

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

SUELLEN CADORIN FERNANDES

BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA COMPOSTOS
FENÓLICOS USANDO NOVOS MATERIAIS

Florianópolis – SC

2012

SUELLEN CADORIN FERNANDES

BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA COMPOSTOS
FENÓLICOS USANDO NOVOS MATERIAIS

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Iolanda Cruz
Vieira

Florianópolis – SC

2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

Fernandes, Suellen Cadorin
Biossensores eletroquímicos para compostos fenólicos
usando novos materiais [tese] / Suellen Cadorin Fernandes
; orientadora, Iolanda Cruz Vieira - Florianópolis, SC,
2012.
113 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Química. 2. Biossensores. 3. Enzimas. 4. Surfactante.
5. Genipina. I. Vieira, Iolanda Cruz. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

SUELLEN CADORIN FERNANDES

BIOSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA COMPOSTOS
FENÓLICOS USANDO NOVOS MATERIAIS

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

Florianópolis, 10 de Dezembro de 2012.



Prof. Dr. Almir Spinelli
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Iolanda da Cruz Vieira
Orientadora



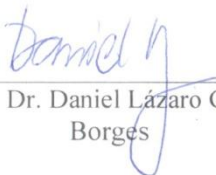
Prof. Dr. Luiz Henrique
Dall'Antonia



Prof.ª Dr.ª Hideko Yamanaka



Prof.ª Dr.ª Ana Cristina Franzoi
Teixeira



Prof. Dr. Daniel Lazaro Gallindo
Borges



Prof. Dr. Luiz Augusto dos
Santos Madureira

Dedico este trabalho aos meus pais, Lauro e Matilde por todo amor e compreensão em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Principalmente a Deus;

À minha família, pelo constante incentivo e suporte, que tornaram possível a chegada até aqui;

Ao meu noivo Luciano pelo seu amor, compreensão e incentivo durante esta jornada;

Em especial, à Prof^a Dr^a Iolanda Cruz Vieira pelo apoio, pelas discussões, conselhos e pelo comprometimento com minha formação pessoal e científica;

Ao Prof. Dr. Faruk Nome e seus alunos Franciane e Bruno pela doação dos surfactantes e contribuição ativa no trabalho em colaboração;

À empresa Novozymes pela doação da enzima lacase;

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a todos os professores do Departamento de Química;

Aos colegas do Laboratório de Biossensores (LaBios) – de ontem e hoje – pelas contribuições a este trabalho e pelos momentos de descontração;

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

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME/UFSC) pelos estudos de microscopia eletrônica;

Ao CNPq pelo suporte financeiro deste trabalho;

A todos que, com seus conhecimentos, incentivos e críticas colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

TRABALHOS DESENVOLVIDOS E PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO (2009-2012)

FERNANDES, S. C.; SANTOS, D. M. P. O.; VIEIRA, I. C. Genipin-cross-linked chitosan as a support for laccase biosensor. **Electroanalysis** 2013, aceito para publicação.

FERNANDES, S. C.; SOUZA, F. D.; SOUZA, B. S.; NOME, F.; VIEIRA, I. C. Gold nanoparticles dispersed in zwitterionic surfactant for peroxidase immobilization in biosensor construction. **Sensors and Actuators B, Chemical** 173, 483-490, 2012.

FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C.; BARBOSA, A. M. J.; FERREIRA, V. S. Methomyl detection by inhibition of laccase using carbon ceramic biosensor. **Electroanalysis** 23, 1623-1630, 2011.

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

FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C.; PERALTA, R. A.; NEVES, A. Development of a biomimetic chitosan film-coated gold electrode for determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid. **Electrochimica Acta** 55, 7152-7157, 2010.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FATIBELLO-FILHO, O.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por spray drying e usadas na construção de biossensores. **Química Nova** 32, 1195-1201, 2009.

MOCCELINI, S. K.; FERNANDES, S. C.; CAMARGO, T. P.; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. Self-assembled monolayer of nickel(II) complex and thiol on gold electrode for the determination of catechin. **Talanta** 78, 1063-1068, 2009.

MAGUERROSKI, K. S.; FERNANDES, S. C.; FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C. Pine nut peroxidase immobilized on chitosan crosslinked with citrate and ionic liquid used in the construction of a biosensor. **Enzyme and Microbial Technology** 44, 400-405, 2009.

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de novos biossensores para determinação de hidroquinona em creme dermatológico e ácido cafeico em erva-mate empregando a técnica de voltametria de onda quadrada.

Inicialmente, um biossensor para hidroquinona foi construído utilizando a enzima peroxidase (PER) obtida do extrato de broto de alfafa (*Medicago sativa*) imobilizada sobre a superfície de um eletrodo de ouro recoberta com surfactante zwitteriônico 3-(1-tetradecilimidazólio-3-il)propano-1-sulfonato (ImS3-14) contendo nanopartículas (NP) de ouro dispersas. Na presença de H_2O_2 , esta enzima catalisa a oxidação da hidroquinona a sua correspondente *o*-quinona, a qual é reduzida eletroquimicamente na superfície do eletrodo a um potencial de +0,09 V vs. Ag/AgCl. Com as condições experimentais otimizadas, o biossensor proposto apresentou uma resposta linear para hidroquinona na faixa de $7,0 \times 10^{-7}$ a $8,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Esse biossensor apresentou excelentes resultados para a repetibilidade, reprodutibilidade, seletividade e estabilidade. Os resultados obtidos na determinação de hidroquinona em produtos dermatológicos com este biossensor estão de acordo com aqueles obtidos com o método espectrofotométrico em um nível de 95% de confiança com valores de recuperação entre 98,3 a 104,5%.

Um segundo biossensor foi desenvolvido utilizando a enzima lacase (LAC) imobilizada em matriz de quitosana previamente reticulada com genipina. O suporte contendo a enzima foi posteriormente incorporado em uma pasta de carbono que apresentou uma resposta linear para ácido cafeico no intervalo de $2,7 \times 10^{-7}$ a $3,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Além disso, a recuperação de ácido cafeico nas amostras de erva-mate variou de 92,8 a 103,1% para os eletrodos desenvolvidos. O método foi aplicado com sucesso na determinação do teor de polifenóis totais em erva-mate sendo que o excelente desempenho do biossensor proposto foi atribuído à efetiva imobilização do lacase no suporte reticulado.

Palavras-Chave: Biossensor, enzima, surfactante, genipina.

ABSTRACT

This paper describes the development of biosensors applied in the determination of hydroquinone in dermatological cream and caffeic acid in mate herb samples employing square-wave voltammetry technique.

Initially, a biosensor for hydroquinone was constructed using peroxidase enzyme obtained from alfalfa sprout extract (*Medicago sativa*) immobilized on a gold electrode using a solution of the zwitterionic surfactant 3-(1-tetradecyl-3-imidazolium)propanesulfonate (ImS3-14) containing well-dispersed gold nanoparticles. In the presence of H_2O_2 , this enzyme catalyzes the oxidation of hydroquinone to its corresponding *o*-quinone, which is electrochemically reduced at a potential of + 0.09 V vs. Ag/AgCl at the electrode surface. Under the optimized experimental conditions, the proposed biosensor showed a linear response for hydroquinone in the range of 7.0×10^{-7} to 8.5×10^{-6} mol L⁻¹, with a detection limit of 2.0×10^{-7} mol L⁻¹. This biosensor showed excellent results for repeatability, reproducibility, stability and selectivity. The results obtained in the determination of hydroquinone in dermatological products with this biosensor are in agreement with those obtained with spectrophotometric method at a 95% confidence level with recovery values between 98.3 to 104.5%.

A second biosensor was developed using laccase enzyme immobilized in the chitosan matrix previously cross-linked with genipin. The support with laccase was subsequently incorporated into a carbon paste electrode which presented a linear response to caffeic acid in the range from 2.7×10^{-7} to 3.3×10^{-5} mol L⁻¹ with a detection limit of 2.0×10^{-7} mol L⁻¹. In addition, recovery of caffeic acid in mate herb samples ranged between 92.8 and 103.1% to the electrodes developed. The method was successfully applied to the determination of the total phenolic content in the mate herb samples and excellent performance of the proposed biosensor was attributed to the effective immobilization of laccase in the cross-linked support.

Keywords: Biosensor, enzyme, surfactant, genipin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema dos componentes que constituem um biossensor	23
Figura 2. Tipos de interações existentes na estrutura da enzima	24
Figura 3. Sítio ativo ferro(III) protoporfirina IX de muitas enzimas peroxidases	27
Figura 4. Representação esquemática do ciclo catalítico da peroxidase	28
Figura 5. Representação simplificada do sítio ativo das lacases (Adaptado de SANTHANAM <i>et al.</i> , 2011)	29
Figura 6. Representação esquemática do ciclo catalítico da lacase. S _{red} : substrato reduzido; S _{oxi} : substrato oxidado	30
Figura 7. Técnicas de imobilização de enzimas mais utilizadas	32
Figura 8. Estrutura química da (A) quitina e (B) quitosana	34
Figura 9. Representação de (A) micela globular, (B) micelas cilíndricas e (C) agregado em forma de bicamada (Adaptado de PILENI, 2003)	38
Figura 10. Representação de uma (A) micela normal e de uma (B) micela reversa	38
Figura 11. Estrutura básica do fenol, flavonóide e ácidos fenólicos	40
Figura 12. Célula eletroquímica contendo biossensor, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar	42
Figura 13. Forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica	43
Figura 14. Forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica	44
Figura 15. Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada. A corrente é medida no final do pulso direto (1) e reverso (2)	45
Figura 16. Voltamogramas de onda quadrada: processos redox de um sistema reversível (1) e de um sistema irreversível (2) (Reproduzido de SOUSA <i>et al.</i> , 2003)	46
Figura 17. Voltamograma cíclico da limpeza eletroquímica do eletrodo de ouro em 0,5 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄ em 100 mV s ⁻¹	54
Figura 18. Estrutura química do surfactante 3-(1-tetradecilimidazólio-3-il)propano-1-sulfonato (ImS3-14)	55
Figura 19. Ilustração esquemática da construção do	

biossensor de peroxidase de broto de alfafa imobilizada na surfactante ImS3-14 contendo nanopartículas de ouro	55
Figura 20. Ilustração esquemática da construção do biossensor de lacase imobilizada em quitosana reticulada com genipina	58
Figura 21. Gráfico de absorvância vs. tempo para determinação da atividade enzimática da peroxidase	60
Figura 22. (A) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das NP de ouro em ImS3-14 observadas em 100 kV e uma ampliação de 600 K e (B) a distribuição de tamanhos das NP preparadas	61
Figura 23. Imagens de microscopia eletrônica de varredura do (A) eletrodo de ouro e do (B) eletrodo de ouro com ImS3-14 contendo NPs de Au em 10 kV	62
Figura 24. Medidas de impedância eletroquímica para eletrodo de (■) Au, (●) ImS3-14/Au, (▲) (NP Au)ImS3-14/Au, (▼) PER/ImS3-14/Au e (◆) PER/(NP Au)ImS3-14/Au em KCl (0,1 mol L ⁻¹) contendo ferricianeto de potássio (1,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹). Potencial aplicado: 0,01 V; faixa de frequência: 1,0 a 0,1 Hz MHz	63
Figura 25. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando os sensores (a) Au, (b) ImS3-14/Au, (c) (NP Au)ImS3-14/Au e (d) PER/(NP Au)ImS3-14/Au em 5,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de solução de hidroquinona e 7,4x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de solução de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0). Inserido: valores de resposta relativa para as correntes de pico	64
Figura 26. Representação esquemática da oxidação/redução da hidroquinona na superfície do biossensor	65
Figura 27. Estudo da concentração de enzima utilizando solução contendo 5,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de hidroquinona e 7,4x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de soluções de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0)	66
Figura 28. Efeito do pH (6,0 a 7,5) sobre a resposta do biossensor em solução de hidroquinona 5,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ e 7,4x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de soluções de peróxido de hidrogênio	67
Figura 29. Efeito da concentração do peróxido de hidrogênio sobre a resposta do biossensor utilizando solução contendo 5,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de hidroquinona em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0)	68
Figura 30. Efeito da (a) frequência, (b) amplitude de pulso e	

(c) incremento com $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de hidroquinona e $7,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato pH 7,0 (0,1 mol L⁻¹) 69

Figura 31. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o biossensor proposto em (a) solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,0) e soluções de hidroquinona, nas seguintes concentrações: (b) $7,0 \times 10^{-7}$, (c) $2,0 \times 10^{-6}$, (d) $3,4 \times 10^{-6}$, (e) $4,7 \times 10^{-6}$, (f) $6,1 \times 10^{-6}$, (g) $7,3 \times 10^{-6}$, (h) $8,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ com uma frequência de 100 Hz, amplitude do impulso 60 mV e incremento de varredura 4 mV. (B) Curva de calibração da hidroquinona 71

Figura 32. Determinação da atividade enzimática da lacase pelo método espectrofotométrico 77

Figura 33. Esquema proposto para reticulação da quitosana com genipina 78

Figura 34. Fotografias da quitosana (a) antes e (b) após a reação de reticulação com a genipina 79

Figura 35. Infravermelho da (a) quitosana e (b) quitosana reticulada com genipina no intervalo de números de onda de 4000 - 410 cm⁻¹. 80

Figura 36. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando (a) EPC, (b) LAC-biossensor, (c) LAC-QTS-biossensor e (d) LAC-QTS/GNP-biossensor obtidos em solução contendo $3,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de ácido cafeico em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 3,5) em frequência de 100 Hz; amplitude de 50 mV e incremento de 4,0 mV. Inserido: respostas relativas de corrente para cada eletrodo. 84

Figura 37. Influência do pH no (a) potencial e no (b) pico de corrente resultante do biossensor proposto em solução tampão acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 3,0 - 6,0) contendo ácido cafeico $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ utilizando frequência de 50 Hz, amplitude de pulso de 50 mV e incremento de 5 mV 85

Figura 38. Estudo da concentração de enzima utilizando solução contendo ácido cafeico $2,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 3,5) 86

Figura 39. Estudo dos parâmetros de (a) frequência, (b) amplitude de pulso e (c) incremento sobre a resposta analítica do biossensor 87

Figura 40. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o biossensor proposto em (a) solução tampão acetato (0,1 mol L⁻¹, pH 3,5) e contendo soluções padrão de

ácido cafeico nas seguintes concentrações: (b) $2,7 \times 10^{-6}$, (c) $3,2 \times 10^{-6}$, (d) $7,2 \times 10^{-6}$, (e) $1,1 \times 10^{-5}$, (f) $1,4 \times 10^{-5}$, (g) $1,8 \times 10^{-5}$, (h) $2,1 \times 10^{-5}$, (i) $2,3 \times 10^{-5}$, (j) $2,6 \times 10^{-6}$, (k) $2,8 \times 10^{-5}$ (l) $3,1 \times 10^{-5}$ e (m) $3,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com frequência de 100 Hz, amplitude de pulso de 50 mV e incremento de 4 mV. (B) Curva de calibração para o ácido cafeico

89

Figura 41. Correlação entre a estimativa do TPT em erva-mate usando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu e o biossensor proposto

93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos surfactantes	26
Tabela 2. Tipo de reação catalisada pelas diferentes classes de enzimas de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular – IUBMB	37
Tabela 3. Parâmetros de otimização do biossensor proposto	70
Tabela 4. Resultados para recuperação da solução padrão de hidroquinona em formulação farmacêutica usando o biossensor proposto	72
Tabela 5. Determinação de hidroquinona em formulações farmacêuticas usando método padrão e o biossensor proposto	73
Tabela 6. Biossensores e eletrodos modificados para determinação de hidroquinona	75
Tabela 7. Resposta relativa do biossensor de lacase imobilizada em quitosana reticulada com genipina para diferentes compostos fenólicos	82
Tabela 8. Parâmetros de otimização do biossensor proposto	88
Tabela 9. Resultados para recuperação da solução padrão de ácido cafeico e estimativa do teor de polifenóis totais em amostras de erva-mate usando o biossensor proposto	91
Tabela 10. Resultados da estimativa do TPT em amostras de erva-mate usando o biossensor proposto e o método espectrofotométrico	92
Tabela 11. Biossensores e eletrodos modificados para determinação de ácido cafeico	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorvância
$\Delta\text{Abs t}^{-1}$	Varição da absorvância com o tempo
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio)
CMC	Concentração micelar crítica
E	Potencial
EC	Enzyme Commission
ΔE_p	Varição de separação entre os picos anódico e catódico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
EPC	Eletrodo(s) de pasta carbono
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica (Electron Paramagnetic Resonance)
Er	Erro relativo
E_s	Altura do degrau
ΔE_s	Amplitude do pulso de potencial
FD	Fator de diluição
GNP	Genipina
HRP	Peroxidase de raiz forte (Horseradish peroxidase)
Δi	Corrente resultante
ImS3-14	3-(1-tetradecil-imidazólio-3-il)propano-1-sulfonato
i_{pa}	Corrente de pico anódico
i_{pc}	Corrente de pico catódico
LAC	Lacase
mL	Mililitros

NP	Nanopartículas
PER	Peroxidase
QTS	Quitosana
SEM	Microscopia eletrônica de varredura (Scanning Electron Microscopy)
S_{oxi}	Substrato oxidado
S_{red}	Substrato reduzido
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão (Transmission Electron Microscopy)
TPT	Teor de polifenóis totais
UV	Região do espectro eletromagnético do ultravioleta
UV-vis	Região do espectro eletromagnético do ultravioleta ao visível
V	Volts
<i>vs.</i>	Versus
w_0	Moléculas de água por moléculas de surfactante
Å	Angstrom
μL	Microlitros
τ	Duração dos pulsos

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1. ELETRODOS MODIFICADOS	21
1.2. BIOSSENSORES	22
1.3. ENZIMAS	23
1.3.1. Peroxidase	26
1.3.2. Lacase	28
1.4. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	30
1.4.1. Quitosana	33
1.5. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	35
1.6. SURFACTANTES	36
1.7. COMPOSTOS FENÓLICOS	39
1.8. MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS	41
1.8.1. Voltametria Cíclica	42
1.8.2. Voltametria de Onda Quadrada	44
2. JUSTIFICATIVA	47
3. OBJETIVOS	48
3.1. OBJETIVO GERAL	48
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
3.2.1. Biossensor de Peroxidase Contendo Nanopartículas de Ouro Dispersas em Surfactante Zwitteriônico	48
3.2.2. Biossensor de Laccase Imobilizada em Quitosana Previamente Reticulada Com Genipina	48
4. PARTE EXPERIMENTAL	50
4.1. REAGENTES E SOLUÇÕES	50
4.2. INSTRUMENTAÇÃO	52
4.3. METODOLOGIA	53
4.3.1. Biossensor de Peroxidase Contendo Nanopartículas de Ouro Dispersas em Surfactante Zwitteriônico	53
<i>4.3.1.1. Obtenção e Determinação da PER de Vegetal</i>	53
<i>4.3.1.2. Pré-tratamento da Superfície do Ouro</i>	54
<i>4.3.1.3. Preparação das Amostras e Determinação de Hidroquinona</i>	55
4.3.2. Biossensor de Lacase Imobilizada em Quitosana Previamente Reticulada Com Genipina	56
<i>4.3.2.1. Obtenção e Determinação da LAC</i>	56

4.3.2.2. Reticulação da QTS com GNP	57
4.3.2.3. Imobilização da enzima LAC	57
4.3.2.4. Construção do Biossensor	57
4.3.2.5. Preparação e Análise das Amostras de Erva-mate	58
4.3.2.6. Medidas Eletroquímicas	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1. BIOSSENSOR DE PEROXIDASE CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE OURO DISPERSAS EM SURFACTANTE ZWITERIÔNICO	60
5.1.1. Estudo da Atividade Enzimática da PER	60
5.1.2. Análises das NPs e Superfície do Eletrodo de Ouro Modificado	61
5.1.3. Caracterização Eletroquímica por Impedância	62
5.1.4. Processo Enzimático na Superfície do Eletrodo	63
5.1.5. Otimização do Método	65
5.1.5.1. Concentração de Enzima	65
5.1.5.2. Efeito do pH	66
5.1.5.3. Concentração de Peróxido de Hidrogênio	67
5.1.5.4. Parâmetros de Voltametria de Onda Quadrada	68
5.1.6. Curva de Calibração da Hidroquinona	70
5.1.7. Repetibilidade, Reprodutibilidade e Estabilidade do Biossensor	71
5.1.8. Estudo de Interferentes	72
5.1.9. Estudo de Recuperação e Determinação de Hidroquinona	72
5.2. BIOSSENSOR DE LACASE IMOBILIZADA EM QUITOSANA PREVIAMENTE RETICULADA COM GENIPINA	77
5.2.1. Estudo da Atividade Enzimática da LAC	77
5.2.2. Reticulação da QTS com GNP e Imobilização da LAC	77
5.2.3. Resposta aos Compostos Fenólicos	80
5.2.4. Resposta Analítica do Ácido Cafeico Usando Diferentes Sensores	83
5.2.5. Otimização do Método	84
5.2.5.1. Efeito do pH	84
5.2.5.2. Concentração de Enzima	86
5.2.5.3. Parâmetros da Voltametria de Onda Quadrada	86

5.2.6. Curva de Calibração do Ácido Cafeico	88
5.2.7. Repetibilidade, Reprodutibilidade e Estabilidade do Biossensor	89
5.2.8. Estudo de Interferentes	90
5.2.9. Estudo de Recuperação e Determinação do TPT	90
6. CONCLUSÃO	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. ELETRODOS MODIFICADOS

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade, seletividade e reatividade, novos materiais vêm sendo empregados na construção de sensores e biossensores, possibilitando o desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas com excelentes desempenhos (SOUZA, 1997; KUTNER *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 2002). Os primeiros trabalhos envolvendo eletrodos modificados surgiram no início da década de 70, onde até então só eram utilizados materiais ditos “inertes”, tais como carbono, ouro, platina e mercúrio (SOUZA, 1997; NASCIMENTO e ANGNES, 1998).

Esta modificação na superfície do eletrodo pode ser realizada por diferentes técnicas: adsorção física, formação de monocamadas auto-organizadas, eletropolimerização, reações químicas, recobrimento com membranas poliméricas, formação de compósitos, entre outras (PEREIRA *et al.*, 2002; BARROSO *et al.*, 2011).

O recobrimento da superfície do eletrodo com uma membrana polimérica atua de modo a suprimir os elementos de interferência, que possa, com base na carga e/ou tamanho, bloquear o acesso do interferente e ser permeável à espécie de interesse. Filmes de acetato de celulose, nafion, polipirrol, polianilina ou quitosana são utilizados para este fim (SOUZA, 1997; PEREIRA *et al.*, 2002).

A incorporação de compostos biológicos ativos pode levar a um aumento considerável na seletividade de sensores, muito úteis em aplicações analíticas devido à possibilidade de se combinar a seletividade e a sensibilidade da enzima com a simplicidade dos transdutores eletroquímicos. A etapa fundamental no desenvolvimento de um biossensor é a imobilização das enzimas ou proteínas sobre a superfície do eletrodo no intuito de melhorar a estabilidade química destes materiais responsáveis pelo reconhecimento (SOUZA, 1997; PEREIRA *et al.*, 2002).

