI, Y.; FUJIKAWA, S.; OKAJIMA, T.; MAO, L.; OHSAKA, T. Direct electrochemistry and intramolecular electron transfer of ascorbate oxidase confined on L-cysteine self-assembled gold electrode. *Bioelectrochemistry*, v. 95, p. 15-22, 2014.
- [37] WANG, H.; OHNUKI, H.; ENDO, H.; IZUMIA, M. Effects of self-assembled monolayers on amperometric glucose biosensor based on an organic-inorganic hybrid system. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 168, p. 249-255, 2012.
- [38] ASAV, E.; AKYILMIZ, E. Preparation and optimization of a bioenzymic biosensor based on self-assembled monolayer modified gold electrode for alcohol and glucose detection. **Biosensor and bioelectronics**, v. 25, p. 1014-1018, 2010.
- [39] CHUANG, W.; LIN, J. Surface characterization and platelet adhesion studies for the mixed self-assembled monolayers with amine and carboxylic acid terminated functionalities. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 82A, p. 820-830, 2007.
- [40] KATSOURAS, I.; GESKIN, V.; KRONEMEIJER, A. J.; BLOM, P. W. M.; LEEUW, D. M. Binary self-assembled monolayers: apparent exponential dependence of resistance on average molecular length. **Organic Electronics**, v. 12, p. 857-864, 2011.
- [41] FOLKERS, J. P.; LAIBINIS, P. E.; WHITESIDES, G. M. Self-assembled monolayers of alkanethiols on gold: comparisons of monolayers containing mixtures of short- and long- chain constituents with CH<sub>3</sub> and CH<sub>2</sub>OH terminal groups. **Langmuir**, v. 8, p. 1330-1341, 1992.
- [42] CHEN, T. K.; BODWIN, E. F. Electrochemical characterization of dehaloperoxidase adsorbates on COOH/OH mixed self-assembled monolayers. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 703, p. 23-28, 2013.
- [43] JI, X. P.; LI, X. R.; WANG, N.; NI, R. X.; LIU, X. H.; XIONG, H. A. Attachment of tyrosinase on mixed self-assembled monolayers for the construction of electrochemical biosensor. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, p. 1239-1242, 2010.
- [44] SOSNA, M.; FAPYANE, D.; FERAPONTOVA, E. E. Reconstitution of peroxidase onto hemin-terminated alkanethiol self-assembled monolayers on gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 728, p. 18-25, 2014.
- [45] LOVE, J. C.; ESTROFF, L. A.; KRIEBEL, J. K.; Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Review**, v. 105, p. 1103-1169, 2005.
- [46] CANCINO, J.; RAZZINO, C. A.; ZUCLOTTO, V.; MACHADO, S. A. S. The use of mixed self-assembled monolayers as a strategy to improve the efficiency of carbamate detection in environmental monitoring. **Electrochimica Acta**, v. 87, p. 717-723, 2013.
- [47] SUN, K.; JIANG, B.; JIANG, X. Electrochemical desorption of self-assembled monolayers and its applications in surface chemistry and cell biology. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 656, p. 223-230, 2011.
- [48] PARK, B.; KIM, D.; YOON, D. Surface modification of gold electrode with gold nanoparticles and mixed self-assembled monolayers for enzyme biosensors. **Korean J. Chem. Eng.**, v. 28, p. 64-70, 2011.
- [49] RAOOF, J. B.; KIANI, A.; OJANI, R.; VALIOLLAHI, R.; RASHID-NADIMI, S. Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid and dopamine at the surface of electrodes modified with self-assembled gold nanoparticles films. **Journal Solid State Electrochem**, v. 14, p. 1171-1176, 2010.
- [50] SILVA, V. P. A.; ALVES, C. R.; DUTRA, R. F.; OLIVEIRA, J. E.; RONDINA, D.; FURTADO, R. F. Biosensor amperométrico para determinação de peróxido de hidrogênio em leite. **Eclética Química**, v. 36, p. 143-157, 2011.

