



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

# **INCORPORAÇÃO DE LÍQUIDO IÔNICO E NANOPARTÍCULAS DE OURO NA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSOR PARA ESCULETINA**

**EDUARDO ZAPP**

Florianópolis – SC  
2010

**EDUARDO ZAPP**

**INCORPORAÇÃO DE LÍQUIDO IÔNICO E NANOPARTÍCULAS DE  
OURO NA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSOR PARA ESCULETINA**

Relatório apresentado ao Departamento de  
Química da Universidade Federal de Santa  
Catarina, como requisito parcial da disciplina  
de Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

**Orientadora: Profª Drª Iolanda da Cruz Vieira.**

Florianópolis – SC

2010

**Eduardo Zapp**

**INCORPORAÇÃO DE LÍQUIDO IÔNICO E NANOPARTÍCULAS DE  
OURO NA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSOR PARA ESCULETINA**

Trabalho acadêmico de conclusão de curso julgado adequado para obtenção do grau Bacharel em Química, e aprovado pela Banca Examinadora composta pelos Professores:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Inês Maria Costa Brighente  
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iolanda da Cruz Vieira  
Orientadora

---

Prof. Dr. Daniel Lázaro Gallindo Borges

---

Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira

Florianópolis – SC  
2010

## AGRADECIMENTOS

- ❖ Agradeço inicialmente a Deus por tudo;
- ❖ À minha família, que é a maior responsável pelo que sou e que conquistei até hoje, em especial aos meus pais Leonildo e Cirlene;
- ❖ À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Iolanda da Cruz Vieira pela orientação, incentivo e dedicação durante todo o desenvolvimento deste trabalho;
- ❖ Ao Prof. Dr. Jairton Dupont pela doação dos líquidos iônicos e à pós-doutoranda Carla Weber Scheeren pela síntese, caracterização e contribuição ativa nos trabalhos em colaboração;
- ❖ À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a todos os professores do Departamento de Química, especialmente àqueles que contribuíram para minha formação acadêmica;
- ❖ À minha namorada Daniela pela ajuda, amor e compreensão;
- ❖ Aos meus colegas do Laboratório de Biossensores (LaBios) – Ana, Daniela, Franciele, Sally e Suellen – pela amizade e ajuda prestada;
- ❖ Ao programa PIBIC/CNPq da UFSC pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	iii
Lista de abreviações e siglas.....	iv
RESUMO.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1 Biossensores e eletrodo de pasta de carbono.....	2
2.2 Enzima polifenol oxidase.....	3
2.2.1 <i>Extração e imobilização de enzimas</i> .....	4
2.3 Líquido iônico.....	6
2.3.1 <i>Nanopartículas metálicas em líquido iônico</i> .....	6
2.4 Voltametria.....	7
2.4.1 <i>Voltametria de onda quadrada</i> .....	7
2.4.2 <i>Aplicação de técnicas voltamétricas na determinação de compostos fenólicos</i> .....	8
2.4.1.1 <u>Esculetina</u> .....	8
3 OBJETIVOS GERAIS.....	10
3.1 Objetivos específicos.....	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	11
4.1 Equipamentos e eletrodos.....	11
4.2 Reagentes e soluções.....	12
4.3 Extração da enzima PFO.....	13
4.4 Determinação da atividade da PFO.....	13
4.5 Imobilização da PFO em montmorilonita.....	14

4.6 Construção dos biossensores.....	14
4.7 Medidas eletroquímicas.....	15
4.8 Preparo das amostras e determinação da esculetina.....	15
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
5.1 Escolha da fonte enzimática.....	16
5.2 Imobilização da enzima.....	16
5.3 Investigação dos substratos fenólicos.....	17
5.4 Otimização do biossensor.....	19
5.4.1 Estudo dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.....	19
5.4.2 Efeito do pH sobre a PFO no eletrodo.....	21
5.4.3 Estudo da concentração de PFO no biossensor.....	22
5.5 Incorporação de LI.....	23
5.6 Morfologia dos eletrodos.....	24
5.7 Contribuição da incorporação de Au-BMI.PF <sub>6</sub> .....	26
5.8 Estabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade.....	28
5.9 Curva analítica.....	29
5.10 Estudo de adição e recuperação e determinação de esculetina em chá preto.	30
6 CONCLUSÕES.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS E SUBMISSÃO DE TRABALHO PARA PERIÓDICO.....	36