Com o avanço da tecnologia, tem surgido um número expressivo de publicações sobre o desenvolvimento de novos sensores empregando os mais diversos tipos de materiais, principalmente na escala nanométrica, visando a aplicação em várias áreas para se obter melhorias significativas na sensibilidade eletroquímica, estabilidade de biomoléculas e no desempenho em geral (SOUZA, 1997; PEREIRA *et al.*, 2002). A integração destas tecnologias trazem uma significativa

contribuição para biossensores, devido ao fato de possibilitar o estudo de suas interações com espécies biológicas, tais como células, anticorpos, DNA, enzimas e outras proteínas (LI *et al.*, 2008; SADIK *et al.*, 2010).

1.2. BIOSENSORES

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem representado um campo de rápida expansão desde 1962, quando Leland C. Clark Jr. e Champ Lyons desenvolveram o primeiro biossensor amperométrico contendo a enzima glicose oxidase fisicamente imobilizada em uma membrana de celulose acoplada a um eletrodo de oxigênio. Este crescimento se deve principalmente à necessidade de testes analíticos simples, rápidos e de baixo custo para a determinação de importantes compostos químicos e biológicos em concentrações muito baixas (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; ALFAYA e KUBOTA, 2002; GRIESHABER *et al.*, 2008).

Os biossensores combinam a alta especificidade dos processos de reconhecimento biológico como enzimas, anticorpos, oligonucleotídeos, materiais biomiméticos (biorreceptores sintéticos), entre outros, com a sensibilidade de transdutores eletroquímicos como é mostrado esquematicamente na Figura 1 (VELASCO-GARCÍA e MOTTRAM, 2003; RONKAINEN *et al.*, 2010). O elemento biológico tem a propriedade de reconhecer seletivamente e interagir com o analito resultando em uma mudança de uma ou mais propriedades físico-químicas que são detectadas e podem ser medidas pelo transdutor (CAMPÀS *et al.*, 2008). Dentre os transdutores utilizados destacam-se os eletroquímicos (transferência de elétrons, movimento de íons, difusão de espécies eletroativas), calorimétricos (variação de temperatura), ópticos (mudança na absorção ou emissão da radiação eletromagnética) e piezelétricos (mudança de massa ou a viscosidade da solução) (GRIESHABER *et al.*, 2008).

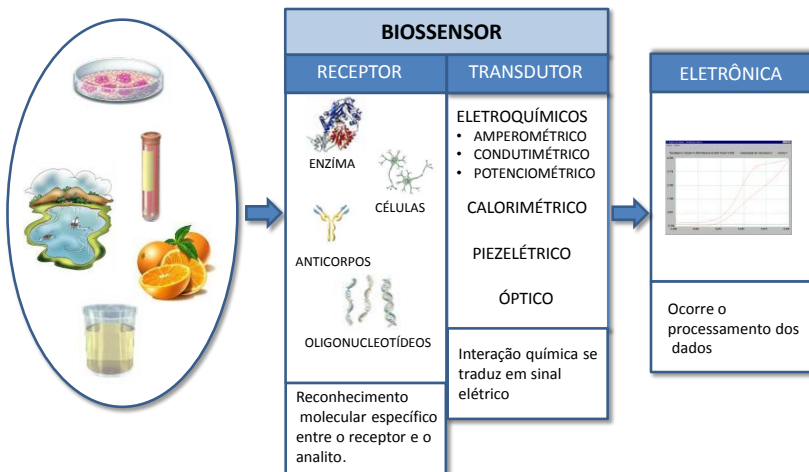


Figura 1. Esquema dos componentes que constituem um biossensor.

Os biossensores enzimáticos associam a seletividade e sensibilidade da enzima à simplicidade dos transdutores eletroquímicos para monitorar uma vasta gama de substratos importantes, principalmente utilizando enzimas oxidorreduzases (por exemplo, a tirosinase, a peroxidase e a lacase) (FARRÉ *et al.*, 2009).

Eles são ferramentas promissoras para auxiliar técnicas já existentes, devido as suas características intrínsecas como simplicidade, economia, resposta rápida, possibilidade de miniaturização/automação, redução de procedimentos de pré-tratamento da amostra e construção de dispositivos simples para rápido monitoramento (FREIRE *et al.*, 2002; GOMES e REBELO, 2003).

Com o objetivo de obter uma maior sensibilidade, seletividade e estabilidade, novas metodologias para modificação de biossensores tem sido investigadas tanto para o emprego de novos materiais na construção de sensores eletroquímicos quanto na busca por procedimentos mais eficientes para a imobilização do material biológico.

1.3. ENZIMAS

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalítico (ribozimas), todas as enzimas são proteínas. As proteínas são moléculas compostas por aminoácidos unidas por ligações peptídicas. A

região da enzima que está diretamente envolvida no processo catalítico é chamada de sítio ativo onde se encontram resíduos de aminoácidos que participam diretamente da quebra e formação de ligações. Este sítio ativo é constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia da proteína (apoenzima) sendo que algumas enzimas dependem também de cofatores (componentes químicos adicionais de origem não-protéica) para exercer sua atividade, como íons metálicos (ex.: Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) ou moléculas orgânicas complexas denominadas coenzimas (ex.: riboflavina, tiamina, biotina). A molécula toda (cofatores e apoenzima) recebe o nome de holoenzima (VOET e VOET, 1995; LEHNINGER *et al.*, 2006).

Para grandes macromoléculas, como as enzimas, a estrutura tridimensional é formada por dobramentos em suas cadeias polipeptídicas que são sustentadas por interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ligações dissulfeto (Figura 2) o que lhes confere uma forma característica e única (CAMPBELL, 2000; LEHNINGER *et al.*, 2006).

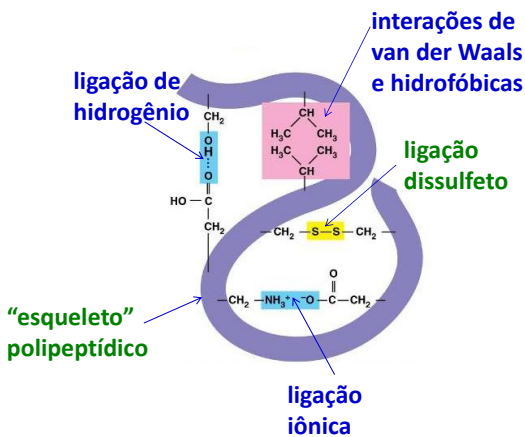


Figura 2. Tipos de interações existentes na estrutura da enzima.

A atividade catalítica, bem como sua estabilidade e especificidade depende da sua integridade conformacional. Condições ambientais tais como pH, temperatura e força iônica do meio podem gerar sua desnaturação (perda da conformação protéica nativa), tornando-a inativa (VOET e VOET, 1995; MIKKELSEN e CORTÓN, 2004).

As enzimas são responsáveis por reconhecer e converter uma substância específica (substrato) em outra (produto) com uma velocidade de até 10^{14} vezes mais rápida comparada às reações não enzimáticas (GILBERT, 2000; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Em 1958, Daniel E. Koshland Jr. propôs um modelo para explicar a especificidade enzimática chamado de encaixe induzido. Para que ocorra a catálise, uma substância deve possuir grupos químicos capazes de se ligar aos grupos dos aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima. Uma vez que as enzimas exibem estruturas flexíveis, as cadeias laterais dos aminoácidos que formam o sítio ativo sofrem uma reorientação moldando-se à molécula do substrato durante o estado de transição até que o substrato esteja completamente ligado sendo definido neste momento a sua conformação final (VOET e VOET, 1995; MIKKELSEN e CORTÓN, 2004).

As enzimas são classificadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (VOET e VOET, 1995; LEHNINGER *et al.*, 2006) em seis grandes grupos de acordo com o tipo de reações que catalisam (Tabela 1) e sua identificação é feita através do seu número EC (Enzyme Commission).

Tabela 1. Tipo de reação catalisada pelas diferentes classes de enzimas de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular – IUBMB

Classe enzimática	Tipo de reação	Exemplo
Oxidoredutases	Realizam reações de oxidorredução	Peroxidase (EC 1.11.1.7)
Transferases	Transferência de grupos funcionais entre moléculas	Transaldolase (EC 2.2.1.2)
Hidrolases	Hidrólise de ligações covalentes	Lipase (EC 3.1.1.3)
Liases	Adição ou remoção de grupos e duplas ligações	Carbonato Desidratase (EC 4.2.1.1)
Isomerases	Isomerismos ópticos e geométricos	Maleato isomerase (EC 5.2.1.1)
Ligases	Junção de duas moléculas com ruptura na ligação pirofosfato	Piruvato Carboxilase (EC 6.4.1.1)

1.3.1. Peroxidase

A peroxidase (PER) (E.C. 1.11.1.7) é uma enzima que pertence à classe das oxidoredutases responsáveis pelas reações de oxidação de uma variedade de substratos, tais como: monofenóis, difenóis, polifenóis e aminofenóis, na presença de peróxido de hidrogênio. Esta enzima consegue manter uma resposta estável por longos períodos de tempo a temperatura ambiente e em um amplo intervalo de pH. As PER são

extensivamente distribuídas no reino animal e vegetal, fungos e microorganismos, sendo que a PER extraída da raiz forte (Horseradish peroxidase – HRP) é a mais estudada e de maior importância comercial. No entanto, o uso de extrato bruto, tecido ou fibra de diversos vegetais vem sendo utilizados como fonte enzimática pela simplicidade, estabilidade e baixo custo quando comparados com a enzima isolada da HRP (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002; MACIEL *et al.*, 2007; ZAKHAROVA *et al.*, 2011).

Algumas PER possuem em seu sítio ativo um grupo heme (ferro(III) protoporfirina IX) como grupo prostético (ULIANA *et al.*, 2008) como pode ser visto na Figura 3.

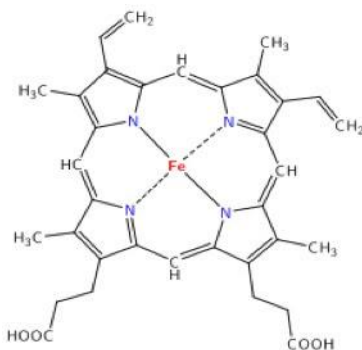


Figura 3. Sítio ativo ferro(III) protoporfirina IX de muitas enzimas peroxidases.

Seu ciclo catalítico ocorre simplificadamente em três etapas como pode ser visto na Figura 4. Na primeira etapa (a) ocorre a oxidação do grupo prostético Fe^{3+} da enzima nativa com a transferência de dois elétrons do peróxido de hidrogênio, gerando o composto I, que consiste no composto intermediário ferro oxiferril ($Fe^{4+}=O$) e do cátion radical π porfirínico. A segunda etapa consiste na oxidação de uma molécula do substrato (S_{red}) pela transferência de um elétron com consequente formação do substrato oxidado (S_{oxi}) para gerar o composto II ($Fe^{4+}=O$). Na última etapa, um elétron adicional pode ser transferido, proveniente de uma segunda molécula do substrato, de forma que a enzima retorne ao seu estado nativo (Fe^{3+}) (FATIBELLO-FILHO *et al.*, 2007; ULIANA *et al.*, 2008; KARIM e FAKHRUDDINET, 2012).

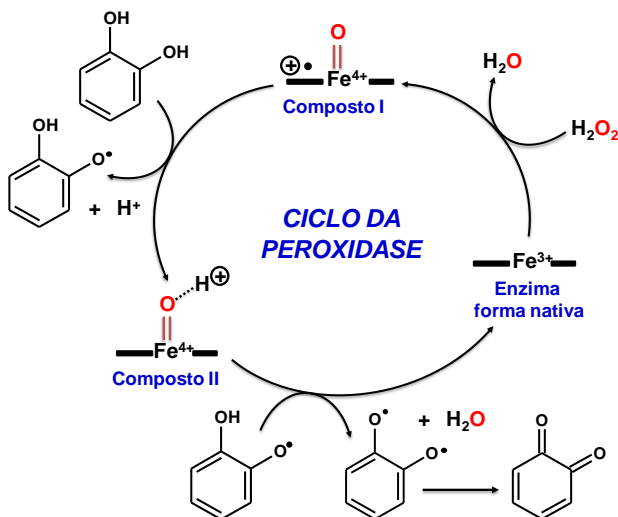


Figura 4. Representação esquemática do ciclo catalítico da peroxidase.

1.3.2. Lacase

A lacase (LAC) (EC 1.10.3.2) foi descrita pela primeira vez por Yoshida em 1883, e caracterizada como uma cobre oxidase por Bertrand em 1985. Ela pertence a um grande grupo de enzimas “multicobre” que catalisam a oxidação de *orto*- e *para*-difenois, aminofenois, polifenois, poliaminas e aril diaminas assim como alguns íons inorgânicos com a redução simultânea de oxigênio molecular à água (MAYER e STAPLES, 2002; PISCITELLI, *et al.*, 2011; FERNANDES, *et al.*, 2013). A LAC encontra-se amplamente distribuída em fungos, embora também esteja presente em plantas superiores, insetos e bactérias em ocorrência mais limitada (DURÁN *et al.*, 2002; POLAK e JAROSZ-WILKOLAZKA, 2012).

A LAC é constituída por quatro átomos de cobre de três diferentes tipos que desempenham um importante papel nos mecanismos catalíticos. Estes átomos são classificados em três tipos (um em cada sítio Tipo 1 e Tipo 2, e dois no sítio Tipo 3) e são caracterizados pela distribuição espectral no UV-Vis e características de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) (Figura 5). O sítio Tipo 1

(sítio mononuclear) é onde acontece a primeira oxidação do substrato. Este sítio possui uma banda de absorção em 600 nm responsável pela cor azul da LAC em solução aquosa. O cobre Tipo 2 possui absorção fraca na região do visível mas é ativa no EPR. Já o cobre Tipo 3 é descrito por apresentar absorção próximo de 300 nm (DURÁN *et al.*, 2002; RIVA, 2006).

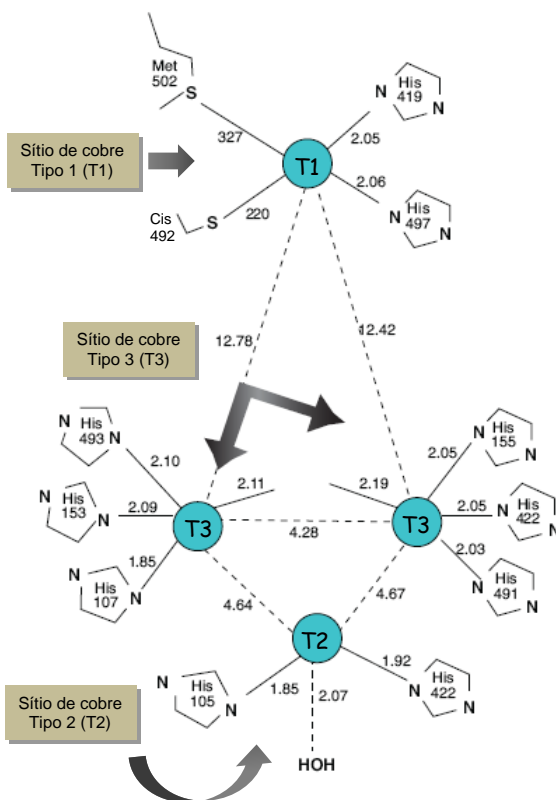


Figura 5. Representação simplificada do sítio ativo das lacases (Adaptado de SANTHANAM *et al.*, 2011).

O ciclo catalítico da LAC envolve sucessivas transferências de elétrons entre os átomos de cobre que formam o núcleo catalítico da enzima, como esquematizado na Figura 6. A LAC nativa, formada por quatro átomos de cobre com estado de oxidação 2+ promove a oxidação

dos compostos fenólicos até redução de todos os seus átomos de cobre (representada como LAC reduzida). Posteriormente, os átomos de cobre reduzidos sofrem reoxidação, liberando duas moléculas de água a partir da redução de uma molécula de oxigênio molecular (SANTHANAM *et al.*, 2011; RIVA, 2006; POLAK e JAROSZ-WILKOLAZKA *et al.*, 2012).

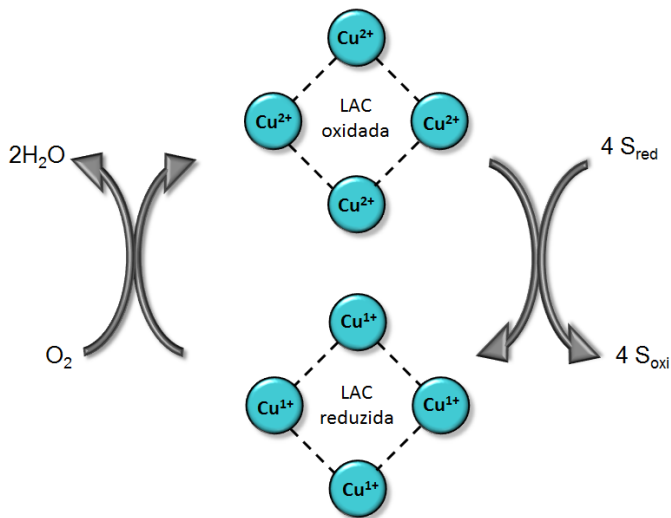


Figura 6. Representação esquemática do ciclo catalítico da lacase. S_{red}: substrato reduzido; S_{oxi}: substrato oxidado.

Com a vantagem de adaptação e versatilidade bioquímica, esta enzima possui diversas aplicações industriais, incluindo bioremediação de águas e solos contaminados, clarificação de vinho, produção de etanol, aplicações nas indústrias de papel, tecidos, alimentos e cosméticos, construção de biossensores, entre outras (MAYER e STAPLES, 2002; COUTO e HERRERA, 2006; TORTOLINI, 2010).

1.4. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

As enzimas apresentam um curto tempo de vida operacional quando são isoladas dos seus ambientes naturais limitando sua aplicação na indústria e na pesquisa científica. Desta forma, ao imitar o modo natural de ocorrência em células vivas, onde as enzimas, na maioria dos

casos, estão ligadas a membranas celulares, o sistema estabiliza a estrutura enzimática, portanto, suas atividades e as preserva para que não ocorra a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos. Assim, em relação às enzimas livres em solução, enzimas imobilizadas são mais robustas e mais resistentes às mudanças do ambiente (KRAJEWSKA, 2004; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2013).

A imobilização de enzimas consiste em confinar ou ligar uma biomolécula em um determinado suporte, retendo sua estrutura tridimensional para manter sua atividade catalítica. Esta técnica é utilizada para aumentar a estabilidade operacional e também permite o uso contínuo do biocatalisador (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

As características necessárias para imobilização de enzimas são dependentes tanto das suas propriedades como das propriedades de seu material de suporte, podendo melhorar significativamente o desempenho do sistema de imobilização (KRAJEWSKA, 2004; WANG *et al.*, 2009). Uma variedade de materiais tem sido utilizadas para imobilização de enzimas como, alginato (DURÁN *et al.*, 2002; DING *et al.*, 2008), celulose (DURÁN *et al.*, 2002; REN *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2009), ciclodextrina (ZHU *et al.*, 2000; OZMEN *et al.*, 2009; FRANZOI *et al.*, 2010), quitina (DURÁN *et al.*, 2002; KRAJEWSKA, 2004; FERNANDES *et al.*, 2007), quitosana (DURÁN *et al.*, 2002; KRAJEWSKA, 2004; OLIVEIRA e VIEIRA, 2006; FERNANDES *et al.*, 2008; MOCCELINI *et al.*, 2008; DIACONU *et al.*, 2010; de LIMA *et al.*, 2010) entre outros.

Diversas técnicas de imobilização do material biológico têm sido desenvolvidas para fornecer estabilidade térmica e operacional para enzimas facilitando sua recuperação e reutilização (Figura 7). Basicamente, três métodos tradicionais de imobilização de enzimas podem ser distinguidos: confinamento em géis ou em membranas poliméricas (aprisionamento ou encapsulamento), ligação da enzima em uma matriz insolúvel (adsorção) e por ligação covalente através do uso de um reagente multifuncional (ligação cruzada entre a enzima e o suporte).

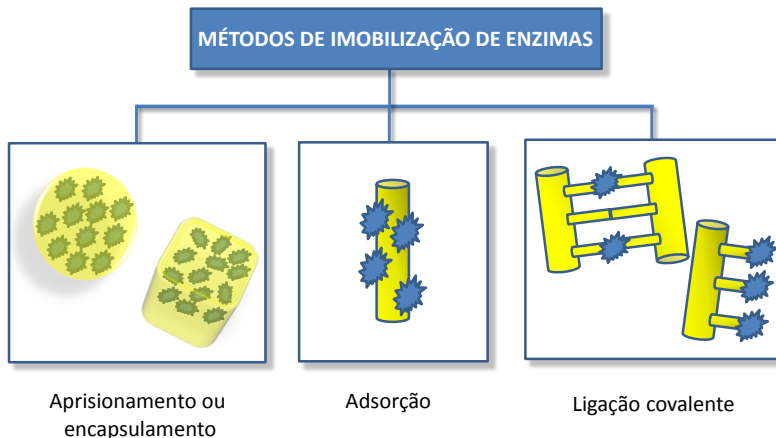


Figura 7. Técnicas de imobilização de enzimas mais utilizadas.

A adsorção da enzima em um suporte sólido é a forma mais fácil de execução e o mais antigo protocolo de imobilização. Desta forma a enzima é imobilizada num suporte sólido por interações de van der Waals, ligações de hidrogênio ou iônicas (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MIKKELSEN E CORTÓN, 2004; MATEO *et al.*, 2007).

Aprisionamento através da oclusão de uma enzima em uma rede polimérica como um polímero orgânico ou sílica sol-gel, consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. Neste sistema é criada uma membrana seletiva que impede a difusão das enzimas através da membrana polimérica, enquanto que moléculas de baixa massa molar (substratos e produtos) difundem-se facilmente. A vantagem desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero, evitando, assim, a desnaturação. Porém, o método possui como fator limitante a diminuição da velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana porosa (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007; MIKKELSEN E CORTÓN, 2004).

A imobilização da enzima por ligação covalente ocorre entre os grupos funcionais não ativos da enzima (não essenciais para sua atividade catalítica) e/ou as moléculas do suporte com reagentes funcionais (MIKKELSEN E CORTÓN, 2004; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007; GONSALVES *et al.*, 2011).

A PER vem sendo imobilizada por diferentes métodos para a construção de biossensores. Para a adsorção dessa enzima foram utilizados materiais como nanotubos de argilominerais em eletrodos de pasta de carbono (OLIVEIRA *et al.*, 2012; BRONDANI *et al.*, 2012) e nanotubos de carbono de parede simples sobre a superfície de um eletrodo de ouro (WANG *et al.*, 2012). Compósitos formados por um polímero contendo a enzima peroxidase em sinergismo com outros materiais são reportados na literatura. Compósitos de nanopartículas de ouro e dióxido de cério em quitosana (ZHANG *et al.*, 2012A), óxido de grafeno em nafion (ZHANG *et al.*, 2012B), cobre nanoporoso em nafion (QIU *et al.*, 2010) e grafeno em nafion (LI *et al.*, 2011) ajudam a fixar a enzima e o catalisador sobre a superfície dos eletrodos e criam uma membrana seletiva.