- 
- [51] TUDORACHE, M.; MAHALU, D.; TEODORESCU, C.; STAN, R.; BALA, C.; PARVULESCU, V. I. Biocatalytic microreactor incorporating HRP anchored on micro-/nano-litographic patterns for flow oxidation of phenols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 133-139, 2011.
- [52] ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; YAMANAKA, H. Estudo do comportamento eletroquímico da enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e ácido 5-aminossalicílico. **Eclética**, v. 33, p. 57-62, 2008
- [53] TORRES, E.; AYALA, M. Biocatalysis based on heme peroxidase: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts. **Springer Science & Business Media**, 2010.
- [54] VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, p. 249-259, 2004.
- [55] MATHEW, M.; SANDHYARANI, N. A novel electrochemical sensor surface for the detection of hydrogen peroxidase using cyclic bisureas/gold nanoparticle composite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 28, p. 210-215, 2011.
- [56] SENEL, M.; CEVIK, E. A novel amperometric hydrogen peroxidase biosensor based on pyrrole-PAMAM dendrimer modified gold electrode. **Current Applied Physics**, p. 1-8, 2012.
- [57] RUZGAS, T.; CSÖREGI, E.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; MARKO-VARGA, G. Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. **Anal. Chim. Acta**, v. 330, p. 123-138, 1996.
- [58] DEYHIMI, F.; NAMI, F.; Peroxidase-catalyzed electrochemical assay of Hydrogen peroxidase: A ping-pong mechanism. **International Journal of Chemical Kinetics**, p. 699-704, 2012.
- [59] MENDES, R. K.; CARVALHAL, R. F.; KUBOTA, L. T. Effects of different self-assembled monolayers on enzyme immobilization procedures in peroxidase-based biosensor development. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 612, p. 164-172, 2008.
- [60] RAO, J. R.; VIRARAGHAVEN, T. Biosorption of phenol from aqueous solutions by *Aspergillus niger* biomass. **Bioresource Technology**, v. 85, p. 165-171, 2002.
- [61] RAO, M. A.; SCELZA, R.; ACEVEDO, F.; DIEZ, M. C.; GIANFREDI, L. Enzymes as useful tools for environmental purposes. **Chemosphere**, v. 2014.
- [62] WANG, Y.; XIONG, Y.; QU, J.; LI, S. Selective sensing of hydroquinone and catechol based on multiwalled carbon nanotubes/polydopamine/gold nanoparticles composites, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 223, p. 501-508, 2015.
- [63] NAZARI, M.; KASHANIAN, S.; RAFIPOUR, R. Laccase immobilization on the electrode surface to design a biosensor for the detection of phenolic compound such as catechol. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 145, p. 130-138, 2015.
- [64] YANG, S.; CHEN, Z.; JIN, X.; LIN, X. HRP biosensor based on sugar-lectin biospecific interactions for the determination of phenolic compounds. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 200-205, 2006.
- [65] HERNANDEZ-CANCEL, G.; SUAZO-DÁVILA, D.; MEDINA-GÚZMAN, J.; ROSADO-GONZÁLEZ, DÍAZ-VÁSQUEZ, L. M.; GRIEBENOW, K. Chemically glycosylation improves the stability of an amperometric horseradish peroxidase biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 854, p. 129-139, 2015.
- [66] OZONER, S. K.; YILMAZ, F.; CELIK, A.; KESKINLER, B.; ERHAN, E. A novel poly(glycine methacrylate-co-3-thienylmethyl methacrylate)-polypyrrole-carbon nanotube-horseradish peroxidase composite film electrode for the detection of phenolic compounds. **Current Applied Physics**, v. 11, p. 402-408, 2011.
- [67] CARVALHAL, R. T.; FREIRE, R. S.; KUBOTA, L. T. Polycrystalline gold electrodes: A comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation. **Electroanalysis**, v. 17, n. 14, p. 1251-1259.

- [68] GAUSSIAN 03, Revision C., Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.
- [69] MOLEKEL 5.3, P.H.P. Flükiger, S.; Lüthi, J.; Portmann, Weber, Swiss Center for Scientific Computing, Manno, Switzerland, 2000–2002.
- [70] WANG, Q.; LI, N. Direct electrochemistry of cytochrome c at a thiolactic acid self-assembled gold electrode. **Electroanalysis**, v. 13, No. 16, p. 1375 – 1377, 2001.
- [71] GARCÍA-RAYA, D.; MADUENO, R.; SEVILHA, J. M.; BLÁZQUEZ, PINEDA T. Electrochemical characterization of a 1,8-octanedithiol self-assembled monolayers (ODT-SAM) on a Au (111) single Crystal electrode. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 8026-8033, 2008.
- [72] RAOOF, J.; OJANI, R.; CHEKIN, F. Immobilization of 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid on gold electrode: application for cysteamine detection using Michael addition. **Journal of Materials Science**, v. 44, p. 2688-2693, 2009.
- [73] SOUZA, J. R.; PARENTE, M. M.; DIOGENES, I. N.; LOPES, L. G. F.; NETO, P. L., TEMPERINI, M. L. A.; BATISTA, A. A.; MOREIRA, I. S. A correlation study between the conformation of the 1,4-dithiane SAM on gold and its performance to assess the heterogeneous electron-transfer reactions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 566, p. 443–449, 2004.
- [74] RAN, Q.; PENG, R.; LIANG, C.; YE, S.; XIAN, Y.; ZHANG, W.; JIN, L. Covalent immobilization of horseradish peroxidase via click chemistry and its direct electrochemistry. **Talanta**, v. 83, p. 1381-1385, 2011
- [75] CUI, A. L.; TANG, J.; LI, W.; WANG, Z.; SUN, C.; ZHAO, M. Preparation of catalytically active enzyme thin film by alternate deposition of horseradish peroxidase and bipolar quaternary ammonium on solid surface. **Materials Chemistry and Physics**, v. 71, p. 23-27, 2001.
- [76] LEE, Y.; KWON, O.; YOON, Y.; RYU, K. Immobilization of horseradish peroxidase on multi-wall carbon nanotubes and its electrochemical properties. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 39-43, 2006.
- [77] DELVAUX, M.; DEMOUSTTIER-CHAMPAGNE, S. Immobilization of horseradish peroxidase within metallic nanotubes arrays for application to enzyme biosensors. **Biosensors and bioelectronics**, v. 18, p. 943-951, 2003.
- [78] KOZAN, J. V.; SILVA, R. P.; SERRANO, S. H. P.; LIMA, A. W.; ANGNES, L. Biosensing hydrogen peroxide utilizing carbon paste electrodes containing peroxidases naturally immobilized on coconut (*Cocos nucifera* L.) fibers. **Anal. Chim. Acta**, v. 591, p. 200-207, 2007.
- [79] LIMA-NETO, P.; PARENTE, M. M. V.; MOREIRA, I. S.; DIOGENES, I. C. N.; MATTOS, O. E. B.; SANTOS, R. P.; FREIRE, V. N. The influence of 4-mercaptopyridine layer instability on rapid electron transfer reaction. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 619-620, p. 26-30, 2008.
- [80] ROSSATO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, V. 24, p. 77-86, 2001.
- [81] HUA, M.; LIN, Y.; TSAI, R.; CHEN, H.; LIU, Y. A hydrogen peroxidase /polyaniline/carboxy-functionalized multiwalled carbon nanotube modified gold electrode. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 9488-9485, 2011.