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Biocomponentes e transdutores empregados na construção de biossensores.....	2
<b>Figura 2.</b>	Representação da estrutura do sítio ativo da enzima polifenol oxidase (PFO).....	4
<b>Figura 3.</b>	Representação esquemática da estrutura da montmorilonita...	5
<b>Figura 4.</b>	Estrutura do líquido iônico hexafluorofosfato de 1- <i>n</i> -butil-3-metilimidazólio (BMI.PF <sub>6</sub> ).....	6
<b>Figura 5.</b>	<b>Figura 5.</b> Sinal de excitação da voltametria de onda quadrada, onde <i>E</i> é o potencial, <i>a</i> é a amplitude de pulso, $\Delta E_s$ é o incremento de varredura de potenciais e $\tau$ período de duração do pulso, 1 representa final do pulso direto e 2 o final do pulso reverso (SOUZA <i>et al.</i> , 2004).....	8
<b>Figura 6.</b>	<b>Figura 6.</b> Estrutura da esculetina (6,7-di-hidroxycumarina).....	9
<b>Figura 7.</b>	Esquema para imobilização enzimática em argilomineral: (A) montmorilonita, (B) PFO e (C) enzima imobilizada.....	17
<b>Figura 8.</b>	Representação da reação enzimática na superfície do eletrodo, mostrando a oxidação da (A) esculetina à (B) <i>o</i> -quinona, e a redução eletroquímica. PFO <sub>oxi</sub> : forma oxidada da polifenol oxidase; PFO <sub>red</sub> : forma reduzida da polifenol oxidase.....	19
<b>Figura 9.</b>	Estudo do efeito da (A) frequência, (B) amplitude e (C) incremento sobre a resposta analítica do biossensor utilizando $8,26 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> de solução de esculetina em tampão fosfato (0,1 mol L <sup>-1</sup> ; pH 7,0).....	21
<b>Figura 10.</b>	Estudo da influência do pH sobre a resposta do biossensor de PFO, utilizando $5,66 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> de solução de esculetina em 0,1 mol L <sup>-1</sup> de tampão acetato (pH 4,0 a 6,0) e em 0,1 mol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato (pH 6,5 a 8,0).....	22
<b>Figura 11.</b>	Estudo da influência da concentração de PFO no biossensor utilizando $5,66 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> de solução de esculetina em tampão acetato (0,1 mol L <sup>-1</sup> ; pH 4,5).....	23
<b>Figura 12.</b>	Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biossensores contendo apenas Nujol (A) e Nujol:LI na proporção de 50:50% (B) como aglutinante.....	25

<b>Figura 13.</b>	Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da pasta de carbono contendo Au-BMI.PF <sub>6</sub> com ampliação de (A) 8000 X e (B) 32000 X e (C) espectro EDS relativo à região mostrada em (B).....	26
<b>Figura 14.</b>	(A) Voltamogramas obtidos para diferentes eletrodos: (a) EPC não modificado, (b) biossensor-Nujol, (c) biossensor-Nujol: BMI.PF <sub>6</sub> , (d) biossensor-Nujol: Au-BMI.PF <sub>6</sub> , usando 1,18x10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> de solução de esculetina em tampão acetato (0,1 mol L <sup>-1</sup> ; pH 4,5), com frequência de 100 Hz, amplitude de 50 mV e incremento de 8,0 mV. (B) Resposta relativa para os eletrodos estudados.....	27
<b>Figura 15.</b>	Comparação da sensibilidade: curvas de calibração obtidas com (A) biossensor-Nujol: Au-BMI.PF <sub>6</sub> e (B) biossensor-Nujol utilizando diferentes concentrações de solução esculetina padrão em tampão acetato (pH 4,5) com frequência de 100 Hz, amplitude de 50 mV e incremento 8,0 mV.....	28
<b>Figura 16.</b>	Estudo da estabilidade do biossensor, usando 1,18x10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> de solução de esculetina em solução acetato (0,1 mol L <sup>-1</sup> ; pH 4,5) com frequência de 100 Hz, amplitude de 50 mV e incremento de 8,0 mV.....	29
<b>Figura 17.</b>	Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto em (a) solução acetato (0,1 mol L <sup>-1</sup> ; pH 4,5) e soluções de esculetina nas seguintes concentrações: (b) 4,04x10 <sup>-7</sup> ; (c) 8,07x10 <sup>-7</sup> ; (d) 2,01x10 <sup>-6</sup> ; (e) 4,00x10 <sup>-6</sup> ; (f) 5,97x10 <sup>-6</sup> ; (g) 7,92x10 <sup>-6</sup> e (h) 9,86x10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup> , com frequência de 100 Hz, amplitude de 50 mV e incremento de 8,0 mV. Inserido curva analítica para esculetina.....	30