1.4.1. Quitosana

A quitosana (QTS) é um biopolímero preparado a partir da reação de desacetilação em hidrólise básica da quitina, um dos polissacarídeos naturais mais abundantes encontrado na natureza depois da celulose, e é extraída principalmente de animais marinhos (caranguejo, camarão, lagosta), insetos, e alguns fungos.

Quimicamente, a quitina é constituída predominantemente por uma cadeia linear com unidades $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (Figura 8A). Após a desacetilação para formar a quitosana, converte parcialmente os grupos acetamidas (-NHCOCH₃) em grupos aminos (-NH₂) ao longo da cadeia polimérica formando assim uma cadeia linear com unidades estruturais de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose sempre em maior proporção (Figura 8B) (KRAJEWSKA, 2004; MENDES *et al.*, 2011).

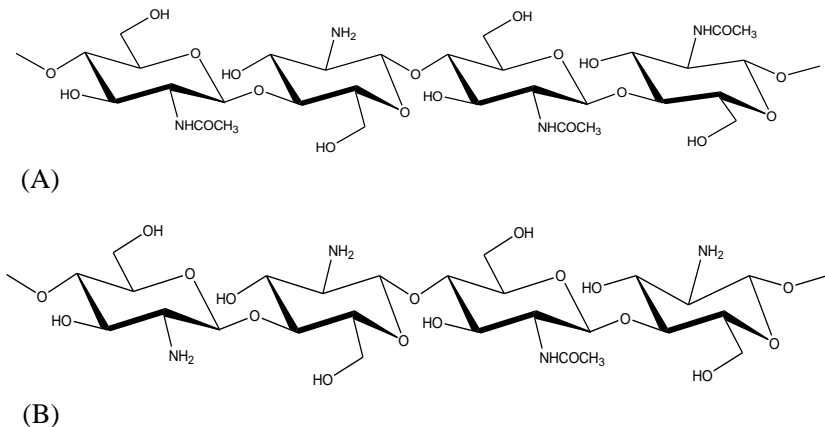


Figura 8. Estrutura química da (A) quitina e (B) quitosana.

A quitosana é insolúvel em água, em solventes orgânicos e em bases, porém, devido a presença de grupos aminos, é solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos com pH inferior a 6,5 (GONSALVES *et al.*, 2011). Por possuir grupos funcionais reativos de maneira randômica ao longo da matriz deste biopolímero, é capaz de reagir com diferentes compostos como glutaraldeído (OLIVEIRA e VIEIRA, 2006; GUPTA e JABRAIL, 2006; GRISDANURAK *et al.*, 2012; BUJDUVEANU *et al.*, 2012), glioxal (GUPTA e JABRAIL, 2006; ICHI *et al.*, 2009; MONIER *et al.*, 2010), formaldeído (KLOTZBACH *et al.*, 2008), epiclorigrina (OLIVEIRA *et al.*, 2006; CHATTERJEE, *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2011; GRISDANURAK *et al.*, 2012), carbodiimida (OLIVEIRA e VIEIRA, 2006), 1,2-etanoditiol (VIEIRA *et al.*, 2005), tripolifosfato (SHU e ZHU, 2000; FERNANDES *et al.*, 2008; KONECSNI *et al.*, 2012), citrato (SHU *et al.*, 2001; MAGUERROSKI *et al.*, 2009) entre outros, para promover um aumento de estabilidade e resistência mecânica.

Devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, alto poder de adsorção e a estabilidade física e química, este polímero vem sendo empregado amplamente em produtos farmacêuticos, industriais, na agricultura, em biotecnologia, tratamento de efluentes, além de ser um suporte favorável para imobilização de enzimas, sendo comumente usado no desenvolvimento de biossensores como suporte para a imobilização de enzimas (KRAJEWSKA, 2004;

ONÉSIPPE e LAGERGE, 2008; DIACONU *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2010).

1.5. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Nos últimos anos, nenhuma classe de materiais tem despertado tanto interesse quanto a produção de materiais funcionais obtidos em escala de 1-100 nm, conhecidos como nanomateriais. As propriedades dos materiais (ópticas, elétricas, magnéticas, de transporte, catalíticas, etc) são fortemente dependentes do tamanho das suas partículas. Novos materiais, com novas qualidades e possibilidades de utilização podem ter suas propriedades moduladas sem que se altere sua composição química e/ou estrutura tridimensional, mas unicamente pelo controle do tamanho e formato de suas partículas (ARAKI, 2007; ZARBIN, 2007; RAFFA *et al.*, 2010).

Consequentemente, com o desenvolvimento da nanotecnologia, novos nanomateriais estão sendo fabricados e as aplicações destes em sensores também têm avançando muito (ZHANG *et al.*, 2009). As vantagens mais importantes que eles trazem para eletroanalítica incluem a alta razão da área superficial/volume aumentando a sensibilidade para detecção de moléculas alvo, podendo facilmente atuar na aceleração da transferência de elétron entre o eletrodo e moléculas de detecção, levando a uma maior resposta de corrente. Podem também ser conjugados com biomoléculas importantes e também atuar como nanoconectores que ativam enzimas oxidorreduzases ou dispositivos elétricos para eventos de biorreconhecimento (GUO e DONG, 2009; FERNANDES *et al.*, 2012).

Diferentes estruturas vêm sendo investigadas e aplicadas na construção de sensores e biossensores como nanopartículas (NP), nanofios, nanotubos de carbono, grafeno, etc. Dentre estes materiais, as NP metálicas (especialmente de ouro, prata e platina) são extensivamente estudadas e usadas na fabricação de biossensores. As propriedades catalíticas das NP podem diminuir o sobrepotencial de algumas reações importantes em análise eletroquímica (LEE *et al.*, 2007), e até mesmo fornecer reversibilidade eletroquímica para reações redox, que são irreversíveis em eletrodos tradicionais, às vezes, aumentando ainda mais as respostas eletroquímicas (WANG e HU, 2009).

Pode-se citar como exemplo a análise eletroquímica seletiva da dopamina, ácido ascórbico, ácido úrico e nitrito obtida com um eletrodo

de carbono vítreo funcionalizado pela eletropolimerização de 3-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazol com nanopartículas de ouro. O biossensor apresentou elevada atividade eletrocatalítica resultando na efetiva separação dos potenciais oxidativos, baixou o sobrepotencial e melhorou substancialmente a resposta de corrente (WANG *et al.*, 2011).

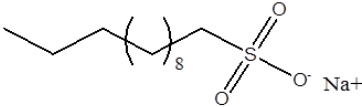
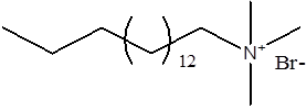
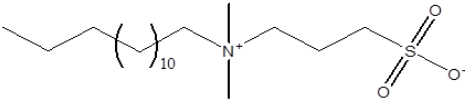
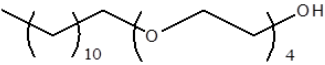
Outro exemplo que apresenta significativa contribuição das nanopartículas foi reportado por Li e colaboradores (LI *et al.*, 2012). Neste trabalho foi desenvolvido um filme compósito de quitosana com nanopartículas de platina para imobilização da enzima glicose oxidase. O biossensor apresentou resposta linear entre $1,2 \times 10^{-6}$ a $4,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para análise quantitativa de glicose com limite de detecção de $4,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O excelente desempenho analítico do biossensor foi atribuído tanto ao filme compósito que fornece sítios ativos abundantes para a imobilização da glicose oxidase em relação a quitosana quanto a catálise inerente das nanopartículas de platina.

As NP metálicas não são estáveis termodinamicamente e necessitam de agentes estabilizantes para que não ocorra a aglomeração com conseqüente formação da estrutura de bulk metálico. Os principais métodos para a estabilização de NPs metálicas em solução envolvem proteção estérea e/ou eletrostática, através do emprego de polímeros, sais de amônio quaternário, polioxoânions, líquidos iônicos ou surfactantes (ZHOU, 2005; EASTOE *et al.*, 2006; FRANZOI *et al.*, 2011).

1.6. SURFACTANTES

Os surfactantes são compostos que possuem duas regiões distintas na mesma molécula: uma região que possui grupos iônicos ou não-iônicos polares (hidrofílica) e outra região apolar, frequentemente uma cadeia de hidrocarbonetos (hidrofóbica) (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Eles podem ser classificados conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Classificação dos surfactantes

Classificação	Exemplo
Surfactantes Aniônicos	 Dodecilsulfato de sódio (SDS)
Surfactantes Catiônicos	 Brometo de cetiltrimetilamônio (CTABr)
Surfactantes Anfóteros (zwitteriônicos)	 Sulfobetaina (SB3-14).
Surfactantes Não-iônicos (neutros)	 Éter dodecil-(4)-polioxietilénico (Brij-30)

Uma das características comum a todos os surfactantes é a capacidade de associar-se espontaneamente em solução aquosa diluída gerando agregados. Estes agregados são denominados micelas e podem ser pequenas micelas globulares, grandes micelas cilíndricas ou bicamadas (Figura 9) (BUNTON *et al.*, 1991).

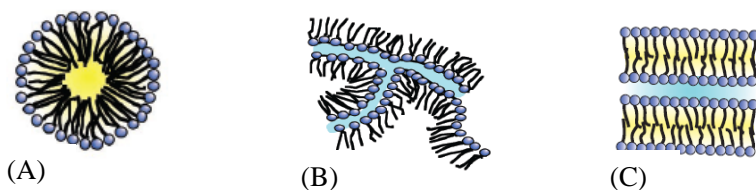


Figura 9. Representação de (A) micela globular, (B) micelas cilíndricas e (C) agregado em forma de bicamada (Adaptado de PILENI, 2003).

A concentração mínima de surfactante para o início do processo de formação das micelas é chamada de concentração micelar crítica (CMC), na qual podem ser observadas variações bruscas em propriedades físico-químicas da solução em função da concentração do surfactante como condutividade, viscosidade e tensão superficial (MANIASSO, 2001; BARROS *et al.*, 2007).

Micelas reversas são formadas por dissolução de surfactantes em um solvente orgânico apolar e uma quantidade limitada de água. As propriedades das micelas reversas podem ser alteradas com variações na razão molar $w_0 = [\text{água}]/[\text{surfactante}]$ (LEVINGER, 2002; HONG-MEI e NICELL, 2008). A Figura 10 ilustra a orientação de uma micela normal (A) e de micela reversa (B).

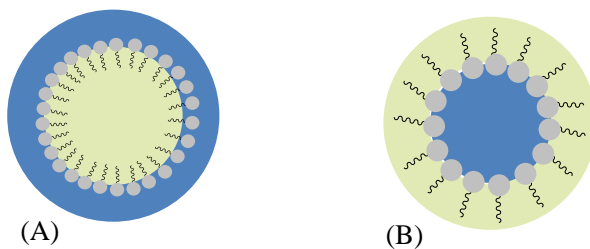


Figura 10. Representação de uma (A) micela normal e de uma (B) micela reversa.

As micelas reversas são um dos melhores métodos para formar e estabilizar NP metálicas. Elas são formadas e protegidas de aglomeração no core micelar em contato com a cabeça polar do surfactante. Assim o tamanho da NP é limitado pelo tamanho do core micelar. As vantagens da síntese de NP por micelas reversas encontram-se no maior controle

de tamanho de NP pequenas e a possibilidade de se alterar propriedades óticas e químicas das NP pela mudança do surfactante (SUN *et al.*, 2009; ZHANG e ZHAO, 2011; FERNANDES *et al.*, 2012).

Além da capacidade de estabilizar NP, vários artigos têm fornecido evidências de que enzimas possuem maior atividade em micelas reversas do que em meio aquoso e podem ser aprisionadas nas cavidades internas das micelas reversas sem perda significativa da atividade catalítica (GOMEZ-PUYOU e GOMEZ-PUYOU, 1998; REN *et al.*, 2005; HONG-MEI e NICELL, 2008). Desta forma, surfactantes têm sido utilizados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para estabilizar as enzimas no núcleo aquoso de micelas reversas, para manter as proteínas em uma orientação correta e para facilitar a transferência de elétrons entre proteínas e eletrodos. Além disso, a modificação com surfactante altera as propriedades da superfície de um eletrodo facilitando o acesso dos analitos (YUAN *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2012). Soluções ou dispersões de surfactantes podem ser espalhadas sobre superfícies sólidas para gerar finas películas compostas principalmente por pilhas ordenadas de bicamadas. Nakashima *et al.* (NAKASHIMA *et al.*, 1983) demonstrou pela primeira vez a formação de filmes de sais de dialquilamônio sobre placas de vidro (RUSLING, 1994), e imobilizou enzimas na superfície de eletrodos sólidos para aplicações na eletroanalítica.

1.7. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além de serem responsáveis pela qualidade sensorial e nutricional de frutas e verduras (IGNAT *et al.*, 2011; FERNANDES, *et al.*, 2013). Compreendem uma ampla variedade de moléculas que possuem anel aromático, contendo um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Eles são divididos em várias classes de acordo com o número de anéis fenólicos que contêm e dos elementos estruturais que esses anéis possuem (ANTOLOVICH *et al.*, 2000; ANGELO e JORGE, 2007; HAN *et al.*, 2007; IGNAT *et al.*, 2011). A quantidade de compostos fenólicos conhecidos é grande (mais de oito mil variantes estruturais), dentre eles, destacam-se os fenóis simples, ácidos fenólicos e flavonóides (ANGELO e JORGE, 2007).

Os fenóis simples apresentam somente um anel aromático com dois grupos hidroxilas. Como exemplos têm o catecol e a hidroquinona (ROBARDS e ANTOLOVICH, 1997).

Os ácidos fenólicos também contêm somente um anel aromático e possuem duas subclasses, os ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico (HAN *et al.*, 2007). Ácidos hidroxibenzóicos são compostos que possuem um grupo carboxílico ligado ao anel aromático com uma estrutura comum C6-C1. Dentre eles destacam-se os ácidos protocatecuico, salicílico e gálico. Ácidos hidroxicinâmicos, por outro lado, são compostos fenólicos de ocorrência natural que possuem um anel aromático com uma cadeia hidrocarbônica, constituída por 3 átomos de carbonos ligada ao anel (C6-C3), sendo alguns exemplos os ácidos cafeico, ferúlico e cumárico (IGNAT *et al.*, 2011).

Os flavonóides são um dos maiores grupos fenólicos de ocorrência natural (ROBARDS e ANTOLOVICH, 1997), consistindo em 15 átomos de carbono, onde dois anéis aromáticos são unidos por três átomos de carbonos que formam um anel heterocíclico (C6-C3-C6) (ANGELO e JORGE, 2007). A estrutura básica dos compostos fenólicos está ilustrada na Figura 11.

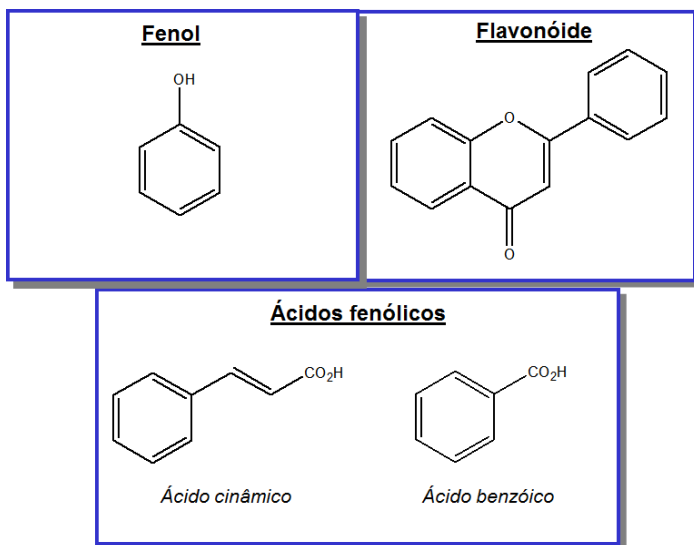


Figura 11. Estrutura básica do fenol, flavonóide e ácidos fenólicos.

Vários efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos aos compostos fenólicos presentes em frutas, vinho, chá, azeite extravirgem, mel, chocolate e outros produtos derivados do cacau, café e cerveja. Estudos experimentais indicam que a maioria dos efeitos biológicos são atribuídos às capacidades antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica destes compostos (HAN *et al.*, 2007; ABE *et al.*, 2007). O interesse na determinação de substâncias fenólicas está relacionado com a sua diversidade, importância biológica como metabólitos secundários de plantas, impacto na qualidade dos alimentos e bebidas (coloração, sabor, aroma e estabilidade oxidativa) e nas aplicações industriais (ROBARDS e ANTOLOVICH, 1997).

1.8. MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS

A voltametria é uma técnica eletroquímica classificada como dinâmica, pois a célula eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ($i > 0$) com o tempo de resposta de um eletrodo com o potencial controlado. A magnitude da corrente elétrica pode ser usada para determinar a concentração das espécies em solução e obter informações relativas às suas identificações.

O potencial é aplicado entre o eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência, usualmente um eletrodo de calomelano saturado ou Ag/AgCl, em forma de varredura, isto é, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. Nas células eletroquímicas a corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, evitando que ocorram distúrbios (como eletrólise, por exemplo) no eletrodo de referência. Assim o eletrodo de referência mantém o seu potencial constante durante as medidas (OSTERYONG e OSTERYONG, 1985; SKOOG *et al.*, 2008). A célula eletroquímica é constituída pelos três eletrodos (eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar) imersos em uma solução contendo o analito e um eletrólito suporte (eletrólito não-reativo) como mostra a Figura 12.

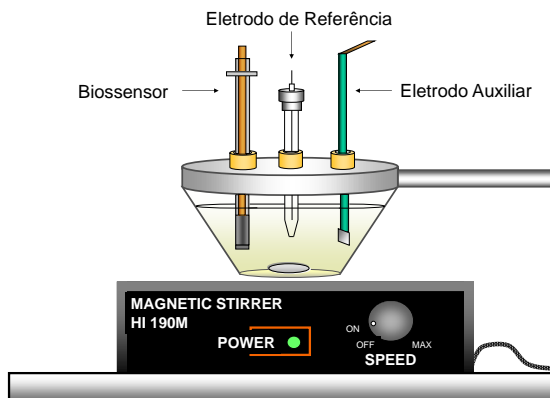


Figura 12. Célula eletroquímica contendo biossensor, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar.

O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma, e a magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo e conseqüentemente, na célula eletroquímica. (OSTERYONG e OSTERYONG, 1985; SKOOG *et al.*, 2008).

Uma grande vantagem destas técnicas consiste na possibilidade da medida ser realizada sem a necessidade de muitas etapas de pré-purificações ou de separações prévias, além de tornar possível a análise de materiais coloridos ou amostras contendo partículas sólidas dispersas. Estas vantagens, aliadas ao curto tempo na realização das análises e ao baixo custo da instrumentação e dos materiais utilizados, se comparadas a outras técnicas, e à baixa sensibilidade que as técnicas eletroanalíticas apresentam em relação à presença de interferentes, fazem com que sejam cada vez mais utilizadas (SOUZA *et al.*, 2003).

Devido a sua importância, técnicas eletroquímicas cada vez mais sensíveis às espécies em estudo foram sendo desenvolvidas principalmente com o avanço tecnológico resultante da evolução da informática (SOUZA *et al.*, 2003).

1.8.1. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é uma das formas mais úteis para obter informações sobre o potencial redox, detecção de intermediários e acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos.

Nesta técnica ocorre a aplicação de uma varredura linear do potencial até um potencial máximo e depois o potencial volta linearmente ao seu valor inicial, sendo possível realizar quantos ciclos forem necessários. Os potenciais nos quais as reversões ocorrem são denominadas potenciais de inversão. Durante um experimento a resposta da corrente de um eletrodo estacionário numa solução sem agitação é excitada na forma de uma onda triangular como mostra a Figura 13. A curva voltamétrica obtida pela variação da corrente vs. a variação de potencial representa o voltamograma cíclico (Figura 14). Os parâmetros importantes em um voltamograma cíclico são: potencial de pico catódico (E_{pc}), potencial de pico anódico (E_{pa}), corrente de pico catódica (i_{pc}), corrente de pico anódica (i_{pa}) e a diferença dos potenciais (ΔE) (HARRIS, 2005; SKOOG *et al.*, 2008;).

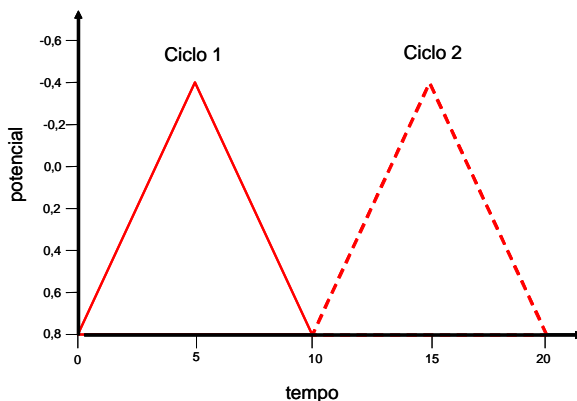


Figura 13. Forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica.

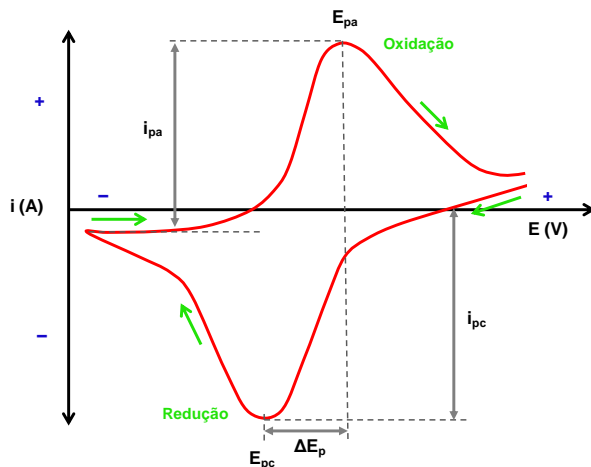


Figura 14. Forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica.

Devido à corrente capacitiva, que é uma das principais componentes da corrente de fundo, esta técnica não é muito aplicada para análises quantitativas. O motivo para o alto limite de detecção da voltametria cíclica é em razão da corrente faradaica de interesse (que é a corrente obtida da reação da substância a ser determinada) estar na mesma ordem ou menor do que a corrente capacitiva (que surge devido a fenômenos relacionados à dupla camada elétrica), não sendo possível distinguí-las. Desse modo, conseguindo-se discriminar essas correntes, a sensibilidade da técnica pode ser melhorada (HARRIS, 2005; SKOOG *et al.*, 2008).