- [82] DOUGLAS, E. F.; DRISCOLLI, P. F.; LIU, D. L.; BURNHAM, N. A.; LAMBERT, C. R.; MCGIMPSEY, W. G. Effect of electrode roughness on the capacitive behavior of self-assembled monolayer. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 30, p. 7670-7677, 2008.
- [83] BENDO L. **Estudo da imobilização do receptor tireoidiano humano TR1 em filmes finos nanoestruturados e aplicações em detecção de hormônios tireoidianos**. Dissertação de mestrado – USP, São Carlos, 2010.
- [84] PAVIA, D. J.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Introduction to spectroscopy, 3<sup>o</sup> ed. EUA: Brooks/Cole, 2001.
- [85] BARTH, A.; ZSCHERP, C. What vibrations tell us about proteins. **Quarterly Review of Biophysics**, v. 35, p. 369-430, 2002.
- [86] PARK, B.; KO, K.; YOON, D.; KIM, D. Enzyme activity assay for horseradish peroxidase encapsulated in peptide nanotubes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, p. 81-85, 2012.
- [87] HOLZBAUR, I. E.; ENGLISH, A. M.; ISMAIL, A. A. FTIR study of the thermal denaturation of Horseradish and Cytochrome c Peroxidase in D<sub>2</sub>O<sup>+</sup>. **Biochemistry**, v. 35, p. 5488 – 5494, 1996.
- [88] MOCÁK, J.; BOND, A. M.; MITCHELL, S.; SCOLLARY, G. A. A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques. **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, p. 297-328, 1997.
- [89] LIU., YANG, Y.; WANG, Y. L.; SHEN, G.; YU, R. A hydrogen peroxidase biosensor based on nano-Au/PAMAM dendrimer/cystamine modified gold electrode. **Sensors and Actuators B**, v. 106, p. 394-400, 2005.
- [90] SONG, Y.; WAN, L.; WANG, Y.; ZHAO, S.; HOU, H.; WANG, L. Electron transfer and electrocatalytics of cytochrome c and horseradish peroxidase on DNA modified electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 85, p.29-35, 2012.
- [91] BERNARDI J. C. **Auto-organização no desenvolvimento de sensores, biossensores e modelos de membrana para aplicação em nanomedicina**. Tese de doutorado – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, 2011.
- [92] JADHAV, S. A. Self-assembled monolayers (SAMs) of carboxylic acids: an overview. **Central European Journal of Chemistry**, v. 9, p. 369-378, 2011.
- [93] SMITH, R. K.; LEWIS, P. A.; WEISS, P. S.; Patterning self-assembled monolayers – review. **Progress in Surface Science**, v. 75, p. 1-68, 2004.
- [94] FENG J.; XU G. H.; AN Y.; ZENG X. Construction of the homogeneously mixed SAM composed of octyltriethoxysilane and octadecyltrichlorosilane by taking advantage of the molecular steric restriction. **Colloids and Surfaces A**, Physicochem. Eng. Aspects, v. 316, p. 194–201, 2008.
- [95] COELHO D.; MACHADO S. A. S.; New contribution in the study of phase formation in mixed alkanethiol self-assembled monolayers: a powerful tool for transducers design. **Electrochimica Acta**, v. 542, p. 191-201, 2014.
- [96] LI Y.; LI J.; XIA X. H.; LIU, S. Q. Direct electrochemistry of cytochrome c immobilized on a novel macroporous gold film coated with a self-assembled 11-mercaptopundecanoic acid monolayer. **Talanta**, v. 82, p. 1164-1169, 2010.
- [97] GANESH, V.; PADEY, R. R.; MALHOTRA, B. D.; LAKSHMINARAYANAN, V. Electrochemical characterization of self-assembled monolayers (SAMs) of thiophenol and aminothiophenols on polycrystalline Au: Effects of potential cycling and mixed SAM formation. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 620, p. 87-97, 2008.
- [98] ORAZEN, M.; TRIBOLLET, B. **Electrochemical Impedance Spectroscopy**. Ed: John Wiley & Sons, 2008.