1.8.2. Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais sensíveis (em geral, varia na ordem de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹) devido à ausência da interferência proveniente da corrente capacitiva, já que as medidas de corrente são realizadas ao final do degrau de potencial, onde a corrente capacitiva já se torna negligenciável (SOUZA *et al.*, 2003). Outra importante vantagem apresentada pelo método é a obtenção de dados mecanísticos semelhantes àqueles obtidos pela voltametria cíclica, porém com maior sensibilidade (SOUZA *et al.*, 2004).

Na voltametria de onda quadrada, a forma da curva de corrente-potencial é proveniente da aplicação de potenciais de altura “a” (amplitude do pulso de potencial), que variam de acordo com uma escada de potencial com largura ΔE_s (altura do degrau) e período τ (duração dos pulsos). O sinal de excitação do potencial vs. tempo na voltametria de onda quadrada está representado na Figura 15 e é obtido pela sobreposição de uma sequência de pulsos de onda quadrada sobre um sinal na forma de escada.

As medidas de corrente são feitas no final dos pulsos diretos (1) e reversos (2) e o sinal obtido, de forma diferencial, é dado como uma intensidade da corrente resultante como pode ser observado na Figura 16 (SOUZA *et al.*, 2004; MIRESKI *et al.*, 2007).

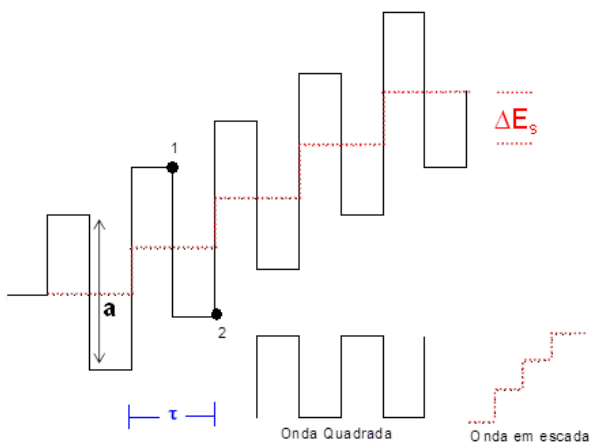


Figura 15. Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada. A corrente é medida no final do pulso direto (1) e reverso (2).

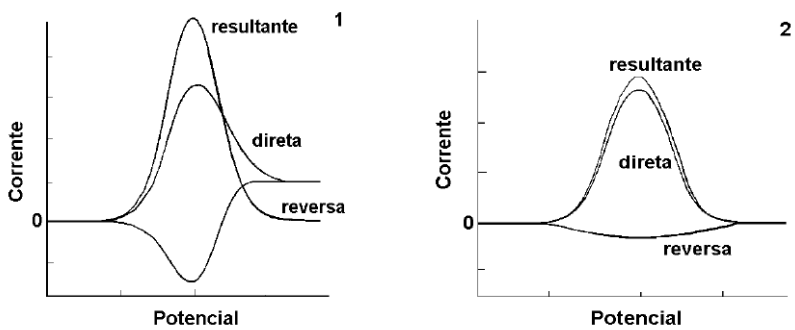


Figura 16. Voltamogramas de onda quadrada: processos redox de um sistema reversível (1) e de um sistema irreversível (2) (Reproduzido de SOUSA *et al.*, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

Compostos fenólicos estão abundantemente presentes na natureza, nos alimentos e em fármacos. O desenvolvimento de um procedimento para detectar e determinar essas espécies é de grande interesse, pois mesmo em pequenas concentrações, os compostos fenólicos afetam a qualidade dos alimentos e bebidas (coloração, sabor, aroma e estabilidade oxidativa). Além disso, o controle de qualidade de fármacos é muito importante, uma vez que em baixas dosagens pode ser ineficaz no tratamento ou em altas dosagens pode acarretar na toxicidade ou causar até mesmo a morte.

A crescente demanda de análises químicas e a necessidade de monitoramento contínuo no controle de qualidade de produtos alimentícios e farmacêuticos têm direcionado os estudos no sentido de buscar novos materiais para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos que sejam capazes de realizar “leituras” em tempo real, de fácil construção e possibilitem análises reprodutíveis com alta sensibilidade e seletividade.

Devido à seletividade intrínseca dos biossensores propiciada pelas enzimas e a rapidez das análises, unidas ao baixo custo de construção e implantação, esses dispositivos apresentam-se como uma alternativa viável e justificam a pesquisa proposta. Portanto, o presente trabalho visa à contribuição no desenvolvimento de novos detectores eletroquímicos modificados para aplicações em áreas de interesse alimentício e farmacêutico.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver novos biossensores através da modificação da superfície de eletrodos de ouro e de pasta de carbono à base de enzimas oxirredutases para determinação de compostos fenólicos em amostras de formulação farmacêutica e bebidas utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Biossensor de Peroxidase Contendo Nanopartículas de Ouro Dispersas em Surfactante Zwitteriônico

- Preparar extratos de brotos de alfafa (*Medicago sativa*) para utilização como fonte da enzima peroxidase;
- Determinar a atividade da peroxidase por método espectrofotométrico;
- Construir os biossensores utilizando camadas de surfactante contendo NP de ouro e a enzima sobre a superfície de eletrodos de ouro;
- Investigar a repetibilidade, reprodutibilidade, estabilidade e seletividade dos biossensores;
- Otimizar as respostas dos biossensores propostos utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada;
- Aplicar os biossensores na determinação de hidroquinona em creme dermatológico;
- Comparar os resultados obtidos utilizando o biossensor e o método oficial.

3.2.2. Biossensor de Lacase Imobilizada em Quitosana Previamente Reticulada com Genipina

- Extrair a enzima lacase (*Aspergillus oryzae*) da microcápsula;
- Determinar a atividade enzimática por método espectrofotométrico;
- Modificar quimicamente a quitosana com genipina;

- Caracterizar a quitosana reticulada;
- Imobilizar a enzima neste suporte modificado;
- Construir biossensores contendo a lacase imobilizada em quitosana reticulada;
- Investigar a repetibilidade, reprodutibilidade, estabilidade e seletividade dos biossensores;
- Avaliar e otimizar as respostas do biossensor utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada (pH, concentração da enzima e parâmetros da voltametria de onda quadrada);
- Após a otimização, empregar o biossensor na determinação do teor de polifenóis totais em mate.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

As soluções foram preparadas empregando-se água destilada e todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, obtidos comercialmente e usados no preparo de soluções.

Solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada dissolvendo-se em água destilada 11,998 g de monohidrogenofosfato de potássio (Vetec) e 14,196 g de dihidrogenofosfato de potássio (Vetec) em um béquer. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 1,0 L onde foi completado o volume. O ajuste do pH 6,0 a 7,5 foi realizado com ácido fosfórico concentrado (Nuclear) ou hidróxido de sódio (F. Maia) $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Para o preparo da solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi dissolvido 8,200 g de acetato de sódio anidro (Nuclear) em um béquer contendo água destilada e adicionado 5,7 mL de ácido acético concentrado (Vetec). A solução foi transferida para um balão de 1 L e seu volume completado com água destilada. O ajuste do pH 3,0 a 6,5 foi realizado com ácido acético concentrado ou hidróxido de sódio (F. Maia) $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Brotos de alfafa foram comprados em mercado local de Florianópolis (Santa Catarina, Brasil) e cremes de hidroquinona (HQ) foram adquiridos em farmácia de manipulação.

Para a determinação da atividade enzimática da PER foi utilizada uma solução de guaiacol $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ preparada pela diluição de 0,14 mL deste reagente (Aldrich, 98%) em um balão volumétrico de 25 mL com solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Também para esta análise, uma solução estoque de peróxido de hidrogênio $9,8 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diluindo 1,0 mL desse reagente (Vetec, 30%) em um balão volumétrico de 100 mL com solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) onde foi armazenada em geladeira para uso durante o trabalho. A solução de trabalho ($9,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada diariamente a partir da diluição de uma alíquota de 1 mL da solução estoque em balão volumétrico de 10 mL com tampão fosfato pH 7,0 (OLIVEIRA e VIEIRA, 2006; FERNANDES *et al.*, 2012).

Para o estudo de impedância eletroquímica foi utilizado ferricianeto de potássio e cloreto de potássio ambos da Sigma-Aldrich.

Enzima LAC (Denilite® II Base) em microcápsulas, produzida por microorganismos geneticamente modificados *Aspergillus oryzae*, foi fornecida pela Novozymes.

Para a determinação da atividade enzimática da LAC foi utilizada uma solução de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), sal de diamônio) (Sigma) $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ preparada pela diluição de 0,0068 g deste reagente em um balão volumétrico de 25 mL com solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0) (FERNANDES *et al.*, 2008; FRANZOI *et al.*, 2010).

A síntese e caracterização do surfactante 3-(1-tetradecilimidazólio-3-il)propano-1-sulfonato (ImS3-14) contendo NP de Au foi realizada pelo grupo do professor Dr. Faruk Nome, no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais da Universidade Federal de Santa Catarina (SOUZA, 2012).

Suspensão de alumina em água (0,3 e 0,05 µm) foi obtida da Aratec, Brasil e utilizados para a limpeza dos eletrodos de ouro.

Quitosana em pó com grau de desacetilação de 85% (Aldrich) foi utilizada como suporte para LAC. Genipina (grau de pureza ~ 98%) foi adquirida da Challenge Bioproducts (Taiwan) e utilizada para reticular os grupos aminos da quitosana.

Pó de grafite (Acheson 38, Fisher Scientific) e Nujol (Sigma-Aldrich), de elevado grau de pureza foram utilizados na preparação da pasta de carbono.

Solução estoque de hidroquinona $1,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi preparada diariamente pela dissolução de 0,0015 g deste reagente (Sigma-Aldrich) em balão volumétrico de 10 mL com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

O ácido cafeico foi adquirido da Sigma-Aldrich e uma solução estoque de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi preparada diariamente pela dissolução de 0,0018 g deste reagente (Sigma-Aldrich) em balão volumétrico de 10 mL com etanol-água (20:80%, v/v). Soluções de referência foram preparadas a partir da solução estoque por diluição apropriada.

As amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) utilizadas para determinação do teor de compostos fenólicos totais foram adquiridas no mercado local.

4.2. INSTRUMENTAÇÃO

O extrato enzimático foi obtido utilizando-se um liquidificador BLACK & DECKER modelo IB900 para homogeneização do material vegetal.

Um espectrofotômetro da Micronal modelo B572 e cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico foram usados na obtenção das medidas de absorvância para a determinação das atividades enzimáticas. As quantificações de hidroquinona pelo método comparativo (método oficial) foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis Hewlett-Packard (Boise, ID, USA), modelo 8452A.

Para auxiliar na homogeneização das soluções foi utilizado um banho ultrassônico Unique 1400A.

As medidas de pH foram obtidas empregando um pHmetro da Micronal modelo B-474, com um eletrodo de vidro combinado Micronal.

As medidas voltamétricas foram obtidas usando um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT12 (Eco Chemie, Suécia) conectado a um software (GPES, versão 4.9.006, Eco Chemie) para aquisição e tratamento de dados. Para experimentos de impedância eletroquímica foi utilizado um Potenciostato/Galvanostato PGSTAT128N conectado a um software FRA (Nova, versão 1.6.013). Para realização das análises, empregou-se uma célula de vidro (capacidade aproximada de 15 mL) sem compartimento divisório e com tampa de Teflon provida de orifícios circulares para encaixe dos eletrodos e adição das soluções. Um sistema de três eletrodos foi utilizado: biossensores propostos foram utilizado como eletrodos de trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$), como eletrodo de referência e uma placa de platina ($0,5 \text{ cm}^2$), como eletrodo auxiliar.

As morfologias das superfícies dos eletrodos foram determinadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME/UFSC) por microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo (SEM-FEG) (Jeol JSM-6701F, Japão), operando com uma tensão de aceleração de 10,0 kV. Espectrofotômetro infravermelho FT Perkin Elmer – modelo 16 PC foi utilizado para a análise de amostra de quitosana e quitosana reticulada com genipina.

4.3. METODOLOGIA

4.3.1. Biossensor de Peroxidase Contendo Nanopartículas de Ouro Dispersas em Surfactante Zwitteriônico

4.3.1.1. Obtenção e Determinação da PER de Vegetal

Para o desenvolvimento deste trabalho uma massa de 50,0 g de brotos de alfafa (*Medicago sativa*) foi homogeneizada em um liquidificador juntamente com 50,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). O extrato foi filtrado utilizando quatro camadas de gazes e um sistema de filtração com membrana de 0,45 µm (Millipore, Bedford, USA). A solução sobrenadante foi armazenada em frascos âmbar a 4°C no refrigerador, e usado como fonte da enzima PER (OLIVEIRA e VIEIRA, 2006; FERNANDES *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2012).

Inicialmente 1 mL da solução enzimática foi transferida para um balão de 5 mL contendo tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). Logo após a diluição, a atividade da PER do broto de alfafa foi determinada em triplicata através da medida da absorvância em 470 nm do tetraguaiacol formado pela reação entre 0,2 mL da solução sobrenadante do extrato vegetal previamente diluído, 2,7 mL de guaiacol 0,05 mol L⁻¹ e 0,1 mL de peróxido de hidrogênio 9,8x10⁻³ mol L⁻¹. A atividade enzimática (unidade mL⁻¹) é definida como a quantidade da enzima que causa um aumento de 0,001 unidades de absorvância por minuto e pode ser determinada pela equação 1 (VIEIRA *et al.*, 1999; FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002).

$$\text{Equação 1: Atividade} = \frac{\Delta\text{Abs} \cdot 1000 \cdot \text{FD}}{\Delta t \cdot V}$$

Atividade = atividade enzimática (unidade mL⁻¹)

ΔAbs = variação da absorvância (λ = 470 nm)

Δt = variação do tempo (min)

V = volume do extrato enzimático (mL)

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

4.3.1.2. Pré-tratamento da Superfície do Ouro e Construção do Biossensor

Inicialmente as superfícies dos eletrodos de ouro com 2,0 mm de diâmetros foram polidas com uma suspensão aquosa de alumina (0,3 e 0,05 μm de diâmetro) até adquirirem aspecto espelhado. Após cada passo de polimento as partículas residuais de alumina foram removidas utilizando um banho ultrassônico com água destilada por 2 min. Finalmente, voltamogramas cíclicos foram obtidos em solução de 0,5 mol L^{-1} de ácido sulfúrico aplicando-se varreduras sucessivas entre 0,0 e 1,7 V em 100 mV s^{-1} , até que voltamogramas cíclicos característicos para um eletrodo de ouro limpo reproduzíveis fossem obtidos como mostrado na Figura 17 (CARVALHAL *et al.*, 2005).

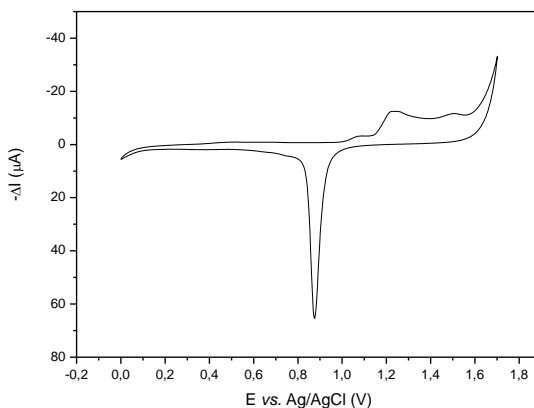


Figura 17. Voltamograma cíclico da limpeza eletroquímica do eletrodo de ouro em $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ em 100 mV s^{-1} .

O biossensor foi então preparado pela adição de uma alíquota de 97 unidades de PER sobre a superfície do eletrodo de ouro pré-tratado e deixando-o secar. Subsequentemente, $2 \mu\text{L}$ de uma solução $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante ImS3-14 (Figura 18), contendo NPs de ouro ($4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foram também adicionados sobre a camada de PER e mais uma vez o biossensor foi deixado secar à temperatura ambiente (FERNANDES *et al.*, 2012). O biossensor foi armazenado à

temperatura ambiente quando não estava em uso. Um esquema proposto para a construção do biossensor pode ser visto na Figura 19.

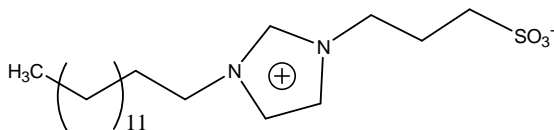


Figura 18. Estrutura química do surfactante 3-(1-tetradecil-imidazólio-3-il)propano-1-sulfonato (ImS3-14).

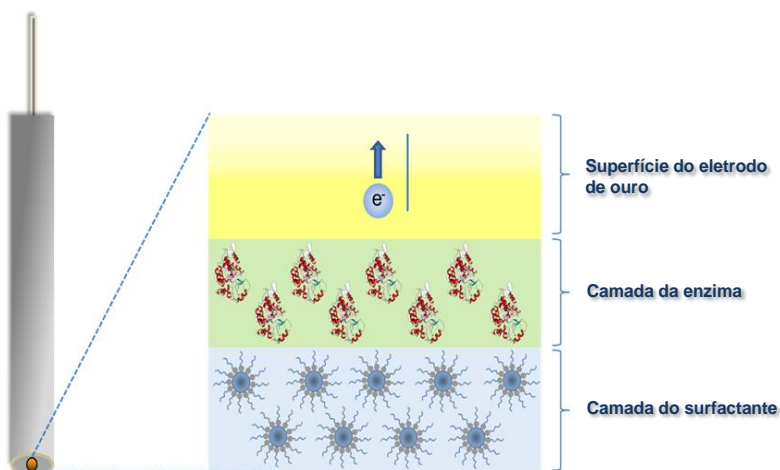


Figura 19. Ilustração esquemática da construção do biossensor de peroxidase de broto de alfafa imobilizada no surfactante ImS3-14 contendo nanopartículas de ouro.

4.3.1.3. Preparação das Amostras e Determinação de Hidroquinona

A fim de testar a aplicabilidade do eletrodo proposto para a análise de amostras comerciais, a determinação de HQ em cosméticos (valor rotulado de 20 e 40 mg/g) foi realizada. Quantidades rigorosamente pesadas do cosmético equivalente a 2,0 mg de HQ foram transferidas para um balão volumétrico de 50 mL, dissolvido em etanol e colocado em banho ultrassônico durante 10 min. As soluções

alcoólicas foram armazenadas e usadas para a quantificação de HQ utilizando o biossensor proposto.

O método de adição de padrão foi utilizado para a determinação de HQ em cosméticos. Alíquotas da amostra previamente preparadas foram adicionados a 10 mL de uma solução de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,0) contendo 7,4x10⁻⁵ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio e quantificada utilizando voltametria de onda quadrada depois de sucessivas adições de soluções-padrão de HQ. Todas as medidas foram efetuadas em triplicata. Para validar os resultados obtidos com a metodologia proposta, os valores foram comparados com os obtidos pelo método espectrofotométrico de UV, tal como recomendado na farmacopeia americana (UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2008) para a quantificação de HQ.

4.3.2. Biossensor de Lacase Imobilizada em Quitosana Previamente Reticulada com Genipina

4.3.2.1. Obtenção e Determinação da LAC

Uma massa de 5,0 g de microcápsulas contendo a enzima LAC obtida comercialmente da Novozyme[®] foi macerada por 30 min em almofariz. O suporte macerado contendo LAC foi transferido para um béquer onde foi adicionado 50 mL de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0) e agitada por 20 min, sendo posteriormente filtrada. A enzima obtida foi armazenada em frasco âmbar, sob refrigeração, e usada na construção dos biossensores (FERNANDES *et al.*, 2008; FRANZOI *et al.*, 2010).

Inicialmente, 1 mL da solução enzimática foi transferida para um balão de 50 mL contendo tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0). Logo após a diluição, a atividade enzimática da LAC foi determinada em triplicata medindo-se a absorvância em 420 nm do produto formado a partir da reação entre 2,8 mL de uma solução 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ de ABTS e 0,2 mL da LAC previamente diluída. Uma unidade de atividade de LAC é definida como a quantidade de enzima que oxida 1,0 μmol de ABTS por min (BOURBONNAIS *et al.*, 1998).

$$\text{Equação 2: Atividade} = \frac{\Delta \text{Abs } t^{-1}}{\epsilon \cdot b} \times V_T \times \frac{1}{V_E} \times 1000 \times \text{FD}$$

Atividade = atividade enzimática (unidade mL⁻¹)

Abs t⁻¹ = variação da absorvância com o tempo (min⁻¹)

$\epsilon_{420\text{nm}}$ = absortividade molar (36.000 L mol⁻¹ cm⁻¹) (BOURBONNAIS *et al.*, 1998)

b = caminho óptico (1 cm)

V_T = volume utilizado no ensaio (mL)

V_E = volume da solução de LAC (mL)

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

4.3.2.2. Reticulação da QTS com GNP

A QTS foi previamente reticulada com GNP para ser usada como suporte sólido (QTS/GNP) para a imobilização de LAC. Em um balão, 2,0 g de QTS foram adicionados em uma solução de GNP 0,044 mol L⁻¹ onde foi agitada durante 48 h a 25 °C em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. A QTS reticulada foi lavada repetidamente com água destilada e seca à temperatura ambiente (FERNANDES, *et al.*, 2013).

4.3.2.3. Imobilização da Enzima LAC

O biopolímero reticulado QTS/GNP foi utilizado como suporte para a imobilização da LAC. Com auxílio de uma micropipeta, alíquotas de 6,0 a 61,0 µL do extrato contendo de 0,1 a 1,0 unidades de LAC foram adicionadas sobre 15,0 mg do suporte, individualmente. Após 2 min de homogeneização, os suportes foram secos à temperatura ambiente.

4.3.2.4. Construção do Biossensor

O biossensor foi preparado pela homogeneização manual de 15,0 mg de QTS previamente reticulada contendo 0,5 unidades de LAC (10%, m/m) juntamente com 112,0 mg de pó de grafite (75%, m/m) em um almofariz durante 20 min. Subsequentemente, 22,0 mg de Nujol (15%, m/m) foram adicionadas ao pó de grafite contendo LAC e homogeneizados por mais 20 min. A pasta de carbono modificada foi introduzida em uma seringa plástica de 1 mL e um fio de cobre foi inserido para obter o contato elétrico externo e usado como eletrodo de trabalho (LAC-QTS/GNP-biossensor). A Figura 20 ilustra a construção dos biossensores contendo Lac imobilizada em QTS reticulada.



Figura 20. Ilustração esquemática da construção do biossensor de lacase imobilizada em quitosana reticulada com genipina.

4.3.2.5. Preparação e Análise das Amostras de Erva-mate

Quatro tipos de amostras de erva-mate foram preparadas de acordo com o procedimento relatado em um trabalho anterior com algumas modificações (MAZZAFERA, 1997). A infusão das amostras foi preparada pela adição de 1,5 g da erva-mate em um frasco de erlenmeyer de 50,0 mL na qual foi umedecido com 2,0 mL de água destilada e prensada. Posteriormente, 30,0 mL de água destilada a uma temperatura de 85 °C foi adicionada cuidadosamente sobre o mate. Em seguida, a infusão foi filtrada e uma nova adição de água quente, nas mesmas condições, foi realizada e novamente filtrada. Amostras de erva-mate foram diluídas 10 vezes com água destilada antes de serem transferidas para a célula eletroquímica e analisadas pelo biossensor.