- 
- [99] DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T.; Aplicações de QMC, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, p. 970-979, 2004.
- [100] KISSLING, G. P.; BÜNZLI, C.; FÉRMIN, D. J.; Tuning electrochemical rectification via quantum dot assemblies. **Journal American Chemical Society**, v. 132, p. 16855-16861, 2010.
- [101] GIROTTO, E.; PAOLI, M.; Transporte de massa em polímeros intrinsecamente condutores: Importância, técnicas e modelos teóricos. **Química Nova**, v. 22, p. 358 – 368, 1999.
- [102] RIBAUT, C.; REYBIER, K.; TORBIERO, B.; LAUNAY, J.; VALENTIN, A.; REYNES, O.; FABRE, P. I.; NEPVEU, F. Strategy of red blood cells immobilization onto a gold electrode: Characterization by electrochemical impedance spectroscopy and quartz crystal microbalance. **ITBM-RBM**, v. 29, p. 141–148, 2008.
- [103] MENDES, R. K.; FREIRE, R. S.; FONSECA, C. P.; NEVES, S.; KUBOTA, L. T. Characterization of Self-Assembled Thiols Monolayers on Gold Surface by Electrochemical Impedance Spectroscopy. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 15, p.849-855, 2004.
- [104] KAKIUCHI, N.; IIDA, M.; GON, N.; HOBARA, D.; IMABAYASHI, S.; NIKI, K. Miscibility of adsorbed 1-undecanethiol and 11mercaptoundecanoic acid species in binary self-assembled monolayers on Au (111). **Langmuir**, v. 17, p. 1599-1603, 2001.
- [105] SUN, K.; JIANJ, B.; JIANG, X. Electrochemical desorption of self-assembled monolayers and its application in surface chemistry and cell biology. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 656, p. 223-230, 2011.
- [106] CANCINO J., MACHADO S. A. S. Microelectrode array in mixed alkanethiol self-assembled monolayers: Electrochemical studies. **Electrochimica Acta**, v. 72, p. 108-113, 2012.
- [107] KARPOVICH, D. S.; BLANCHARD, G. J. Direct measurement of the adsorption kinetics of alkanethiols self-assembled monolayers on a microcrystalline gold surface. **Langmuir**, v. 10, p. 3315-3325, 1994.
- [108] CHEN, Y.; YANG, C.; WANG, F. Electrochemical assessment of electrochemical oxidation stability of self-assembled monolayers on gold and preparation of binary self-assembled monolayers on gold. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 3951-3956, 2010.
- [109] BALLAND, V.; LECOMTE, S.; LIMOGES, B.; Characterization of the electron transfer of a ferrocene redox probe and a histine-tagged hemoprotein specifically bound to a nitrilotriacetic-terminated self-assembled monolayer. **Langmuir**, v. 25, n. 11, p. 6532-6542, 2009.
- [110] SULAK, M. T.; ERHAM, E.; KESKINLER, B. Amperometric phenol biosensor based on horseradish peroxidase entrapped PVF and PPY composite film coated GC electrode. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 160, p. 856-867, 2010.
- [111] LI, Y.; ZHANG, H.; CAO, F. Analysis of phenolic compounds catalyzed by immobilized horseradish peroxidase in silica glass. **Journal Sol-Gel. Science and Technology**, v. 58, p. 156-161, 2011.
- [112] SHI, W.; MA, Z. Amperometric glucose biosensor based on a triangular silver nanoprisms/chitosan composite film as immobilization matrix. **Biosensors and Bioelectronics**, v.26, p.1098-1103, 2010.
- [113] JIANG, H.; DU, C.; ZOU, Z.; LI, X.; AKINS, D. L.; YANG, H. An biosensing platform based on horseradish peroxidase immobilized onto chitosan-wrapped single-walled carbon nanotubes. **J. Solid State Electrochem**, v. 13, p. 791-798, 2009.
- [114] ZHOU, K.; ZHU, Y.; YANG, X.; LUO, J.; LI, C.; LUAN, S. A novel hydrogen peroxidase biosensor based on Au-graphene-chitosan biocomposites. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 3055-3060, 2010.
- [115] DI, W.; SHEN, C. P.; PENG, S. H.; TU, Y. F.; LI, S. J. A one step method to construct a third generation biosensor based on horseradish peroxidase and gold nanoparticles embedded in silica sol-gel network on gold modified electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 553, p. 196- 200, 2005.