4.3.2.6. Medidas Eletroquímicas

Voltamogramas de onda quadrada foram registrados utilizando uma célula eletroquímica contendo 10 mL da solução tampão ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) juntamente com alíquotas da solução padrão de substrato ou das amostras após um tempo de agitação de 60 s para homogeneização da solução. Para as medidas eletroquímicas foram utilizadas: frequência de 10-100 Hz; amplitude de pulso de 10-100 mV e incremento de 1-10 mV. As curvas de calibração e o estudo de recuperação foram realizados utilizando o método de adição de padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. BIOSSENSOR DE PEROXIDASE CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE OURO DISPERSAS EM SURFACTANTE ZWITERIÔNICO

5.1.1. Estudo da Atividade Enzimática da PER

Os extratos de frutos, legumes e verduras constituem uma fonte de enzimas e vêm sendo empregados com sucesso na construção e aplicação de biossensores (FATIBELLO-FILHO *et al.*, 2007). Após a obtenção do extrato enzimático a atividade da enzima PER foi investigada espectrofotometricamente em comprimento de onda de 470 nm, acompanhando-se o surgimento do tetraguaiacol, produto formado a partir da reação do guaiacol com a PER na presença de peróxido de hidrogênio.

De acordo com o gráfico da absorvância vs. tempo (Figura 21), pode-se calcular a atividade da PER através da Equação 1 (mostrada anteriormente) fazendo uso apenas da parte linear do gráfico onde foi obtido um valor de atividade da PER igual a 32.282,3 unidades por mL do extrato enzimático.

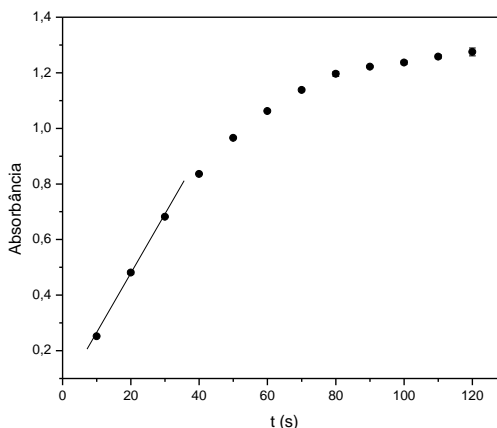


Figura 21. Gráfico de absorvância vs. tempo para determinação da atividade enzimática da peroxidase.

O broto de alfafa (*Medicago sativa*) foi utilizado como extrato enzimático fonte de PER para o desenvolvimento deste trabalho por apresentar alta atividade enzimática, baixo custo e fácil aquisição como apresentado por Moccelini *et al.* (MOCCELINI *et al.*, 2010).

5.1.2. Análises das NP e Superfície do Eletrodo de Ouro Modificado

As propriedades dos materiais (ópticas, elétricas, magnéticas, catalíticas, etc.) são fortemente dependentes do tamanho das suas partículas (ZARBIN, 2007). Desta forma, é de suma importância verificar o tamanho obtido para as NP de ouro sintetizadas no surfactante ImS3-14. A imagem da microscopia eletrônica de transmissão (Figura 22A) mostra que existem NP de ouro dispersas no surfactante ImS3-14 com baixo nível de agregação apresentando forma irregular com um diâmetro médio de $4,35 \pm 1,51$ nm com base na análise de 300 partículas (Figura 22B).

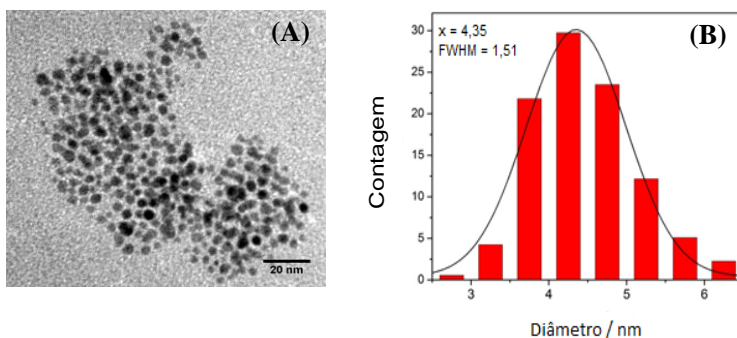


Figura 22. (A) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das NP de ouro em ImS3-14 observadas em 100 kV e uma ampliação de 600 K e (B) a distribuição de tamanhos das NP preparadas.

Assume-se que a superfície do eletrodo de ouro pode ser homogeneamente revestida com solução do surfactante, formando uma cobertura uniforme de multicamadas das moléculas. Utilizando a microscopia eletrônica de varredura (SEM), percebe-se que o eletrodo de ouro sem modificação (Figura 23A) apresenta uma superfície irregular, no entanto, uma vez recoberto, torna-se plana e lisa (Figura 23B) devido, provavelmente, às camadas múltiplas do surfactante (YUAN *et al.*, 2009).

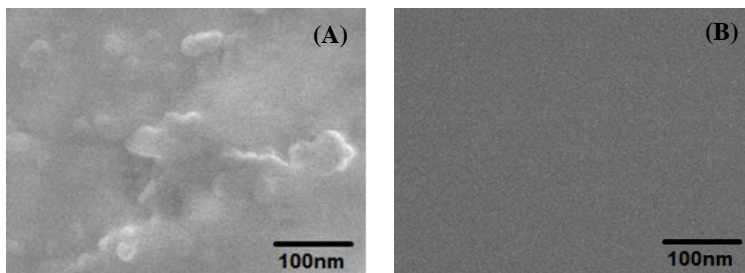


Figura 23. Imagens de microscopia eletrônica de varredura do (A) eletrodo de ouro e do (B) eletrodo de ouro com ImS3-14 contendo NPs de Au em 10 kV.

5.1.3. Caracterização Eletroquímica por Impedância

Espectroscopia de impedância é uma técnica eletroquímica eficaz para estudar as características elétricas da superfície de eletrodos modificados (ZHANG e OYAMA, 2004). Uma solução de KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) contendo ferricianeto de potássio ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foi selecionada para avaliar o desempenho do eletrodo de Au e as propriedades do eletrodo após modificação com ImS3-14, (NP Au)ImS3-14 e PER. A Figura 24 mostra as respostas eletroquímicas do Au, ImS3-14/Au, (NP Au)ImS3-14/Au e PER/(NP Au)ImS3-14/Au.

Pode ser visto que existe uma baixa transferência de carga para o eletrodo de Au ou com os eletrodos recobertos com ImS3-14 ou (NP Au)ImS3-14, o que é característico de um processo eletroquímico limitado por difusão. Contudo, a resistência à transferência de carga foi observada após o recobrimento do eletrodo com a PER, confirmando a formação de uma camada de proteína adsorvida na sua superfície, o que dificulta a transferência de elétrons (ZHANG e OYAMA, 2004). Quando as proteínas foram cobertas com (NP Au)ImS3-14 houve uma diminuição na resistência de transferência de carga devido à interface condutiva das NP Au.

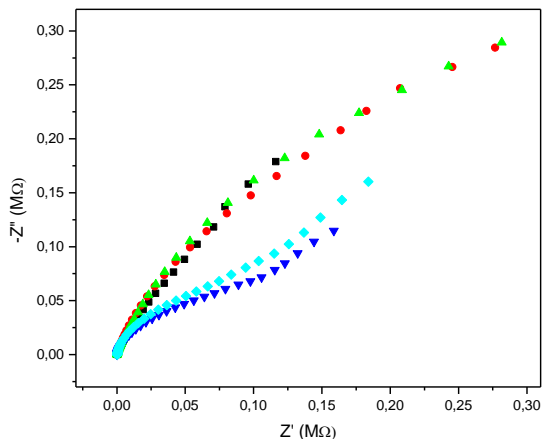


Figura 24. Medidas de impedância eletroquímica para eletrodo de (■) Au, (●) ImS3-14/Au, (▲) (NP Au)ImS3-14/Au, (▼) PER/ImS3-14/Au e (◆) PER/(NP Au)ImS3-14/Au em KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) contendo ferricianeto de potássio ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Potencial aplicado: $0,01 \text{ V}$; faixa de frequência: $1,0$ a $0,1 \text{ Hz}$ MHz.

5.1.4. Processo Enzimático na Superfície do Eletrodo

Para avaliar a contribuição do surfactante contendo NP de ouro e da enzima PER foram construídos diferentes sensores e comparados as suas respostas para $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de solução de hidroquinona e $7,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de solução de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) no intervalo de potencial de $0,3$ a $-0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

A Figura 25 mostra os voltamogramas obtidos usando os sensores: (a) Au, (b) ImS3-14/Au, (c) (NP Au)ImS3-14/Au e (d) PER/(NP Au)ImS3-14/Au. Como pode ser visto, uma maior resposta para a solução de hidroquinona foi obtida utilizando o biossensor contendo NP de ouro dispersas no surfactante ImS3-14 juntamente com a enzima PER. Com base nestes resultados, assume-se que o surfactante oferece um microambiente favorável para a PER, e que juntamente com as NP de Au facilita a transferência de elétrons na superfície do biossensor.

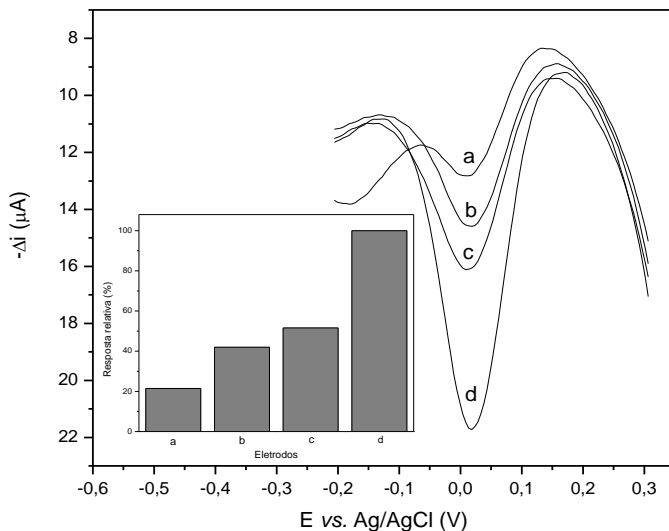


Figura 25. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando os sensores (a) Au, (b) ImS3-14/Au, (c) (NP Au)ImS3-14/Au e (d) PER/(NP Au)ImS3-14/Au em $5,0 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$ de solução de hidroquinona e $7,4 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$ de solução de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato (0,1 mol L $^{-1}$, pH 7,0). Inseto: valores de resposta relativa para as correntes de pico.

Reações catalisadas por enzimas têm sido extensivamente usadas em determinações de diferentes analitos de interesse farmacêutico. A Figura 26 ilustra o esquema da reação enzimática entre a hidroquinona e a PER na superfície do biossensor de ouro modificado com surfactante ImS-14 contendo NPs de Au e PER (PER/(NP Au)ImS3-14/Au). A PER é uma oxidoreductase que catalisa a oxidação de uma variedade de compostos aromáticos com a simultânea redução do peróxido de hidrogênio à água. No presente estudo, a hidroquinona na presença da enzima PER é oxidada a sua *o*-quinona. Esta *o*-quinona é então reduzida eletroquimicamente na superfície do eletrodo proposto sendo a sua corrente de pico resultante diretamente proporcional à concentração do analito na solução.

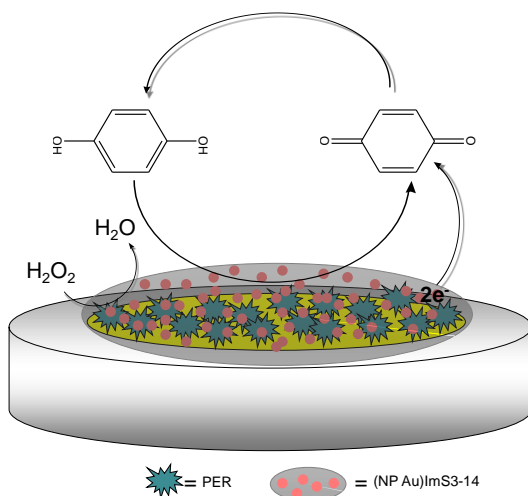


Figura 26. Representação esquemática da oxidação/redução da hidroquinona na superfície do biossensor.

5.1.5. Otimização do Método

Vários parâmetros foram investigados para otimizar a resposta do biossensor proposto utilizando a voltametria de onda quadrada, entre eles a concentração da enzima PER, pH, além dos parâmetros da técnica como frequência, amplitude de pulso e incremento.

5.1.5.1. Concentração de Enzima

A influência do efeito da concentração de PER foi avaliada no intervalo de 32-161 unidades. A resposta analítica do biossensor aumentou com a concentração da enzima até 97 unidades de PER e após atingir o máximo, o valor da corrente exibiu uma ligeira diminuição (Figura 27), que pode ser atribuído aos efeitos tais como um aumento da resistência, o que faz com que a transferência de elétrons seja dificultada, e/ou dependente da concentração de desnaturação na interface. Portanto, a concentração 97 unidades de enzima foi selecionada para construção dos biossensores.

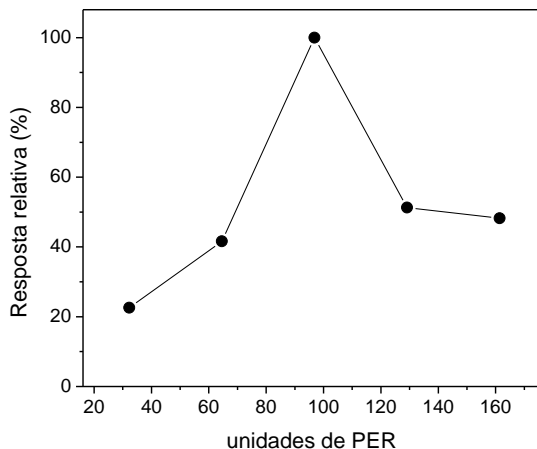


Figura 27. Estudo da concentração de enzima utilizando solução contendo $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona e $7,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de soluções de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

5.1.5.2. Efeito do pH

Uma avaliação do efeito do pH sobre a resposta amperométrica foi investigada (entre 6,0 - 7,5). A resposta do sinal analítico aumentou até pH 7,0 e diminuiu para valores mais elevados de pH, conforme observado na Figura 28, tal como reportado para outros trabalhos utilizando biossensores com PER de extratos enzimáticos (OLIVEIRA *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2007; MAGUERROSKI *et al.*, 2009; MOCCELINI *et al.*, 2010). Sendo assim, escolheu-se solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 para desenvolvimento das etapas posteriores deste trabalho.

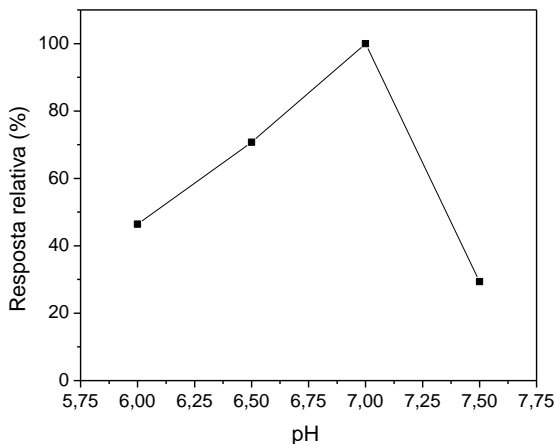


Figura 28. Efeito do pH (6,0 a 7,5) sobre a resposta do biossensor em solução de hidroquinona $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $7,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de soluções de peróxido de hidrogênio.

5.1.5.3. Concentração de Peróxido de Hidrogênio

Outro parâmetro que afeta a resposta do biossensor é a concentração de peróxido de hidrogênio uma vez que é necessário para catalisar a reação. Assim, concentrações de $2,5 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foram investigados utilizando $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de solução de hidroquinona, em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0). De acordo com os resultados apresentados na Figura 29, não foi obtida diferença significativa na resposta na faixa estudada e uma concentração de $7,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foi assim selecionada.

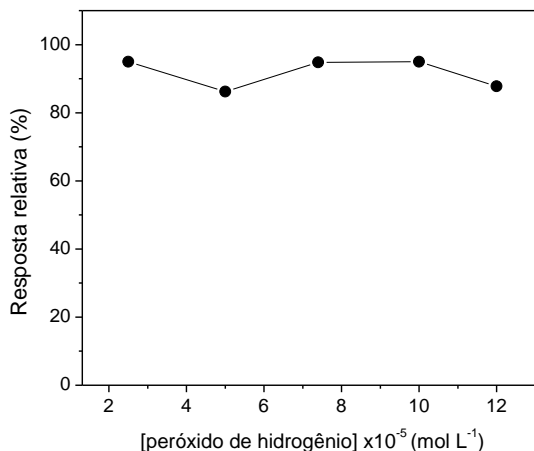


Figura 29. Efeito da concentração do peróxido de hidrogênio sobre a resposta do biossensor utilizando solução contendo $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de hidroquinona em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

5.1.5.4. Parâmetros de Voltametria de Onda Quadrada

A corrente de pico é dependente de vários parâmetros instrumentais como a frequência, amplitude de pulso e incremento de varredura. Assim, os efeitos destes parâmetros sobre a resposta de pico de corrente para $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de hidroquinona em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) foram investigadas para se obter as melhores condições experimentais para o biossensor proposto. A influência da frequência de 10 a 100 Hz foi estudada (Figura 30a). A maior resposta foi obtida para 100 Hz e, portanto, essa frequência foi selecionada para novas experiências. Quando a amplitude do pulso foi variada entre 10 a 100 mV, a corrente de pico aumentou com o aumento da amplitude e alcançou um máximo na faixa linear a 60 mV (Figura 30b), este valor foi, portanto, utilizado para as medições subsequentes. O efeito do incremento de varredura foi investigado no intervalo de 1 a 10 mV. A corrente aumentou linearmente e apresentou menos ruído até 4 mV (Figura 30c), portanto este valor de incremento foi selecionado para os demais estudos. A Tabela 3 resume a faixa de cada variável investigada e os valores selecionados para utilização do biossensor proposto para a hidroquinona.

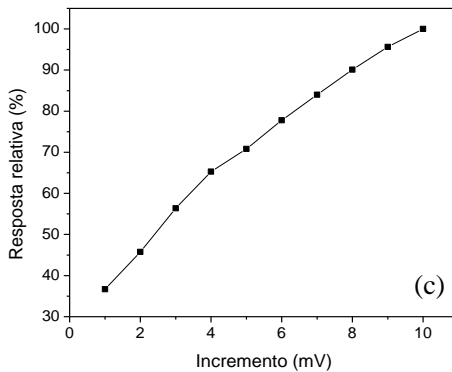
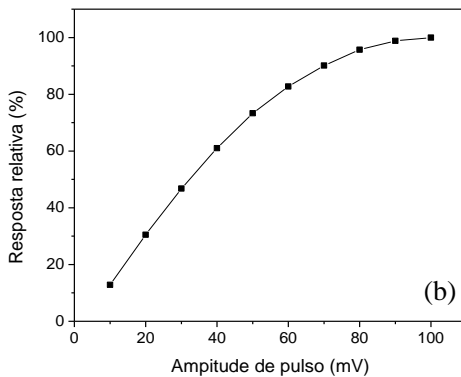
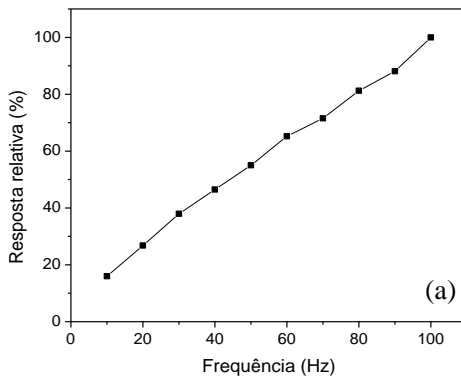


Figura 30. Efeito da (a) frequência, (b) amplitude de pulso e (c) incremento com $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona e $7,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato pH 7,0 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Tabela 3. Parâmetros de otimização do biossensor proposto

Parâmetro	Faixa investigada	Maior resposta
PER (unidades)	32 – 161	97
pH	6,0 – 7,5	7,0
Peróxido de hidrogênio (mol L ⁻¹)	2,5x10 ⁻⁵ – 1,2x10 ⁻⁴	7,4x10 ⁻⁵
Frequência (Hz)	10 – 100	100
Amplitude (mV)	10 – 100	60
Incremento (mV)	1 – 10	4

5.1.6. Curva de Calibração da Hidroquinona

A fim de obter uma maior sensibilidade da resposta eletroquímica e limite de detecção para o eletrodo modificado, a técnica de voltametria de onda quadrada foi utilizada para a construção da curva analítica, aplicando-se as melhores condições previamente otimizadas.

A Figura 31A mostra o perfil dos voltamogramas de onda quadrada obtidos com o biossensor proposto com a adição de volumes sucessivos da solução estoque de hidroquinona e um pico de redução pode ser observado em +0,09 V *vs.* Ag/AgCl.

A curva de calibração apresentou uma faixa de resposta linear de 7,0x10⁻⁷ a 8,5x10⁻⁶ mol L⁻¹ (Figura 31B), que pode ser expressa de acordo com a seguinte equação: $-\Delta i = 0,214 (\pm 0,011) + 1,47 \times 10^5 (\pm 2,16 \times 10^3) [\text{hidroquinona}]$; ($r^2 = 0,9995$), onde Δi é a corrente de pico resultante em μA e $[\text{hidroquinona}]$ é a concentração de hidroquinona em mol L⁻¹. O limite de detecção (3 x desvio padrão do intercepto/inclinação) encontrado foi de 2,0x10⁻⁷ mol L⁻¹.

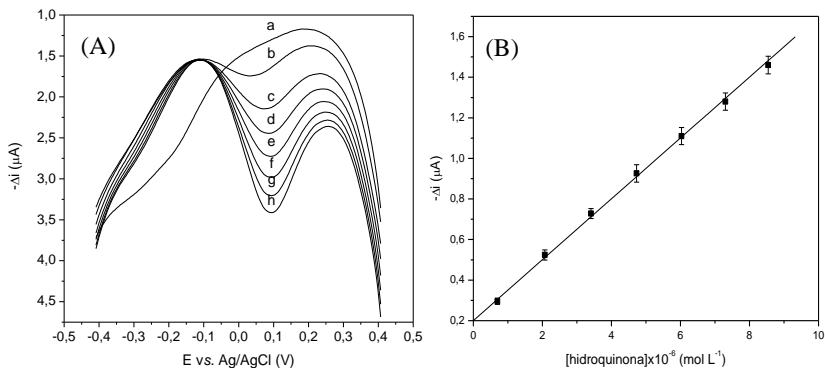


Figura 31. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o biossensor proposto em (a) solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) e soluções de hidroquinona, nas seguintes concentrações: (b) $7,0 \times 10^{-7}$, (c) $2,0 \times 10^{-6}$, (d) $3,4 \times 10^{-6}$, (e) $4,7 \times 10^{-6}$, (f) $6,1 \times 10^{-6}$, (g) $7,3 \times 10^{-6}$, (h) $8,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com uma frequência de 100 Hz, amplitude do impulso 60 mV e incremento de varredura 4 mV. (B) Curva de calibração da hidroquinona.