- 
- [116] ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 66, p. 232-240, 2007.
- [117] ZOU, J.; MA, J.; ZHANG, Y.; HUANG, L.; WAN, Q. A hydroquinone sensor based on a new nanocrystals modified electrode. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 89, p. 259–264, 2014.
- [118] KERGARAVAT, S. V.; PIVIDORIM, I.; che, S. R. Evalution of seven cosubstrates in the quantification of horseradish peroxidase enzyme by square ware voltammetry. **Talanta**, v. 88, p. 468-476, 2012.
- [119] BARANOWSKA, I.; KOPER, M. Electrochemical behavior of propranolol and its major metabolites 4'-hydroxypropranolol and 4'-hydroxypropranol sulfate, on glassy carbon electrode. **Journal Brazillian Chemical Society**, v. 22, p. 1601-1609, 2011.
- [120] WU, H.; HU, J.; LI, H.; LI, H. A novel photo-electrochemical sensor for determination of hydroquinone based on copper hexacyanoferrate and platinum films modified n-silicon electrode. **Sensors and Actuators B**, v. 182, p. 802-808, 2013.
- [121] YANG, S.; CHEN, Z.; JIN, X.; LIN, X. HRP biosensor based on sugar-lectin biospecific intercrctions for the determination of phenolic compounds. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 200-205, 2006.
- [122] FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v.32, p. 1860-1870, 2009.
- [123] ROCO, M. C., International strategy for nanotechnology research and development. **Journal of Nanoparticles Research**, v. 3, p. 353-360, 2001.
- [124] RODUNER, E. Size matters: why nanomaterials are diferente. **Chemical Society Reviews**, v. 35, p. 583–592, 2006.
- [125] TIAN, J.; JIN, J.; ZHENG, F.; ZHAO, H.; Self-assembly of gold nanoparticles and polystyrene: A highly versatile approach to the preparation of colloidal particles with polystyrene cores and gold nanoparticle coronaes. **Langmuir**, v. 26, p. 8762-8768, 2010.
- [126] GAGNER, J. E.; QIAN, X.; LOPEZ, M. M.; DORDICK, J. S.; SIEGEL, R. W. Effect of nanoparticle structure on the conformation and function of adsorbed proteins. **Biomaterial**, v. 33, p. 8503-8516, 2012.
- [127] LI, F.; FENG, Y.; DONG, P.; TANG, B. Gold nanoparticles modified via a mercapto-diazoaminobenzene monolayer and its development in DNA electrochemical biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 2084-2088, 2010.
- [128] ZHUO, Y.; YU, R.; YUAN, R.; CHAI, Y.; HONG, C. Enhancenment of carcinoembryonic antibody immobilization on gold electrode modified by gold nanoparticles and SiO<sub>2</sub>/Thionine nanocomposite. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 628, p. 90-96, 2009.
- [129] LIU, F.-K.; Analysis and applications of nanoparticles in the separation sciences: A case of gold nanoparticles. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 9034-9047, 2009.
- [130] XUE, Z.; WORTHEN, A.; QAJAR, A.; ROBERT, S.; BRYANT, S.; HUH, C.; PRODANOVIC, M.; JOHNSTON, K. P. Viscosity and stability of ultra-high internal phase CO<sub>2</sub>-in-water foams stabilized with surfactants and nanoparticles with or without polyelectrolytes. **Journal of Coloids and Interface Science**, v. 461, p. 383–395, 2016.
- [131] <http://www.olharnano.com/artigos/4001/32001/Estabiliza%C3%A7%C3%A3o-de-nanopart%C3%ADculas:-o-que-%C3%A9-e-qual-sua-finalidade?Acessado> 01/09/2015
- [132] CRESPILO, F. N.; HUGUENIN, F.; ZUCOLOTO, V.; OLIVI, P.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Dendrimers as nanoreactors to produce platinum nanoparticles embedded in Layer-by-layer films for metanol-tolerant cathodes. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 348-352, 2006.