5.1.7. Repetibilidade, Reprodutibilidade e Estabilidade do Biossensor

O estudo de repetibilidade foi realizado para avaliar o grau de concordância entre cinco medidas sucessivas utilizando o mesmo biossensor em solução contendo $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona e $7,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio em solução de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0). O desvio padrão relativo das correntes de pico resultantes obtidas para a hidroquinona foi de 3,6%.

Quando cinco eletrodos preparados independentemente e de igual modo foram utilizados para a medida de uma solução de $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona, o desvio padrão relativo para a corrente de pico resultante foi de 6,5%. Isso indica que o eletrodo tem boa reprodutibilidade.

A estabilidade do biossensor foi investigada durante um período de 10 dias nos quais o biossensor foi mantido em temperatura ambiente. A corrente de pico resultante para uma solução $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona e $7,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio em solução de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) e durante este período foi estável por 8 dias sem uma mudança significativa na resposta ($\geq 80\%$).

5.1.8. Estudo de Interferentes

Espécies existentes em amostras deste produto dermatológico foram escolhidas para o estudo de interferência (ácido cítrico, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno e metabissulfito de sódio), onde o efeito provocado sobre as respostas de corrente obtidas do biossensor foi investigado através de sucessivas adições dos compostos. O efeito de interferentes na determinação da hidroquinona foi investigado com as razões de concentrações fixadas em 0,1, 1,0 e 10,0. Nenhum efeito significativo de interferência na determinação da hidroquinona foi observado (mudança do sinal <5%) utilizando o biossensor proposto.

5.1.9. Estudo de Recuperação e Determinação de Hidroquinona

Um estudo de recuperação de hidroquinona foi realizado usando duas amostras de formulação farmacêutica com adição de três alíquotas de concentrações de hidroquinona (11,1, 12,0 e 12,8 mg/g). Os resultados obtidos foram comparados com as concentrações adicionadas, como mostra a Tabela 4, e variaram de 98,3 e 104,5%. Estes resultados demonstram uma exatidão satisfatória do biossensor evidenciando que não ocorre a interferência da amostra no método proposto.

Tabela 4. Resultados para recuperação da solução padrão de hidroquinona em formulação farmacêutica usando o biossensor proposto

Amostras	Hidroquinona (mg/g)		Recuperação ^b (%)
	Adicionado	Determinado ^a	
A	11,1	11,6±0,3	104,5
	12,0	11,8±0,1	98,3
	12,8	12,8±0,4	100,0
B	11,1	11,4±0,2	102,7
	12,0	11,8±0,4	98,3
	12,8	12,7±0,1	99,2

^a n = 3; A e B = amostras de hidroquinona.

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

A fim de avaliar a aplicabilidade do sensor proposto, as concentrações de hidroquinona em duas amostras farmacêuticas foram determinadas. As amostras foram preparadas conforme previamente

descrito e quantificadas pelo método da adição de padrão. Os resultados da análise usando este biossensor foram comparados com os obtidos usando o valor rotulado e o método da farmacopeia (UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2008). Como pode ser observado na Tabela 5, os resultados da análise estiveram de acordo com os valores esperados no nível de confiança de 95% quando comparados com os valores rotulados. Assume-se que os excipientes presentes na amostra não afetaram a análise pelo biossensor; no entanto, esses podem ter contribuído para a pouca precisão do método de UV como pode ser visto nesta Tabela 5.

Tabela 5. Determinação de hidroquinona em formulações farmacêuticas usando método padrão e o biossensor proposto

Amostra	Valor rotulado	Hidroquinona (mg/g)		Erro relativo (Er%)	
		Método padrão*	Biossensor*	E _{r1}	E _{r2}
A	20,0	20,8±0,6	19,7±0,5	-1,5	-5,3
B	40,0	36,7±0,8	39,5±0,2	-1,2	7,6

*n = 3; A e B = amostras de hidroquinona; E_{r1} = biossensor vs. valor rotulado; E_{r2} = biossensor vs. método padrão.

A Tabela 6 apresenta um resumo das características analíticas de eletrodos modificados para determinação de hidroquinona descritos na literatura juntamente com o desenvolvido neste trabalho. Pode-se verificar que o limite de detecção do biossensor proposto é comparável ou melhor que os relacionados na Tabela 6, ficando atrás apenas dos sensores usando eletrodos de carbono vítreo contendo hemoglobina imobilizada em nanohastes de Cu₂S/nafion (XU *et al.*, 2012), em grafeno (DU *et al.*, 2011) e em nanotubos de carbono e BMIMPF₆ (BU *et al.*, 2011). Entretanto, seus limites de detecção foram calculados pela razão sinal/ruído, o que gera um limite de detecção com valores bem abaixo da primeira concentração obtida na curva de calibração.

Como pode ser observado, a maioria dos biossensores de pasta de carbono apresentam um maior tempo de vida útil, sendo que sua superfície pode ser renovada quando a camada superficial contendo a enzima estiver passivada ou inativa. Como em eletrodos de ouro ou carbono vítreo a modificação ocorre superficialmente essa renovação não é possível e o tempo de vida útil do eletrodo é fortemente dependente das condições de uso do biossensor. Neste trabalho, apesar

da baixa estabilidade, a facilidade na construção do biossensor justifica sua aplicação.

Tabela 6. Biossensores e eletrodos modificados para determinação de hidroquinona

Composição do biossensor / eletrodo modificado	Faixa linear (mol L ⁻¹)	Limite de detecção (mol L ⁻¹)	Tempo de vida (dias)	Referência
Grafite em pó- nujol- PER	$7,50 \times 10^{-5} - 1,60 \times 10^{-3}$	$8,10 \times 10^{-6}$	210	VIEIRA e FATIBELLO- FILHO, 2000
Grafite em pó- nujol- PER imobilizada em QTS	$2,50 \times 10^{-4} - 5,50 \times 10^{-3}$	$2,00 \times 10^{-6}$	180	OLIVEIRA e VIEIRA, 2006
Grafite em pó- parafina- micropartículas de ouro em sílica - HRP	$5,00 \times 10^{-7} - 4,50 \times 10^{-6}$	$4,00 \times 10^{-7}$	60	ELYACOUBI <i>et al.</i> , 2006
Grafite em pó- nujol – complexo de Cu(II) mimético de catecol oxidase	$6,00 \times 10^{-5} - 2,50 \times 10^{-3}$	$3,00 \times 10^{-7}$	210	OLIVEIRA, <i>et al.</i> , 2007
Eletrodo de ouro- NPs de ouro – nanofibras de carbono	$9,00 \times 10^{-6} - 5,00 \times 10^{-4}$	$8,60 \times 10^{-7}$	7	HUO <i>et al.</i> , 2011
Eletrodo de carbono vítreo – nanotubos de carbono- BMIMPF ₆	$8,00 \times 10^{-7} - 1,06 \times 10^{-5}$	$6,70 \times 10^{-8}$	7	BU <i>et al.</i> , 2011
Eletrodo de carbono vítreo- grafeno	$1,00 \times 10^{-6} - 5,00 \times 10^{-5}$	$1,50 \times 10^{-8}$	21	DU <i>et al.</i> , 2011

Tabela 6. Continuação

Composição do biossensor / eletrodo modificado	Faixa linear (mol L ⁻¹)	Limite de detecção (mol L ⁻¹)	Tempo de vida (dias)	Referência
Grafite em pó- parafina – líquido iônico MPImCl - sílica mesoporosa SBA-15	$5,00 \times 10^{-5} - 5,50 \times 10^{-4}$	$6,00 \times 10^{-7}$	14	DONG <i>et al.</i> , 2012
Eletrodo de carbono vítreo - nanohastes de Cu ₂ S em nafion - hemoglobina	$6,00 \times 10^{-7} - 10,0 \times 10^{-6}$	$3,00 \times 10^{-8}$	30	XU <i>et al.</i> , 2012
Eletrodo de ouro- PER de extrato-surfactante contendo NPs de ouro	$6,96 \times 10^{-7} - 8,54 \times 10^{-6}$	$1,88 \times 10^{-7}$	8	Este trabalho

5.2. BIOSSENSOR DE LACASE IMOBILIZADA EM QUITOSANA PREVIAMENTE RETICULADA COM GENIPINA

5.2.1. Estudo da Atividade Enzimática da LAC

A atividade da LAC foi investigada por espectrofotometria em comprimento de onda de 420 nm, acompanhando-se a oxidação do ABTS. De acordo com o gráfico da atividade enzimática (Figura 32), pode-se calcular a atividade da LAC através do coeficiente angular da reta que corresponde a $\text{Abs } t^{-1}$ e inserir na Equação 2 onde se obtém um valor de atividade de LAC igual a 16,4 unidades por mL do extrato.

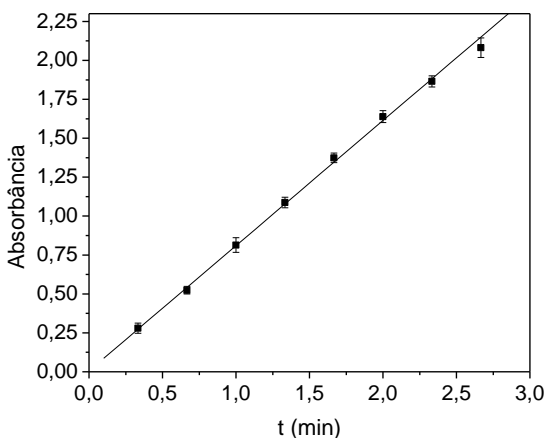


Figura 32. Determinação da atividade enzimática da lacase pelo método espectrofotométrico.

5.2.2. Reticulação da QTS com GNP e Imobilização da LAC

Técnicas de imobilização são necessárias para o desenvolvimento de qualquer biossensor para tentar imitar o ambiente onde as enzimas são encontradas naturalmente (MATEO *et al.*, 2007). A eficiência na imobilização é determinada tanto pelas enzimas quanto pelo material de suporte utilizado. A QTS é um biopolímero natural e propriedades como biodegradabilidade, não toxicidade e biocompatibilidade tornam-na uma matriz promissora para a imobilização de enzimas (DEMIREL *et al.*, 2006; KRAJEWSKA, 2004). Os grupos amino livres na QTS contribuem para a sua reatividade através de interações físicas e

químicas com outros reticulantes (GUPTA e JABRAIL, 2006). Também, a presença de dois grupos hidroxila livres em cada unidade facilita a interação com a proteína (NGAH *et al.*, 2008). Essas modificações com agentes reticulantes proporcionam uma maior estabilidade e resistência à QTS, e ainda diminuem consideravelmente a sua solubilidade (DIACONU *et al.*, 2010; de LIMA *et al.*, 2010).

A GNP, um agente reticulante natural e atóxico, foi usada para reticular a QTS. Em meio neutro, sugere-se que ocorre um ataque nucleofílico de um grupo amino livre da QTS no terceiro carbono olefínico da GNP que leva à abertura do anel di-hidropirânico para formar um grupo aldeído intermediário. Em seguida, a aldoxila reage com a amina secundária formada para gerar o novo heterociclo. Na etapa final da reticulação ocorre uma reação de substituição do grupo éster da genipina por uma amina primária da QTS para a formação com uma ligação amida secundária e subsequente formação de metanol (BUTLER *et al.*, 2003). A reação de ligação cruzada proposta entre a QTS e a GNP pode ser vista na Figura 33.

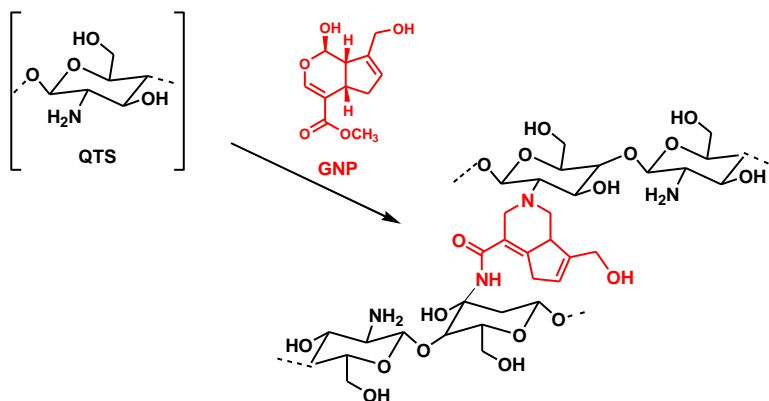


Figura 33. Esquema proposto para reticulação da quitosana com genipina.

Podem ser observadas nas fotografias que a cor inicial ligeiramente amarelada do biopolímero QTS (Figura 34a) tornou-se azulada após a reação com a GNP (Figura 34b), como uma indicação da reticulação. A formação da cor azul é atribuída à reação de polimerização induzida pela presença de radicais de oxigênio que possam conduzir a uma

reticulação entre as moléculas de GNP já ligadas aos grupos amino da QTS que podem levar à formação de copolímeros curtos da genipina (BUTLER *et al.*, 2003).

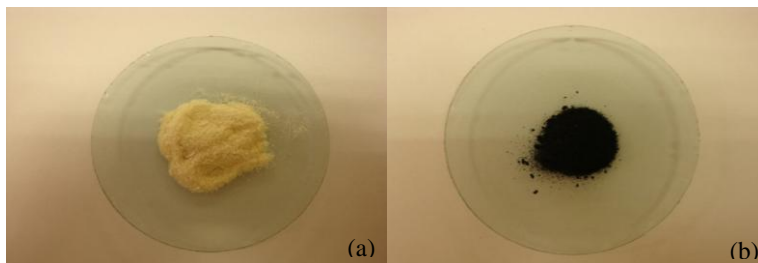


Figura 34. Fotografias da quitosana (a) antes e (b) após a reação de reticulação com a genipina.

O biopolímero reticulado foi analisado por infra-vermelho. A Figura 35 mostra o espectro de infra-vermelho para (a) QTS e (b) QTS/GNP. Para os grupos da QTS, o espectro de infra-vermelho apresentou uma banda de absorção característica entre 3350 e 3100 cm^{-1} referente à sobreposição dos grupamentos NH e OH, 1655 cm^{-1} relativa à carbonila, 1595 cm^{-1} referente ao grupo NH de amina primária, 1550 cm^{-1} referente ao grupo NH de amida secundária e 1079 cm^{-1} relativa ao estiramento assimétrico COC, que são característicos da estrutura do polissacárido QTS. Após a ligação cruzada, houve uma diminuição na intensidade da banda de 1595 cm^{-1} correspondente aos grupos amino primários, e pode ser um indicativo de um consumo destes grupos funcionais durante a reação. Além disso, observou-se um aumento no pico amida próximo de 1655 cm^{-1} , referente à formação de amidas secundárias, como resultado da reação entre os grupos éster da GNP com os grupos amino da QTS (MI *et al.* 2001). O biopolímero reticulado também apresentou um pico adicional em 770 cm^{-1} (CH fora do plano), que está presente apenas na estrutura da GNP, mas não na QTS demonstrando a incorporação deste grupo na reação de reticulação.

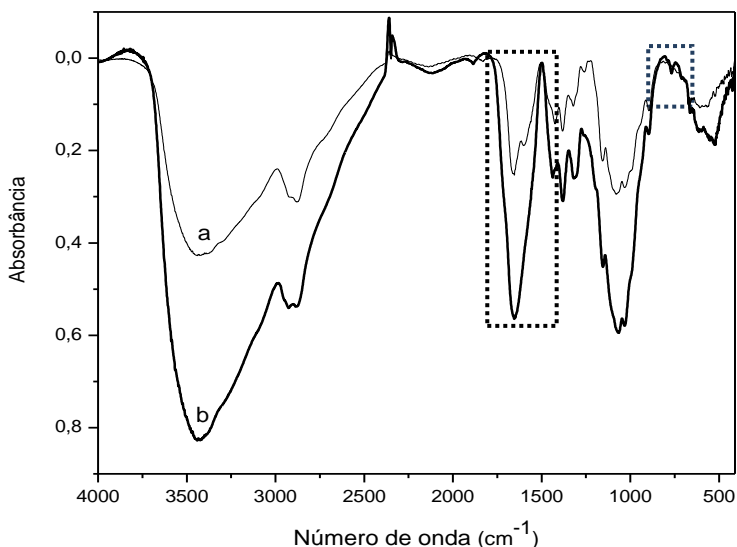


Figura 35. Infravermelho da (a) quitosana e (b) quitosana reticulada com genipina no intervalo de números de onda de 4000-410 cm^{-1} .

Em adição, a QTS reticulada demonstrou ser insolúvel até mesmo em ácido acético concentrado, mais um indicativo da formação da reticulação, sabendo-se que mesmo em solução aquosa de ácido acético (5% v/v) a QTS é totalmente solúvel.

Desta forma a LAC pode estar adsorvida na matriz reticulada que pode funcionar como um ambiente estável para imobilização da enzima, preservando suas características estruturais.

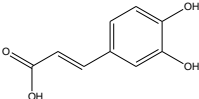
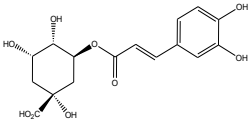
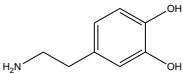
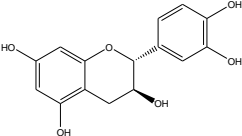
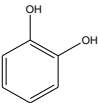
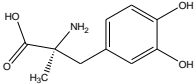
5.2.3. Resposta aos Compostos Fenólicos

A enzima LAC é capaz de catalisar a oxidação de fenóis a sua correspondente *o*-quinona com a redução do oxigênio molecular. Posteriormente, a *o*-quinona pode ser reduzida eletroquimicamente na superfície do biossensor e esta corrente resultante é utilizada como uma resposta para a determinação analítica da concentração do fenol.

Alguns biossensores de LAC vêm sendo utilizados para determinação de diversos analitos (MI *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2004;

SANZ *et al.*, 2005; FRANZOI *et al.*, 2009). Neste trabalho, vários compostos foram selecionados e investigados de modo a determinar o melhor substrato comparando suas respostas. Este estudo foi realizado com soluções dos compostos fenólicos na concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,5). Como pode ser observado na Tabela 7, o biossensor proposto mostrou sensibilidade decrescente (expresso em resposta relativa) na ordem: ácido cafeico (100%), ácido clorogênico (33,5%), dopamina (23,7%), catequina (20,4%), catecol (15,9%) e metildopa (7,6%). Uma vez que o ácido cafeico teve a maior resposta, este foi selecionado para os estudos subsequentes.

Tabela 7. Resposta relativa do biossensor de lacase imobilizada em quitosana reticulada com genipina para diferentes compostos fenólicos

Compostos fenólicos	Estrutura	E (V)	Resposta relativa (%)
Ácido cafeico		+0,23	100,0
Ácido clorogênico		+0,26	33,5
Dopamina		+0,14	23,7
Catequina		+0,24	20,4
Catecol		+0,14	15,9
Metildopa		+0,16	7,6

5.2.4. Resposta Analítica do Ácido Cafeico Usando Diferentes Sensores

O comportamento eletroquímico do biossensor foi investigado para avaliar a eficiência da reticulação para a imobilização de LAC. A resposta dos sensores foi baseada na corrente máxima resultante de uma solução $3,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de ácido cafeico usando voltametria de onda quadrada, em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 3,5). Os dados obtidos são mostrados na Figura 36, em que (a) EPC, (b) LAC-biossensor, (c) LAC-QTS-biossensor e (d) LAC-QTS/GNP-biossensor. A corrente de pico usando o eletrodo LAC-QTS-biossensor correspondeu a 76,8% da resposta do biossensor contendo a enzima imobilizada em quitosana reticulada, enquanto que o LAC-biossensor obteve uma resposta correspondendo a 50,9% do eletrodo selecionado (LAC-QTS/GNP-biossensor) e o EPC obteve uma resposta correspondendo a apenas 9,16%. Como pode ser observado, a enzima LAC adicionada à pasta de carbono promove um aumento da resposta devido às propriedades catalíticas da enzima para a oxidação do substrato fenólico, quando comparado com o EPC. Esta resposta catalítica foi reforçada com a imobilização da enzima neste ambiente e demonstra que a LAC foi eficientemente adsorvida na matriz reticulada de QTS. A resposta obtida com o biossensor de LAC-QTS/GNP mostrou ser um bom procedimento de imobilização da enzima evidenciando a contribuição significativa deste material quando incorporado na pasta de carbono.

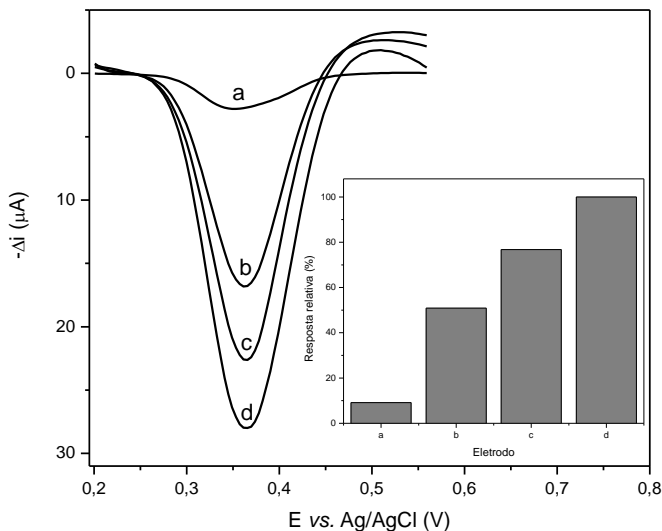


Figura 36. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando (a) EPC, (b) LAC-biossensor, (c) LAC-QTS-biossensor e (d) LAC-QTS/GNP-biossensor obtidos em solução contendo $3,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de ácido cafeico em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 3,5) em frequência de 100 Hz; amplitude de 50 mV e incremento de 4,0 mV. Inseto: respostas relativas de corrente para cada eletrodo.

5.2.5. Otimização do Método

O efeito do pH, concentração da enzima LAC e dos parâmetros da voltametria de onda quadrada como frequência, amplitude de pulso e incremento sobre a resposta do biossensor foram investigados a fim de otimizar o método utilizando uma solução de ácido cafeico $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

5.2.5.1. Efeito do pH

A escolha de um eletrólito de suporte apropriado é essencial para a sensibilidade dos biossensores. Existe um pH ótimo que mantém a atividade máxima e a eficiência da catálise enzimática e, por consequência, o comportamento eletroquímico (ZAPP *et al.*, 2011). O potencial e o pico de corrente para ácido cafeico $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em

solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,0-6,0) foram investigados por voltametria de onda quadrada na frequência de $50,0 \text{ Hz}$, amplitude de pulso de 50 mV e incremento de 5 mV . De acordo com os resultados mostrados na Figura 37a, um aumento do pH leva a um deslocamento dos potenciais para valores mais negativos, com uma inclinação em torno de $-69,0 \text{ mV/pH}$ e $r^2=0,9973$. Isto indica que o mecanismo de oxidação/redução associado para o ácido cafeico é um processo envolvendo dois prótons e dois elétrons, que está muito próximo do valor de Nernst esperado ($59,2 \text{ mV/pH}$) para uma reação envolvendo dois prótons/dois elétrons, tal como descrito em vários estudos relatado na literatura (MANJUNATHA *et al.*, 2010; HOSSEINI *et al.*, 2010; BRONDANI *et al.*, 2012). A resposta relativa da corrente de pico para diferentes valores de pH é mostrada na Figura 37b. A resposta de corrente máxima foi observada em solução tampão acetato pH 3,5 diminuindo para outros valores de pH, estando de acordo com o resultado relatado por Gomes *et al.* (2004) que desenvolveu um biossensor de LAC para vários polifenóis, incluindo o ácido cafeico, e sua aplicação em vinhos tintos. Desta forma, o pH 3,5 foi selecionado para os demais estudos.

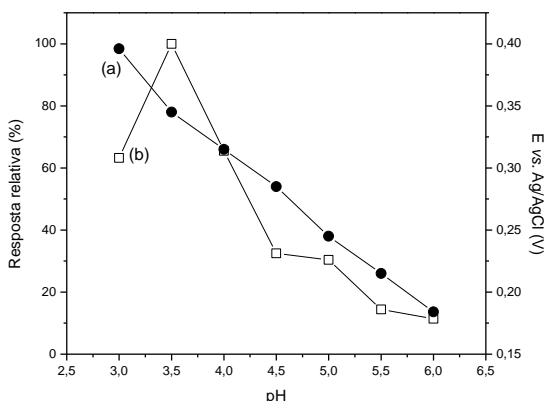


Figura 37. Influência do pH no (a) potencial e no (b) pico de corrente resultante do biossensor proposto em solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 3,0–6,0) contendo ácido cafeico $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando frequência de 50 Hz , amplitude de pulso de 50 mV e incremento de 5 mV .

5.2.5.2. Concentração de Enzima

O efeito da quantidade de LAC (0,1 a 1,0 unidades) imobilizada em QTS reticulada foi otimizada e está apresentada na Figura 38. A resposta analítica do biossensor aumentou até a quantidade equivalente a 0,5 unidades mL^{-1} e diminuiu com valores mais elevados de LAC na pasta. Conseqüentemente, esse valor de unidade de enzima foi escolhido para a construção do biossensor e usado para os próximos estudos.

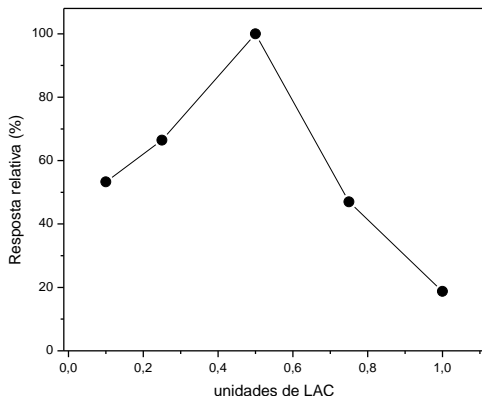


Figura 38. Estudo da concentração de enzima utilizando solução contendo ácido cafeico $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,5).

5.2.5.3. Parâmetros da Voltametria de Onda Quadrada

Os parâmetros de voltametria de onda quadrada (frequência, amplitude de pulso e incremento) foram investigadas e otimizadas de modo a obter um melhor desempenho do biossensor proposto para a resposta relacionada ao ácido cafeico. A influência da frequência na resposta do biossensor foi estudada na faixa de 10-100 Hz. A corrente de pico aumentou com o aumento da frequência e o valor mais elevado (100 Hz) foi utilizado para as medições subsequentes. Posteriormente investigou-se a amplitude de pulso em uma faixa de 10 a 100 mV. A intensidade do pico aumentou linearmente até a amplitude de 50 mV e este valor foi usado em todos os experimentos empregando o eletrodo proposto. A influência do incremento de varredura foi então avaliada entre 1-10 mV e o melhor desempenho na linearidade foi de 4 mV. Todas estas condições experimentais foram escolhidas para as experiências subsequentes e podem ser observadas na Figura 39.

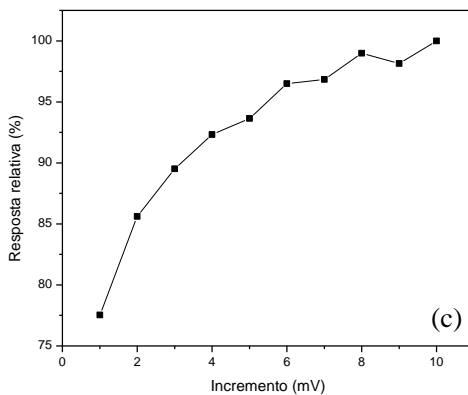
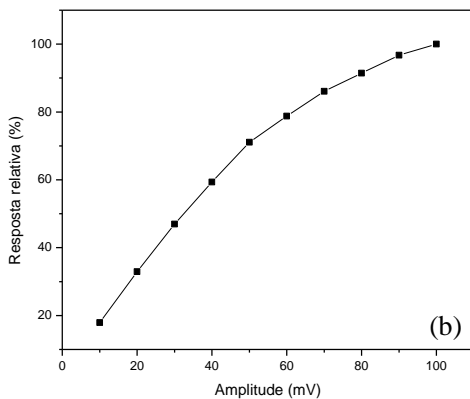
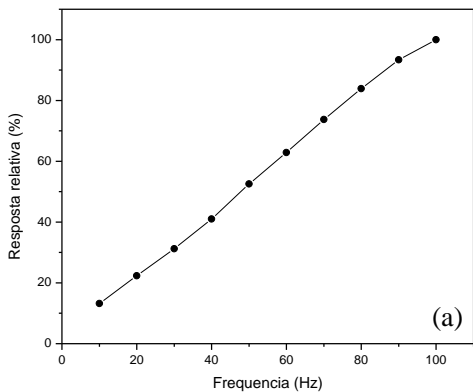


Figura 39. Estudo dos parâmetros de (a) frequência, (b) amplitude de pulso e (c) incremento sobre a resposta analítica do biossensor.

As maiores repostas para cada parâmetro investigado estão resumidas na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros de otimização do biossensor proposto

Parâmetro	Faixa investigada	Maior resposta
LAC (unidades)	0,1-1,0	0,5
pH	3,0-6,0	3,5
Frequência (Hz)	10 – 100	100
Amplitude (mV)	10 – 100	50
Incremento (mV)	1 – 10	4

5.2.6. Curva de Calibração do Ácido Cafeico

A Figura 40 apresenta os voltamogramas de onda quadrada e a curva de calibração para o ácido cafeico aplicando o biossensor proposto nas melhores condições estabelecidas anteriormente em uma faixa de potencial de +0,55 a +0,2 V vs. Ag/AgCl. Ocorre uma relação linear da corrente com a concentração de ácido cafeico entre $2,7 \times 10^{-7}$ a $3,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com um coeficiente de correlação de 0,9983 (n=3), que pode ser expressa pela seguinte equação: $-\Delta i = -0,455 (\pm 0,052) + 8,84 \times 10^5 (\pm 1,14 \times 10^3)$ [ácido cafeico]; onde Δi é a corrente de pico resultante (μA) e [ácido cafeico] é a concentração de ácido cafeico (μmol L⁻¹). O limite de detecção (3 x desvio padrão do intercepto/inclinação) encontrado foi de $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O satisfatório desempenho analítico do biossensor proposto pode ser atribuído a eficiente imobilização da LAC no material polimérico.

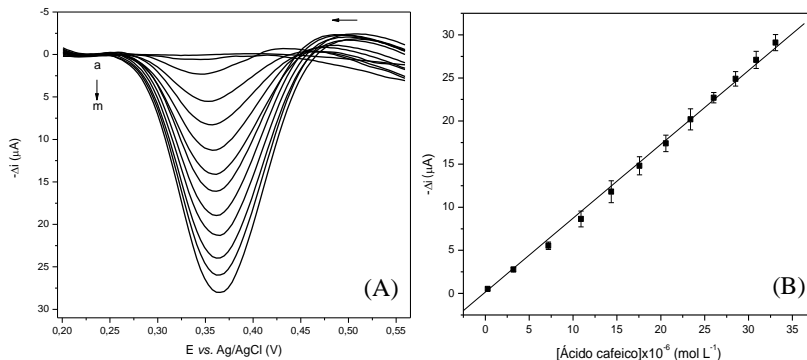


Figura 40. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o biossensor proposto em (a) solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,5) e contendo soluções padrão de ácido cafeico nas seguintes concentrações: (b) $2,7 \times 10^{-6}$, (c) $3,2 \times 10^{-6}$, (d) $7,2 \times 10^{-6}$, (e) $1,1 \times 10^{-5}$, (f) $1,4 \times 10^{-5}$, (g) $1,8 \times 10^{-5}$, (h) $2,1 \times 10^{-5}$, (i) $2,3 \times 10^{-5}$, (j) $2,6 \times 10^{-6}$, (k) $2,8 \times 10^{-5}$, (l) $3,1 \times 10^{-5}$ e (m) $3,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com frequência de 100 Hz, amplitude de pulso de 50 mV e incremento de 4 mV. (B) Curva de calibração para o ácido cafeico.

5.2.7. Repetibilidade, Reprodutibilidade e Estabilidade do Biossensor

A reprodutibilidade de cinco biossensores construídos nas mesmas condições foi avaliada utilizando uma solução de ácido cafeico $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,5). Para este estudo foi avaliado o desvio padrão relativo das correntes de pico resultantes que gerou um valor de 3,0%, indicando que o biossensor possui uma boa reprodutibilidade.

O estudo da repetibilidade para o biossensor proposto foi investigado com 10 medidas usando o mesmo biossensor em solução de ácido cafeico $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,5). Os valores obtidos para as correntes de pico resultantes foram calculados e o desvio padrão relativo para estas medidas foi menor que 3,0%.

A estabilidade é um dos parâmetros essenciais para a viabilidade de qualquer eletrodo. Para esse estudo as medidas foram realizadas a cada 1-8 dias pela avaliação da resposta de corrente para uma solução de ácido cafeico $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O biossensor proposto apresentou estabilidade por 60 dias, nos quais o sensor foi armazenado em

temperatura ambiente. Esta estabilidade pode ser atribuída à forte interação entre a enzima e a matriz da quitosana reticulada que preserva sua atividade catalítica.

5.2.8. Estudo de Interferentes

Algumas espécies presentes em amostras complexas podem afetar a resposta do biossensor, agindo como inibidor, ativador ou até mesmo como substratos secundários da enzima (MELLO *et al.*, 2003). A resposta do biossensor foi investigada na presença de compostos que podem estar presentes nessas amostras (ácido ascórbico, ácido cítrico, glicose e cafeína). As razões de concentrações entre a ácido cafeico e as substâncias concomitantes foram fixadas em 1:0,5, 1:1 e 1:5. Nenhuma destas substâncias interferiu significativamente no desempenho do biossensor (mudança do sinal <10%) o que indica que o método proposto é adequado para a determinação de ácido cafeico expresso em teor de polifenóis totais (TPT) em amostras de erva-mate.

5.2.9. Estudo de Recuperação e Determinação do TPT

O estudo da recuperação foi realizado pelo método de adição de padrão em quatro amostras de erva-mate. Foram adicionadas três alíquotas de soluções padrão de ácido cafeico em concentrações diferentes para cada amostra (0,97, 1,94, 2,92 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e obtendo uma corrente após cada adição de padrão. O percentual de ácido cafeico recuperada usando o biossensor variou de 92,8 a 103,1%, como mostra a Tabela 9 sugerindo a ausência do efeito de matriz nestas determinações.

Tabela 9. Resultados para recuperação da solução padrão de ácido cafeico e estimativa do teor de polifenóis totais em amostras de erva-mate usando o biossensor proposto

Amostras	Ácido cafeico ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	Adicionado	Determinado ^a	Recuperação ^b (%)
A	0,97	1,0 \pm 0,2	103,1
	1,94	2,0 \pm 0,4	103,1
	2,92	2,9 \pm 0,2	99,3
B	0,97	0,9 \pm 0,1	92,8
	1,94	1,9 \pm 0,5	97,9
	2,92	3,0 \pm 0,3	102,7
C	0,97	1,0 \pm 0,4	103,1
	1,94	1,9 \pm 0,1	97,9
	2,92	3,0 \pm 0,3	102,7
D	0,97	1,0 \pm 0,4	103,1
	1,94	1,9 \pm 0,2	97,9
	2,92	2,9 \pm 0,4	99,3

^a n = 3; A, B, C e D = amostras de erva-mate.

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

Além disso, para demonstrar a precisão do biossensor, a estimativa do TPT também foi realizada em erva-mate preparada por infusão. As amostras também foram analisadas pelo método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin–Ciocalteu (WATERHOUSE, 2002). Os resultados obtidos foram expressos em mg de ácido cafeico por mL da infusão. A quantidade encontrada nessas amostras variaram de 1,02 a 1,51 mg/mL de ácido cafeico para o método proposto e 1,80 a 2,10 mg/mL de ácido cafeico para o método espectrofotométrico, como pode ser visto na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados da estimativa do TPT em amostras de erva-mate usando o biossensor proposto e o método espectrofotométrico

Amostra	TPT (mg ácido cafeico/ mL) ^a	
	Folin–Ciocalteu ^a	Biossensor ^a
A	1,80± 0,2	1,02±0,2
B	1,83±0,4	1,06±0,1
C	1,95± 0,4	1,24±0,4
D	2,10± 0,6	1,51±0,2

^an=3; A, B, C e D = amostras de erva-mate.

A enzima LAC catalisa a oxidação de substratos fenólicos orto, meta e para-substituídos (JAROSZ-WILKOŁAZKA *et al.*, 2005) enquanto o reagente de Folin–Ciocalteu pode reduzir outras espécies (aminas aromáticas, dióxido de enxofre, ácido ascórbico, Cu(I) e Fe(II)) levando a um aumento no valor da quantidade de fenóis nas amostras (SANZ *et al.*, 2005; IBARRA-ESCUZIA *et al.*, 2010). No entanto, quando se plota os valores do TPT obtidos com o biossensor contra os resultados obtidos com o método de Folin-Ciocalteu, uma boa correlação de 0,9986 é obtida (Figura 41), o que demonstra que o biossensor proposto permite a estimativa do TPT em amostras de erva-mate. Por ser uma amostra natural, os níveis de fenóis podem variar, entretando ficaram bem próximos dos valores de 0,70-1,60 mg/mL encontrados por MAZZAFERA (MAZZAFERA, 1997). Assim, conclui-se que o método proposto é adequado para esta aplicação.

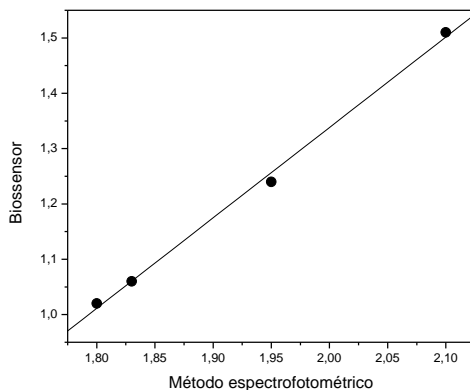


Figura 41. Correlação entre a estimativa do TPT em erva-mate usando o método espectrofotométrico de Folin–Ciocalteu e o biossensor proposto.

A Tabela 11 apresenta biossensores e eletrodos modificados desenvolvidos por diversos pesquisadores para a determinação de ácido cafeico. Pode-se observar que o limite de detecção e a faixa linear do biossensor proposto é comparável ou melhor que os demais relacionados, exceto quando comparado com o eletrodo de ouro modificado com filme de QTS contendo NP de ouro (DI CARLO *et al.*, 2012) e do limite de detecção do eletrodo de carbono vítreo modificado com tirosinase imobilizada em hidrocalcita (HAN *et al.*, 2012).

Além disto, o biossensor proposto apresentou estabilidade superior aos eletrodos de carbono vítreos recobertos com tirosinase imobilizada em hidrocalcita (HAN *et al.*, 2012), que manteve uma estabilidade de 72% depois de um mês, ou em NP de ouro que manteve a resposta por 18 dias (SANZ *et al.*, 2005). O biossensor de tirosinase imobilizada em sal de diazônio sobre a superfície de um eletrodo de ouro impresso apresentou tempo de vida útil de apenas um dia. Neste caso os autores justificaram que o protocolo de preparação do sensor é fácil e rápido (menos de 2h) sendo recomendado prepara-lo diariamente (CORTINA-PUIG *et al.*, 2010) Estabilidades superiores ao biossensor proposto foram obtidas com a enzima lacase imobilizada com um filme polimérico sobre eletrodos impressos (IBARRA-ESCUZIA *et al.*, 2010) e com a enzima peroxidase imobilizada por ligações covalentes em um eletrodo de pasta de carbono (FERNANDES *et al.*, 2006). Nestes dois trabalhos, as enzimas foram ocluídas no filme ou nos interstícios da

quitina reticulada, o que dificulta a lixiviação e inativação enzimática aumentando o tempo de vida útil do biossensor.

Tabela 11. Biossensores e eletrodos modificados para determinação de ácido cafeico

Composição do biossensor / eletrodo modificado	Faixa linear (mol L ⁻¹)	Limite de detecção (mol L ⁻¹)	Tempo de vida (dias)	Referência
Eletrodo de Pt-Ag, AgCl - lacase immobilizada em polietersulfona	$2,00 \times 10^{-6} - 1,4 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^{-6}$	-----	GOMES <i>et al.</i> , 2004
Eletrodo de carbono vítreo - NP ouro - tirosinase	$2,00 \times 10^{-6} - 2,00 \times 10^{-4}$	$6,60 \times 10^{-7}$	18	SANZ <i>et al.</i> , 2005
Eletrodo de carbono vítreo- poli(ácido glutâmico)	$9,00 \times 10^{-6} - 4,00 \times 10^{-5}$	$4,00 \times 10^{-6}$	-----	SANTOS <i>et al.</i> , 2005
Grafite em pó - nujol - PER immobilizada em quitina	$2,00 \times 10^{-5} - 2,00 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-6}$	300	FERNANDES <i>et al.</i> , 2006
Eletrodo impresso - álcool polivinílico - lacase	$5,00 \times 10^{-7} - 1,30 \times 10^{-4}$	$5,24 \times 10^{-7}$	365	IBARRA-ESCUTIA <i>et al.</i> , 2010.
Eletrodo de ouro impresso - diazônio - tirosinase	$3,00 \times 10^{-7} - 8,30 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-7}$	1	CORTINA-PUIG <i>et al.</i> , 2010

Tabela 11. (Continuação)

Composição do biossensor / eletrodo modificado	Faixa linear (mol L ⁻¹)	Limite de deteção (mol L ⁻¹)	Tempo de vida (dias)	Referência
Eletrodo de ouro - nanotubos de carbono e lacase imobilizados em QTS	$7,35 \times 10^{-7} - 1,05 \times 10^{-5}$	$1,51 \times 10^{-7}$	-----	DIACONU <i>et al.</i> , 2010
Eletrodo de carbono vítreo - tirosinase imobilizada em hidrocalcita	$8,88 \times 10^{-7} - 4,44 \times 10^{-4}$	$5,00 \times 10^{-8}$	30	HAN <i>et al.</i> , 2012
Eletrodo de ouro - NP de ouro em QTS	$5,00 \times 10^{-8} - 2,00 \times 10^{-3}$	$2,50 \times 10^{-8}$	-----	DI CARLO <i>et al.</i> , 2012
Grafite em p6 – nujol - LAC imobilizada em QTS	$2,7 \times 10^{-7} - 3,3 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-7}$	60	Este trabalho

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que os eletrodos desenvolvidos possibilitaram a realização da determinação de hidroquinona em amostras farmacêuticas e do TPT em erva-mate através da voltametria de onda quadrada.

Vegetais, frutas e verduras são fontes de várias enzimas que podem ser obtidas e empregadas com sucesso na construção de biossensores. A obtenção da enzima PER de brotos de alfafa apresentou um procedimento simples, de baixo custo, não requer cofatores, além de apresentar alta atividade enzimática. A enzima PER proveniente de brotos de alfafa foi imobilizada com sucesso sobre a superfície do eletrodo de ouro utilizando o surfactante zwitteriônico ImS3-14 contendo NP de ouro. Esse material ofereceu um ambiente biocompatível para imobilização da enzima, visto que garantiu estabilidade de oito dias para o biossensor. Além disso, este primeiro biossensor apresentou características analíticas favoráveis incluindo boa faixa linear, baixo limite de detecção e aplicabilidade na determinação de hidroquinona em razão do aumento na taxa de transferência de elétrons das NP dispersas no surfactante combinando com a seletividade do material biológico. Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelo método proposto e o método oficial e assim, pode-se concluir que o biossensor pode ser utilizado para a determinação de hidroquinona sem efeitos da matriz para estas amostras.

O segundo biossensor aplicado na determinação do TPT foi desenvolvido utilizando a enzima LAC. Para a imobilização desta enzima, a matriz de QTS foi previamente reticulada com GNP, um agente reticulante natural. A reticulação da QTS foi simples e eficiente, fornecendo um ambiente estável para imobilização da enzima, comprovado pela estabilidade do biossensor (60 dias). Estes biossensor em conjunto com a técnica eletroanalítica apresentou ampla faixa linear, baixo limite de detecção e recuperações de ácido cafeico entre 92,8 a 103,1%, demonstrando ausência de efeitos de matriz para estas determinações. Os dados apresentados indicam que a erva-mate pode ser uma importante fonte alimentar de polifenóis e os resultados experimentais demonstraram boa concordância com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu.

Portanto, pode-se destacar que os biossensores propostos aliados às características da técnica de voltametria de onda quadrada são

alternativas atraentes para aplicação em análises e controle de qualidade de formulações farmacêuticas e de produtos alimentícios.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L. T.; da MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 27, 394-400, 2007.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 66, 232-240, 2007.

ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Quim. Nova**, 25, 835-841, 2002.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, 125, 989-1009, 2000.

ARAKI, K. Estratégia supramolecular para nanotecnologia. **Quim. Nova**, 30, 1484-1490, 2007.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Quim. Nova**, 30, 409-414, 2007.

BARROSO, M. F.; DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.; DELERUE-MATOSA, C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Towards a reliable technology for antioxidant capacity and oxidative damage evaluation: Electrochemical (bio)sensors. **Biosen. Bioelectron.**, 30, 1-12, 2011.

BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M. G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.**, 1379, 381-390, 1998.

BRONDANI, D.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Halloysite clay nanotubes and platinum nanoparticles dispersed in ionic

liquid applied in the development of a catecholamine biosensor. **Analyst**, 137, 3732-3739, 2012.

BU, C.; LIU, X.; ZHANG, Y.; LI, L.; ZHOU, X.; LU, X. A sensor based on the carbon nanotubes-ionic liquid composite for simultaneous determination of hydroquinone and catechol. **Colloids Surf., B**, 88, 292-296, 2011.