- 
- [133] PENG, Z.; QU, X.; DONG, S. Immobilization of the nanoparticle monolayer onto self-assembled monolayers by combined sterically enhanced hydrophobic and electrophoretic forces. **Langmuir**, v. 20, p. 5-10, 2004.
- [134] ZUBIR, M. N. M.; BADARUDIN, A.; KAZI, S. N.; MISRAN, M.; AMIRI, A.; SADRI, R.; KHALID, S. Experimental investigation on the use of highly charged nanopaticles to improve the stability of weakly charged coloidal system. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 454, p. 245-255.
- [135] FARREN-DAI, M.; AWOONOR-WILLIAMS, E.; MACNEIL, C. S.; MAHIMWALLA, Z.; GANDHI, K. A novel gold nanoparticle stabilization and its muon chemistry. **Chemical Physics Letters**, v. 610-611, p. 331-334, 2014.
- [136] HANG, J.; SHI, L.; FENG, X.; XIAO, L. Electrostatic and electrosteric stabilization of aqueous suspensions of barite nanoparticles. **Powder Technology**, v. 192, p. 166-170, 2009.
- [137] SILVA, P. S.; GASPARINI, B. C.; MAGOSSO, H. A.; SPINELLI, A. Gold nanoparticle hosted in a water-soluble silsesquioxane polymer applied as a catalytic material onto na electrochemical sensor for detection of nitrophenol isomers. **Journal of Hazardous Materials**, v. 273, p. 70-77, 2014.
- [138] SALAVATI-NIASARI, M.; DAVAR, F. Synthesis of copper and copper (I) oxide nanoparticles by thermal decomposition of a new precursor. **Materials Letter**, v. 63, p. 441-443, 2009.
- [139] MAZLOUM-ARKADAKANI, M.; BEITOLLAHI, H.; AMINI, M. K.; MIRKHALAF, F.; ABDOLLAHI-ALIBEIK, M. New strategy for simultaneous and selective voltammetric determination of norepine and folic acid using ZrO<sub>2</sub> nanoparticles-modified carbon paste electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 151, p. 243-349, 2010.
- [140] RAOOF, J. B.; OJANI, R.; HASHEMINIJAD, E. Electrochemical synthesis of Ag nanoparticles supported on glassy carbon electrode y means of p-isopropyl calix[6]rene matrix and its application for electrocatalytic reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Applied surface science**, v. 258, p. 2788-2795, 2012.
- [141] REED, J. A.; COOK, A.; HALAAS, D. J.; PARAZOLLI, P.; ROBINSON, A.; MATULA, T. J.; GRIEZER, F. The effects of microgravity on nanoparticle size distributions generated by the ultrasonic reduction of an aqueous gold-chloride solution. **Ultrason. Sonochem.**, v. 10, p. 285-289, 2003.
- [142] POOJA, D.; PANYARAM, S.; KULHARI, H.; RACHAMLLA, S. S.; SISTLA, R. Xantham gum stabilized gold nanoparticles: Characterization, biocompatibility, stability and cytotoxicity, v. 110, p. 1-9, 2014.
- [143] KIM, S.; TERASHI, Y.; PURWANTO, A.; OKUYAMA, K. Synthesis and film deposition of Ni nanoparticle for base metal electrode applications. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v. 337, p. 96-101, 2009.
- [144] MOGILEVSKY, A.; VOLINSKY, R.; DAYAGI, Y.; MARKOVICH, N.; JELINEK, R. Gold nanoparticle self-assembly in saturated phospholipid monolayers. **Langmuir**, v. 26, p. 7893-7898, 2010.
- [145] CHOW, E.; GENGENBACH, T. R.; WIECZOREK, L.; RAGUSE, B. Detection organics in aqueous solution using gold nanoparticles modified with mixed moolayers of 1-hexanethiol and 4-mercaptophenol. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 143, p. 704-711, 2010.
- [146] ZHOU, J.; RALSTON, J.; SEDEV, R. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 331, p. 251-262, 2009.
- [147] FARIAS, C. B. B.; SILVA, A. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J .M.; SOUZA, J. E. G.; SARUBBO, L. A. Synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactnt produced in low-cost médium as stabilizing agente. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 122-125, 2014.
- [148] MIKHLIN, Y.; KARACHAROV, A.; LIKHATSKI, M.; PODLIPSKAYA, T.; ZUBAVICHUS, Y.; VELIGZHANIN, A.; ZAIKOVSKI, V. Submicrometer intermediates in the citrate synthesis of gold nanoparticles: New insights into the nucleation and crystal growth mechanisms. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, p. 330-336, 2011.

- 
- [149] TURKEVITCH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discuss. Faraday Soc.**, v.11, p. 55-75, 1951.
- [150] BONGOTGETSAKUL, Y. Y. N.; CATTRALL, R. W.; KOLEV, S. D. The preparation of a gold nanoparticle monolayer on the surface of a polymer inclusion membrane using EDTA as the reducing agent. **Journal of Membranes Science**, v. 379, p. 322-329, 2011.
- [151] WELCH, C. H.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: a review. **Analytical and Electroanalytical Chemistry**, v. 384, p. 601-619, 2006.
- [152] ZHOU J. H.; DENG C. Y.; SI S. H.; et al. Zirconia electrodeposited on a self-assembled monolayer on a gold electrode for sensitive determination of parathion. **Microchimica Acta**, v. 172, p. 207-215, 2011.
- [153] CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 241-259, 2010.
- [154] SARGENTELLI, V.; FERREIRA, A. P. Nanopartículas magnéticas: o cobalto. **Eclética Química** [online], v. 35, p. 153-163, 2010.
- [155] XIE, J.; ZHANG, X.; WANG, H.; ZHENG, H.; HUANG, Y. Analytical and environmental applications of nanoparticles as enzyme mimetics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 39, p. 114-129, 2012.
- [156] LOAIZA, O. A.; JUBETE, E.; OCHOTECO, E.; CABANERO, G.; GRANDE, H.; RODRÍGUEZ, J. Gold coated ferric oxide nanoparticles based disposable magnetic genosensors for the detection of DNA hybridization process. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 2194-2200, 2011.
- [157] RAWAL, R.; CHAWLA, S.; PUNDIR, C. S. An electrochemical sulfite biosensor based on gold coated magnetic nanoparticles modified gold electrode. **Biosensor and Bioelectronics**, v. 31, p. 144-150, 2012.
- [158] NIU, X.; CHEN, C.; ZHAO, H.; CHAI, Y.; LAN, M. Novel snowflake-like Pt-Pd bimetallic clusters on screen-printed gold nanofilm electrode for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 36, p. 262-266, 2012.
- [159] MAO, H.; SHEN, Y.; ZHANG, Q.; ULAGANATHAN, M.; ZHAO, S.; YANG, Y.; HNG, H. H. Highly active and stable heterogeneous catalyst based on the entrapment of noble metal nanoparticle in 3D ordered porous carbon. **Carbon**, v. 96, p. 75-82, 2016.
- [160] HAN, M.; LIU, S.; BAO, J.; DAI, Z. Pd nanoparticle assemblies - As the substitute of HRP, in their biosensing applications for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, p. 151-156, 2012.
- [161] FERREIRA, D. C. M.; GIORDANO, G. F.; SOARES, C. C. S. P.; OLIVEIRA, J. F. A.; MENDES, R. K.; PIAZZETTA, M. H.; GOBBI, A. L.; CARDOSO, M. B. Optical paper-based sensor for ascorbic acid quantification using silver nanoparticles. **Talanta**, v. 141, p. 188-194, 2015.
- [162] EVTUGYN, G. A.; SHAMAGSUMOVA, R. V.; PADNYA, P. V.; STOIKOV, I. I.; ANTIPIN, I. S. Cholinesterase sensor based on glassy carbon electrode modified with Ag nanoparticles decorated with macrocyclic ligands. **Talanta**, v. 127, p. 9-17, 2014.
- [163] AHIRWAL, G. K.; MITRA, C. K. Gold nanoparticles based sandwich electrochemical immunosensor. **Biosensor and Bioelectronics**, v. 25, p. 2016-2020, 2010.
- [164] AJNAI, G.; CHIU, A.; KAN, T.; CHENG, C.; TSAI, T. Trends of gold nanoparticle-based drug delivery system in cancer therapy. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 6, p. 172-178, 2014.
- [165] GOSH, P.; HAN, G.; DE, M.; KIM, C. K.; ROTELLO, V. M. Gold nanoparticle in delivery applications. **Advance drug delivery reviews**, v. 60, p. 1307-315, 2008.