BUJDUVEANU, M.-R.; YAO, W.; GOFF, A. L.; GORGY, K.; SHAN, D.; DIAO, G.-W.; UNGUREANU, E.-M.; COSNIER, S. Multiwalled carbon nanotube-CaCO₃ nanoparticle composites for the construction of a tyrosinase-based amperometric dopamine biosensor. **Electroanalysis**, 2012. DOI: 10.1002/elan.201200245.

BUNTON, C. A.; NOME, F.; QUINA, F. H.; ROMSTED, L. S. Ion binding and reactivity at charged aqueous interfaces. **Acc. Chem. Res.**, 24, 357-364, 1991.

BUTLER, M. F.; NG, Y.-F.; PUDNEY, P. D. A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. **J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.**, 41, 3941-3953, 2003.

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

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3rd ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000.

CARVALHAL, R. F.; 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**, 17, 1251-1259, 2005.

CHATTERJEE, S.; LEE, D. S.; LEE, M. W.; WOO, S. H. Nitrate removal from aqueous solutions by cross-linked chitosan beads conditioned with sodium bisulfate. **J. Hazard. Mater.**, 166, 508-513, 2009.

CHEN, C.-Y.; YANG, C.-Y.; CHEN, A.-H. Biosorption of Cu(II), Zn(II), Ni(II) and Pb(II) ions by cross-linked metal-imprinted chitosans with epichlorohydrin. **J. Environ. Manage.**, 92, 796-802, 2011.

COUTO, S. R.; HERRERA, J. L. T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnol. Adv.**, 24, 500-513, 2006.

CORTINA-PUIG, M.; MUNOZ-BERBEL, X.; CALAS-BLANCHARD, C.; MARTY, J. L. Diazonium-functionalized tyrosinase-based biosensor for the detection of tea polyphenols. **Microchim. Acta**, 171, 187-193, 2010.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lípases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova**, 27, 623-630, 2004.

DEMIREL, G.; ÖZÇETIN, G.; ŞAHIN, F.; TÜMTÜRK, H.; AKSOY, S.; HASIRCI, N. Semi-interpenetrating polymer networks (IPNs) for entrapment of glucose isomerase. **React. Funct. Polym.**, 66, 389-394, 2006.

DI CARLO, G.; CURULLI, A.; TORO, R. G.; BIANCHINI, C.; DE CARO, T.; PADELETTI, G.; ZANE, D.; INGO, G. M. Green synthesis of gold-chitosan nanocomposites for caffeic acid sensing. **Langmuir**, 28, 5471-5479, 2012.

DIACONU, M.; LITESCU, S. C.; RADU, G. L. Laccase-MWCNT-chitosan biosensor-A new tool for total polyphenolic content evaluation from in vitro cultivated plants. **Sens. Actuators, B**, 145, 800-806, 2010.

DING, C.; ZHANG, M.; ZHAO, F.; ZHANG, S. Disposable biosensor and biocatalysis of horseradish peroxidase based on sodium alginate film and room temperature ionic liquid. **Anal. Biochem.**, 378, 32-37, 2008.

DONG, S.; ZHANG, P.; YANG, Z.; HUANG, T. Simultaneous determination of catechol and hydroquinone by carbon paste electrode modified with hydrophobic ionic liquid-functionalized SBA-15. **J. Solid State Electrochem.**, 16, 3861-3868, 2012.

DU, H.; YE, J.; ZHANG, J.; HUANG, X.; YU, C. Voltammetric sensor based on graphene-modified electrode for simultaneous determination of catechol and hydroquinone. **J. Electroanal. Chem.**, 650, 209-213, 2011.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme Microb. Technol.**, 31, 907-931, 2002.

EASTOE, J.; HOLLAMBY, M. J.; HUDSON, L. Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. **Adv. Colloid Interface Sci.**, 128, 5-15, 2006.

ELYACOUBI, A.; ZAYED, S. I. M.; BLANKERT, B.; KAUFFMANN, J.-M. Development of an amperometric enzymatic biosensor based on gold modified magnetic nanoporous microparticles. **Electroanalysis**, 18, 345-350, 2006.

FARRÉ, M.; KANTIANI, L.; PÉREZ, S.; BARCELÓ, D. Sensors and biosensors in support of EU directives. **Trends Anal. Chem.**, 28, 170-185, 2009.

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

FATIBELLO-FILHO, O.; LUPETTI, K. O.; LEITE, O. D.; VIEIRA, I. C. Electrochemical biosensors based on vegetable tissues and crude extracts for environmental, food and pharmaceutical analysis. Part 1- Fundamentals and applications. In: Salvador Alegret & Arben Merkoçi. (Org.). **Electrochemical sensor analysis**, 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 49, 355-375, 2007.

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

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

FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C.; PERALTA, R. A.; NEVES, A. Development of a biomimetic chitosan film-coated gold electrode for determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid. **Electrochimica Acta** 55, 7152-7157, 2010.

FERNANDES, S. C.; SOUZA, F. D.; SOUZA, B. S.; NOME, F.; VIEIRA, I. C. Gold nanoparticles dispersed in zwitterionic surfactant for peroxidase immobilization in biosensor construction. **Sensors and Actuators B, Chemical** 173, 483-490, 2012.

FERNANDES, S. C.; SANTOS, D. M. P. O.; VIEIRA, I. C. Genipin-cross-linked chitosan as a support for laccase biosensor. **Electroanalysis** 2013, aceito para publicação.

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

FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J. Development of quercetin biosensor through immobilizing laccase in a modified β -cyclodextrin matrix containing Ag nanoparticles in ionic liquid. **Electroanalysis**, 22, 1376-1385, 2010.

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

FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices. **J. Braz. Chem. Soc.**, 13, 456-462, 2002.

GILBERT, H. F. **Basic concepts in biochemistry**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 2000.

- GOMES, S. A. A. S.; REBELO, M. J. F. A new laccase biosensor for polyphenols determination. **Sensors**, 3, 166-175, 2003.
- GOMES, S. A. S. S.; NOGUEIRA, J. M. F.; REBELO, M. J. F. An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. **Biosen. Bioelectron.**, 20, 1211-1216, 2004.
- GOMEZ-PUYOU, M. T. D.; GOMEZ-PUYOU, A. Enzymes in low water systems. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, 33, 53-89, 1998.
- GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. Diferentes estratégias para reticulação de quitosana. **Quim. Nova**, 34, 1215-1223, 2011.
- GRISDANURAK, N.; AKEWARANUGULSIRI, S.; FUTALAN, C. M.; TSAI, W.-C.; KAN, C.-C.; HSU, C.-W.; WAN, M.-W. The study of copper adsorption from aqueous solution using crosslinked chitosan immobilized on bentonite. **J. Appl. Polym. Sci.**, 125, E132-E142, 2012.
- GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures. **Sensors**, 8, 1400-1458, 2008.
- GUO, S.; DONG, S. Biomolecule-nanoparticle hybrids for electrochemical biosensors. **Trends Anal. Chem.**, 28, 96-109, 2009.
- GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman. **Carbohydr. Res.**, 341, 744-756, 2006.
- HAN, X.; SHEN, T.; LOU, H. Dietary polyphenols and their biological significance. **Int. J. Mol. Sci.**, 8, 950-988, 2007.
- HAN, R.; CUI, L.; AI, S.; YIN, H.; LIU, X. QIU, Y. Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized in hydrotalcite-like compounds film for the determination of polyphenols. **J. Solid State Electrochem.**, 16, 449-456, 2012.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6th ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876 p.

HONG-MEI, L.; NICELL, J. A. Biocatalytic oxidation of bisphenol A in a reverse micelle system using horseradish peroxidase. **Bioresour. Technol.**, 99, 4428-4437, 2008.

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

HUO, Z.; ZHOU, Y.; LIU, Q.; HE, X.; LIANG, Y.; XU, M. Sensitive simultaneous determination of catechol and hydroquinone using a gold electrode modified with carbon nanofibers and gold nanoparticles. **Microchim. Acta.**, 173, 119-125, 2011.

IBARRA-ESCUZIA, P.; GÓMEZ, J. J.; CALAS-BLANCHARD, C.; MARTY, J. L.; RAMÍREZ-SILVA, M. T. Amperometric biosensor based on a high resolution photopolymer deposited onto a screen-printed electrode for phenolic compounds monitoring in tea infusions. **Talanta**, 81, 1636-1642, 2010.

ICHI, S. E.; LIMAM, F.; MARZOUKI, M. N. Garlic peroxidase immobilized into chitosan matrix suitable for biosensors applications. **Mater. Sci. Eng.**, C, 29, 1662-1667, 2009.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chem.**, 126, 1821-1835, 2011.

JAROSZ-WILKOŁAZKA, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Amperometric detection of mono- and diphenols at *Cerrena unicolor* laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure. **Talanta**, 66, 1219-1224, 2005.

KARIM, F.; FAKHRUDDIN, A. N. M. Recent advances in the development of biosensor for phenol: a review. **Rev. Environ. Sc. Biotechnol.**, 11, 261-274, 2012.

KLOTZBACH, T. L.; WATT, M.; ANSARI, Y.; MINTEER, S. D. Improving the microenvironment for enzyme immobilization at electrodes by hydrophobically modifying chitosan and Nafion® polymers. **J. Membr. Sci.**, 311, 81-88, 2008.

KONECSNI, K.; LOW, N. H.; NICKERSON, M. T. Chitosan-tripolyphosphate submicron particles as the carrier of entrapped rutin. **Food Chem.**, 134, 1775-1779, 2012.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme Microb. Technol.**, 35, 126-139, 2004.

KUTNER, W.; WANG, J.; L'HER, M.; BUCK, R. P. Analytical aspects of chemically modified electrodes: classification, critical evaluation and recommendation. **Pure Appl. Chem.**, 70, 1301-1318, 1998.

LEE, C.-H.; WANG, S.-C.; YUAN, C.-J.; WEN, M.-F.; CHANG, K.-S. Comparison of amperometric biosensors fabricated by palladium sputtering, palladium electrodeposition and Nafion/carbon nanotube casting on screen-printed carbon electrodes. **Biosens. Bioelectron.**, 22, 877-884, 2007.

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

LEVINGER, N. E. Water in confinement. **Science**, 298, 1722-1723, 2002.

LI, X.; QI, H.; SHEN, L.; GAO, Q.; ZHANG, C. Electrochemical aptasensor for the determination of cocaine incorporating gold nanoparticles modification. **Electroanalysis**, 20, 1475-1482, 2008.

LI, M.; XU, S.; TANG, M.; LIU, L.; GAO, F.; WANG, Y. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase on graphene-modified electrode for electrocatalytic reduction towards H₂O₂. **Electrochim. Acta**, 56, 1144-1149, 2011.

de LIMA, F.; LUCCA, B. G.; BARBOSA, A. M. J.; FERREIRA, V. S.; MOCCELINI, S. K.; FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C. Biosensor based

on pequi polyphenol oxidase immobilized on chitosan crosslinked with cyanuric chloride for thiodicarb determination. **Enzyme Microb. Technol.**, 47, 153-158, 2010.

MACIEL, H. P. F.; GOUVÊA, C. M. C. P.; TOYAMA, M.; SMOLKA, M.; MARANGONI, S. E PASTORE, G. M. Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves. **Quím. Nova**, 30, 1067-1071, 2007.

MAGUERROSKI, K. S.; FERNANDES, S. C.; FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C. Pine nut peroxidase immobilized on chitosan crosslinked with citrate and ionic liquid used in the construction of a biosensor. **Enzyme Microb. Technol.**, 44, 400-405, 2009.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Quím. Nova**, 24, 87-93, 2001.

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

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

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

MAZZAFERA, P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food Chem.**, 60, 67-71, 1997.

MELLO, L. D.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. HRP-based amperometric biosensor for the polyphenols determination in vegetables extract. **Sens. Actuators, B**, 96, 636-645, 2003.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quím. Nova**, 34, 1215-1223, 2011.

MI, F.-L.; SUNG, H.-W.; SHYU, S.-S. Release of indomethacin from a novel chitosan microsphere prepared by a naturally occurring crosslinker: Examination of crosslinking and polycation-anionic drug interaction. **J. Appl. Polym. Sci.**, 81, 1700-1711, 2001.

MIKKELSEN, S. R.; CORTÓN, E. **Bioanalytical Chemistry**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004. 375 p.

MIRESKI, V.; KOMORSKY-LOVRIC, S.; LOVRIC, M. **Square-wave voltammetry: theory and application**. 1st ed. Berlin: Springer, 2007.

MOCCELINI, S. K.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Biosensors based on bean sprout homogenate immobilized in chitosan microspheres and silica for determination of chlorogenic acid. **Enzyme Microb. Technol.**, 43, 381-387, 2008.

MOCCELINI, S. K.; VIEIRA, I. C.; de LIMA, F.; 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**, 82, 164-170, 2010.

MONIER, M.; AYAD, D. M.; WEI, Y.; SARHAN, A. A. Preparation of cross-linked chitosan/glyoxal molecularly imprinted resin for efficient chiral resolution of aspartic acid isomers. **Biochem. Eng. J.**, 51, 140-146, 2010.

NAKASHIMA, N.; ANDO, R.; KUNITAKE, T. Casting of synthetic bilayer membranes on glass and spectral variation of membranebound cyanine and merocyanine dyes. **Chem. Lett.**, 23, 1577-1580, 1983.

NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por "silk-screen". **Quím. Nova**, 21, 614-629, 1998.

NGAH, W. S. W.; HANAFIAH, A. M.; YONG, S. S. Adsorption of humic acid from aqueous solutions on crosslinked chitosan-

epichlorohydrin beads: Kinetics and isotherm studies. **Colloids Surf., B**, 65, 18-24, 2008.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações, **Quim. Nova**, 25, 772-776, 2002.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Immobilization procedures for the development a biosensor for determination of hydroquinone using chitosan and gilo (solanum gilo). **Enzyme Microb. Technol.**, 38, 449-456, 2006.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 41, 366-372, 2006.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; OSÓRIO, R. E.-H. M. B; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. Biomimetic sensor based on a novel copper complex for the determination of hydroquinone in cosmetics. **Sens. Actuators, B**, 122, 89-94, 2007.

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

ONÉSIPPE, C.; LAGERGE, S. Studies of the association of chitosan and alkylated chitosan with oppositely charged sodium dodecyl sulfate. **Colloids Surf., A**, 330, 201-20, 2008.

OSTERYOUNG, J. G.; OSTERYOUNG, R. A. Square wave voltammetry. **Anal. Chem.**, 57, 101A-110A, 1985.

OZMEN, E. Y.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Synthesis and characterization of cyclodextrin-based polymers as a support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 57, 109-114, 2009.

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

PILENI, M.-P; The role of soft colloidal templates in controlling the size and shape of inorganic nanocrystals. **Nat. Mater.**, 2, 145-150, 2003.

PISCITELLI, A.; VECCHIO, C. D.; FARACO, V.; GIARDINA, P.; MACELLARO, G.; MIELE, A.; PEZZELLA, C.; SANNIA, G. Fungal laccases: Versatile tools for lignocellulose transformation. **C. R. Biologies**, 334, 789-794, 2011.

POLAK, J.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A. Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. **Process Biochem.**, 47, 1295-1307, 2012.

QIU, H.; LU, L.; HUANG, X. ’; ZHANG, Z.; QU, Y. Immobilization of horseradish peroxidase on nanoporous copper and its potential applications. **Bioresour. Technol.**, 101, 9415-9420, 2010.

RAFFA, V.; VITTORIO, O.; RIGGIO, C.; CUSCHIERI, A. Progress in nanotechnology for healthcare. **Minimally Invasive Ther.**, 19, 127-135, 2010.

REN, X.; MENG, X.; TANG, F. Preparation of Ag–Au nanoparticle and its application to glucose biosensor. **Sens. Actuators, B**, 110, 358-363, 2005.

REN, X.; CHEN, D.; MENG, X.; TANG, F.; DU, A.; ZHANG, L. Amperometric glucose biosensor based on a gold nanorods/cellulose acetate composite film as immobilization matrix. **Colloids Surf., B**, 72, 188-192, 2009.

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

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. **Analyst**, 122, 11R-34R, 1997.

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chem. Soc. Rev.**, 39, 1747-1763, 2010.

RUSLING, J. F. Liquid crystal surfactant films for electrochemical catalysis. **Microporous Mesoporous Mater.**, 3, 1-16, 1994.

SADIK, O. A.; MWILU, S. K., ALUOCH, A. Smart electrochemical biosensors: From advanced materials to ultrasensitive devices. **Electrochim. Acta**, 55, 4287-429, 2010.

SANTHANAM, N.; VIVANCO, J. M.; DECKER, S. R.; REARDON, K. F. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. **Trends Biotechnol.**, 29, 408-489, 2011.

SANTOS, D. P.; BERGAMINI, M. F.; FOGG, A. G.; ZANONI, M. V. Application of a glassy carbon electrode modified with poly-(glutamic acid) in caffeic acid determination. **Microchim. Acta**, 151, 127-134, 2005.

SANZ, V. C.; MENA, M. L.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, 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. **Anal. Chim. Acta**, 528, 1-8, 2005.

SHU, X. Z.; ZHU, K. J. A novel approach to prepare tripolyphosphate:chitosan complex beads for controlled release drug delivery. **Int. J. Pharm.**, 201, 51-58, 2000.

SHU, X. Z.; ZHU, K. J.; SONG, W. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release. **Int. J. Pharm.**, 212, 19-28, 2001.

SKOOG, D. A; WEST, D. M; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Quim. Nova**, 20, 191-195, 1997.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Quim. Nova**, 26, 81-89, 2003.

SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações. **Quim. Nova**, 27, 790-797, 2004.

SOUZA F. D. **Efeito da adição de sais nas propriedades físico-químicas de micelas normais e reversas formadas por surfactantes dipolares iônicos**. 2012. 101f. Dissertação (Dissertação em Química) - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2012.

SUN, K.; QIU, J.; LIU, J.; MIAO, Y. Preparation and characterization of gold nanoparticles using ascorbic acid as reducing agent in reverse micelles. **J. Mater. Sci.**, 44, 754-758, 2009.

TORTOLINI, C.; FUSCO, M. D.; FRASCONI, M.; FAVERO, G.; MAZZEI, F. Laccase-polyazetidine prepolymer-MWCNT integrated system: Biochemical properties and application to analytical determinations in real samples. **Microchem. J.**, 96, 301-307, 2010.

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. **Ecl. Quim.**, 33, 57-62, 2008.

UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. **USP Pharmacists' Pharmacopeia**, 2nd ed., Port City Press, Rockville, Baltimore, 2008, p.769.

VELASCO-GARCIA, M. N.; MOTTRAM, T. Biosensor technology addressing agricultural problems. **Biosystems Eng.**, 84, 1-12, 2003.

VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O.; ANGNES, L. Zucchini crude extract-palladium-modified carbon paste electrode for the determination of hydroquinone in photographic developers. **Anal. Chim. Acta**, 398, 145-151, 1999.

VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. **Talanta**, 52, 681-689, 2000.

VIEIRA, E. F. S.; CESTARI, A. R.; SANTOS, E. B.; DIAS, F. S. Interaction of Ag(I), Hg(II), and Cu(II) with 1,2-ethanedithiol immobilized on chitosan: Thermochemical data from isothermal calorimetry. **J. Colloid. Interface Sci.**, 289, 42-47, 2005.

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

WANG, F.; HU, S. Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles. **Microchim. Acta**, 165, 1-22, 2009.

WANG, Z.-G.; WAN, L.-S.; LIU, Z.-M.; HUANG, X.-J.; XU, Z.-K. Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 56, 189-195, 2009.

WANG, C.; YUAN, R.; CHAI, Y.; ZHANG, Y.; HU, F.; ZHANG, M. Au-nanoclusters incorporated 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole film modified electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and nitrite. **Biosens. Bioelectron.**, 30, 315-319, 2011.

WANG, Y.; DU, J.; LI, Y.; SHAN, D.; ZHOU, X.; XUE, Z.; LU, X. A amperometric biosensor for hydrogen peroxide by adsorption of horseradish peroxidase onto single-walled carbon nanotubes. **Colloids Surf., B**, 90, 62-67, 2012.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics, in: R.E. Wrolstad (Ed.), **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, John Wiley, New York, 2002 (units I1.1.1–I1.1.8).

WU, Z.; ZHAO, F.; VARCOE, J. R.; THUMSER, A. E.; AVIGNONEROSSA, C.; SLADE, R. C. T. Direct electron transfer of glucose oxidase immobilized in an ionic liquid reconstituted cellulose-carbon nanotube matrix. **Bioelectrochemistry**, 77, 64-68, 2009.

XU, M.; CUI, L.; HAN, R.; AI, S. Amperometric biosensor based on hemoglobin immobilized on Cu₂S nanorods/nafion nanocomposite film for the determination of polyphenols. **Solid State Electrochem.**, 2012. DOI 10.1007/s10008-012-1673-z.

YUAN, C.-J.; WANG, Y.-C.; REIKO, O. Improving the detection of hydrogen peroxide of screen-printed carbon paste electrodes by modifying with nonionic surfactants. **Anal. Chim. Acta**, 653, 71-76, 2009.

ZAKHAROVA, G. S.; UPOROV, I. V.; TISHKOV, V. I. Horseradish peroxidase: modulation of properties by chemical modification of protein and heme. **Biochemistry (Moscow)**, 76, 1391-1401, 2011.

ZAPP, E.; BRONDANI, D.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W. Bioelectroanalytical determination of rutin based on bi-enzymatic sensor containing iridium nanoparticles in ionic liquid phase supported in clay. **Electroanalysis**, 23, 764-776, 2011.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Quim. Nova**, 30, 1469-1479, 2007.

ZHANG, J.; OYAMA, M. A hydrogen peroxide sensor based on the peroxidase activity of hemoglobin immobilized on gold nanoparticles-modified ITO electrode. **Electrochim. Acta**, 50, 85-90, 2004.

ZHANG, X.; GUO, Q.; CUI, D. Recent advances in nanotechnology applied to biosensors. **Sensors**, 9, 1033-1053, 2009.

ZHANG, S.; ZHAO, Y. Facile preparation of organic nanoparticles by interfacial cross-linking of reverse micelles and template synthesis of subnanometer Au-Pt nanoparticles, **ACS Nano**, 5, 2637-2646, 2011.

ZHANG, W.; XIE, G.; LI, S.; LU, L.; LIU, B. Au/CeO₂-chitosan composite film for hydrogen peroxide sensing. **Appl. Surf. Sci.** 258, 8222-8227, 2012A.

ZHANG, L.; CHENG, H.; ZHANG, H.-M.; QU, L. Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase

immobilized in graphene oxide–Nafion nanocomposite film. **Electrochim. Acta**, 65, 122-126, 2012B.

ZHOU, Y. Recent advances in ionic liquids for synthesis of inorganic nanomaterials. **Curr. Nanosci.**, 1, 35-42, 2005.

ZHU, M.; HAN, S.; YUAN, S. β -Cyclodextrin polymer as the immobilization matrix for peroxidase and mediator in the fabrication of a sensor for hydrogen peroxide. **J. Electroanal. Chem.**, 480, 255-261, 2000.