- 
- [166] HAN, Y. D.; PARK, Y. M.; CHUN, H. J.; YOON, H. C. A low-cost optical transducer utilizing common electronics components for the gold nanoparticle-based immunosensing application. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 233-242, 2015.
- [167] NIGRA, M. M.; ARSLAN, I.; KATZ, A. Gold nanoparticle-catalyzed reduction in a model system: Quantitative determination of reactive heterogeneity of a supported nanoparticle surface. **Journal of Catalysis**, v. 295 p. 115-121, 2012.
- [168] CASCHERA, D.; FEDERICI, F.; ZANE, D.; FOCANTI, F.; CURULLI, A.; PADELETTI, G. Gold nanoparticles modified GC electrodes: electrochemical behavior dependence of different neurotransmitters and molecules of biological interest on the particle size and shape. **J. Nanopart. Res.**, v. 11, p. 1925-1936, 2009.
- [169] SANZ, V. C.; MENA, M. L.; GONZÁLEZ-CÓRTEZ, A.; YANEZ-EDENO, P.; PINGARRÓN, J. M. Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes: Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 528, p. 1-8, 2005.
- [170] NGUYEN, D. T.; KIM, D.; KIM, K. Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. **Micron**, v. 42, p. 207-227, 2011.
- [171] VENDITTI, I.; PALOCCI, C.; CHRONOPORLOU, L.; FRATODDI, I.; FONTANA, L.; DIOICIAUTI, M.; RUSSO, M. V. Candida rugosa lipase immobilization on hydrophilic charged gold nanoparticles as promising biocatalysts: Activity and stability investigations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 131, p. 93-101, 2015.
- [172] ZHANG, J.; OYAMA, M. Electrocatalytic activity of three-dimensional monolayer of 3-mercaptopropionic acid assembled on gold nanoparticle arrays. **Electrochemistry Communications**, v. 9, p. 459-464, 2007.
- [173] CHICO, B.; CAMACHO, C.; PÉREZ, M.; Polyelectrostatic immobilization of gold nanoparticles-modified peroxidase on alginate-coated gold electrode for mediatorless biosensor construction. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 629, p. 126-132, 2009.
- [174] RAJESH, V. S.; MISHRA, S. K.; BIRADAR, A. M. Synthesis and electrochemical characterization of myoglobin-antibody protein immobilized self-assembled gold nanoparticles on ITO-glass plate. **Materials Chemistry and Physics**, v. 132, p. 22-28, 2012.
- [175] ZHANG, S.; WANG, N.; NIU, Y.; SUN, C. Immobilization of glucose oxidase on gold nanoparticles modified Au electrode for the construction of biosensor. **Sensors and Actuators B**, v. 109, p. 367-374, 2005.
- [176] MELO Jr, M. A.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M. C.; NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, p. 1872-1878, 2012.
- [177] MENEZES, E.; NUNES, M. R.; ARENAS, L. T.; DIAS, S. L. P.; GARCIA, I. T. S.; GUSHIKEM, Y.; COSTA, T. M. H.; BENVENUTTI, E. V. Gold nanoparticle/charged silsesquioxane films immobilized onto Al/SiO<sub>2</sub> surface applied on the electrooxidation of nitrite. **Journal Solid State Electrochem**, v. 163, p. 3703-3713, 2012.
- [178] SANTOS, V.; JESUS, C. G.; SANTOS, M.; CANESTRARO, C. D.; ZUCOLOTTI, V.; FUJIWARA, S. T.; GARCIA, J. R.; PESSOA, C. A.; WOHNATH K. Platinum nanoparticle incorporated in silsesquioxane for use in LbL films for the simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid. **Journal Nanoparticle Research**, v. 14, p. 1081 – 1092, 2012.
- [179] TOMA, H.; BONIFÁCIO, L. S.; ANAISSI, F. J. Da cor à cor inexistente: uma reflexão sobre espectros eletrônicos e efeitos cromáticos. **Química Nova**, v. 28, p. 897-900, 2005.
- [180] LARSON, R.G. The Structure and Rheology of Complex Fluids, Oxford University Press, New York, 1999.
- [181] PAGNO, C. H.; COSTA, T. M. H.; MENEZES, E. W.; BENVENUTTI, E. V.; HERTZ, P. F.; MATTE, C. R.; TOSATI, J. V.; MONTEIRO, A. R.; RIOS, A. O.; FLORES, S. H. Development of active biofilms of qu

---

(Chenopodium quinoa W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of microbial activity. **Food Chemistry**, v. 173, p. 755-762, 2015.

[182] CISZEWSKI, A.; MILCZAREK, G. Functionalized gold nanoparticles and films stabilized by in situ formed poly Eugenol. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 53-57, 2013.

[183] NGO, Y. H.; LI, D.; SIMON, G. P.; GARNIER, G. Gold nanoparticle-paper as a three-dimensional surface enhanced Raman Scattering substrate. **Langmuir**, v. 28, p. 8782-8790, 2012.

[184] RIBEIRO, B. T.; LIMA, J. M.; CURI, N. Cargas superficiais da fração argila de solos influenciadas pela vinhaça e fósforo. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 5-10, 2011.

[185] NUNES, M. R.; GUSHIKENY., LANDERS R., DUPONT J., COSTA T. M. H., BENVENUTTI E. V. Charged silsesquioxane used as a vehicle for gold nanoparticles to perform the synthesis of catalyst xerogels. *Journal of Sol-Gel Sci. Technol.*, v. 63, p. 258-265, 2012.

[186] KOWALEWSKA, A.; FORTUNIAK, W.; HANDKE, B. New hybrid silsesquioxane materials with sterically hindered carbosilane. **Journal of Organometallic chemistry**, v. 694, p. 1345-1353, 2009.

[187] HANDKE, M.; HANDKE, B.; KOWALESWA, A.; JASTRZEBSKI, W. New polysilsesquioxane materials of ladder-like structure. **Journal of molecular structure**, v. 924-926, p. 254-263, 2009.

[188] BENITES, T. A.; RIBEIRO, W. C.; GÓES, M. S.; FERREIRA, A. A. P.; BUENO, P. R. Efeitos da rugosidade superficial, nas propriedades de passivação de monocamadas orgânicas automontadas. **Química Nova**, v. 37, 1533-1537, 2014.

[189] WANG, Y.; LABORDA, E.; CROSSLEY, A.; COMPTON, R. G. Surface oxidation of gold nanoparticles supported on a glassy carbon electrode in sulphuric acid medium: contrasts with the behavior of 'macro' gold. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 15, p. 3133-3136, 2013.

[190] BOURKE, L. D.; NUGENT, P. F. The electrochemistry of gold: The redox behavior of the metal in aqueous media. **Gold Bulletin**, v. 30, p. 43-53, 1997.

[191] SANTOS, C. S.; FERREIRA, R. T.; CALIXTO, C. M. F.; RUFINO, J. L.; GARCIA, J. R.; FUJIWARA, S. T.; WOHNATH, K.; PESSOA, C. A. The influence of organization of LbL films containing a silsesquioxane polymer on the electrochemical response of dopamine. **Journal Applied Electrochemistry**, v. 44, p. 1047-1058, 2014.

[192] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de LEHNINGER**, traduzido por Arnaldo Antonio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi. 3ed. São Paulo: SARVIER ARTMED, 2002.

[193] LIN, J.; ZHANG, L.; ZHANG, S. Amperometric biosensor based on coentrapment of enzyme and mediator by gold nanoparticles on indium-tin oxide electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 370, 180-185, 2007.

[194] MARTIN, M.; SALAZAR, P.; VILLALONGA, R.; CAMPUZANO, S.; PINGARRÓN, J. M.; GONZÁLEZ-MORA, J. L. Preparation of core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@poly(dopamine) magnetic nanoparticles for biosensor construction. **Journal Materials Chemistry B**, v. 2, p. 739-746, 2014.

[195] GONG, Y.; CHEN, X.; LU, Y.; YANG, W. Self-assembled dipeptide-gold nanoparticle hybrid spheres for highly sensitive amperometric hydrogen peroxide biosensors. **Biosensors and bioelectronics**, v. 66, p. 392-398, 2015.

[196] HAN, J.; HUANG, K.; LI, J.; LIU, Y.; YU, M.  $\beta$ -cyclodextrin-cobalt ferrite nanocomposite as enhanced sensing platform for catechol determination. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 96, p. 58-62, 2012.

[197] MA, L.; ZHAO, G. Simultaneous determination of hydroquinone, catechol and resorcinol at graphene doped carbon ionic liquid electrode. **International Journal of Electrochemistry**, p.1-8, 2012.

---

[198] CEVIK, E.; SENEL, M.; BAYKAL, A.; ABASIYANIK, M. F. A novel amperometric phenol biosensor based on immobilized HRP on poly(glycidylmethacrylate)-grafted iron oxide nanoparticles for the determination of phenol derivatives. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 173, p. 396-405, 2012.

[199] AKYILMAZ, E.; KOZGUS, O.; TURKMEN, H.; CETINKAYA, B. A mediated polyphenol oxidase biosensor immobilized of 1,2-diamino benzene. **Bioelectrochemistry**, v. 78, p. 15-140, 2010.