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b>	Atividade da PFO em diferentes vegetais.....	16
<b>Tabela 2.</b>	Resposta do biossensor proposto para os substratos fenólicos estudados.....	18
<b>Tabela 3.</b>	Eletrodos modificados com líquido iônico e nanopartículas metálicas reportados na literatura.....	24
<b>Tabela 4.</b>	Estudo de recuperação de esculetina em chá preto.....	31

## Lista de abreviações e siglas

$a$  – Amplitude de pulso

Au-BMI.PF<sub>6</sub> – Nanopartículas de ouro dispersas em líquido iônico hexafluorofosfato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio

Ag/AgCl – Eletrodo de referência prata/cloreto de prata

BMI.BF<sub>4</sub> – Tetrafluoroborato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio

BMI.PF<sub>6</sub> – Hexafluorofosfato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio

$E$  – Potencial de pico

EDS – Espectroscopia de energia dispersiva (inglês: *Energy Dispersive Spectroscopy*)

EPC – Eletrodo de pasta de carbono

LD – Limite de detecção

LI – Líquido iônico

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

NP – Nanopartículas metálicas

NP-LI – Nanopartículas metálicas dispersas em líquido iônico

OMI.PF<sub>6</sub> – Tetrafluoroborato de 1-octil-3-metilimidazólio

PFO – Polifenol oxidase

PFO<sub>oxi</sub> – Forma oxidada da polifenol oxidase

PFO<sub>red</sub> – Forma reduzida da polifenol oxidase

$r$  – Coeficiente de correlação

VEI.BF<sub>4</sub> – Tetrafluoroborato de 1-vinil-3-etilimidazólio

VOQ – Voltametria de onda quadrada (inglês: *Square Wave Voltammetry* – SWV)

$\Delta E_s$  – Incremento de varredura de potenciais

$\Delta i$  – Corrente de pico resultante

$\tau$  – Período

## RESUMO

Neste trabalho realizou-se o desenvolvimento de um biossensor de pasta de carbono contendo polifenol oxidase (PFO) extraída de alho (*Allium sativum* L.) e imobilizada em montmorilonita para a determinação de esculetina. A este sensor foram incorporadas nanopartículas de ouro dispersas em líquido iônico hexafluorofosfato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio (Au-BMI.PF<sub>6</sub>), visando um melhor desempenho analítico. O eletrodo proposto foi construído a partir da composição 70:10:10:10% (m/m/m/m) de pó de grafite, montmorilonita contendo PFO imobilizada, Nujol e Au-BMI.PF<sub>6</sub>, respectivamente. Os parâmetros otimizados para este método a fim de se obter a melhor resposta analítica foram: solução tampão acetato (0,1 mol L<sup>-1</sup>; pH 4,5) como eletrólito suporte, 1500 unidades de PFO imobilizadas em matriz de argilomineral, frequência de 100 Hz, amplitude de 50 mV e incremento de 8 mV, usando voltametria de onda quadrada (VOQ). A curva analítica para esculetina foi obtida nas melhores condições de trabalho do biossensor, apresentando uma linearidade de 4,04x10<sup>-7</sup> a 9,86x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> (r = 0,9997) e limite de detecção de 1,29x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. O estudo de recuperação da esculetina em amostras de chá preto comercial (A e B) variou de 97,5 até 100,5%, indicando que não há interferência significativa de matriz nesta análise; e o teor encontrado desse antioxidante nas amostras A e B foi de 2,5±0,2 e 9,4±0,2 mg 100mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Palavras-chave:** Biossensor, esculetina, nanopartículas de ouro, líquido iônico.

## **1 INTRODUÇÃO**

Biossensores são ferramentas analíticas que possuem em sua arquitetura de construção algum tipo de material biológico (exemplo: enzimas, anticorpos, DNA). Em biossensores enzimáticos, a biomolécula tem o papel de catalisar uma reação envolvida no processo de investigação do analito. Para a aplicação desses biocatalisadores é importante um processo de imobilização desse material biológico em algum sistema que seja capaz de manter sua estabilidade e atividade catalítica. Diversos métodos de imobilização de enzimas são citados na literatura, dentre eles um método simples que é a adsorção física.

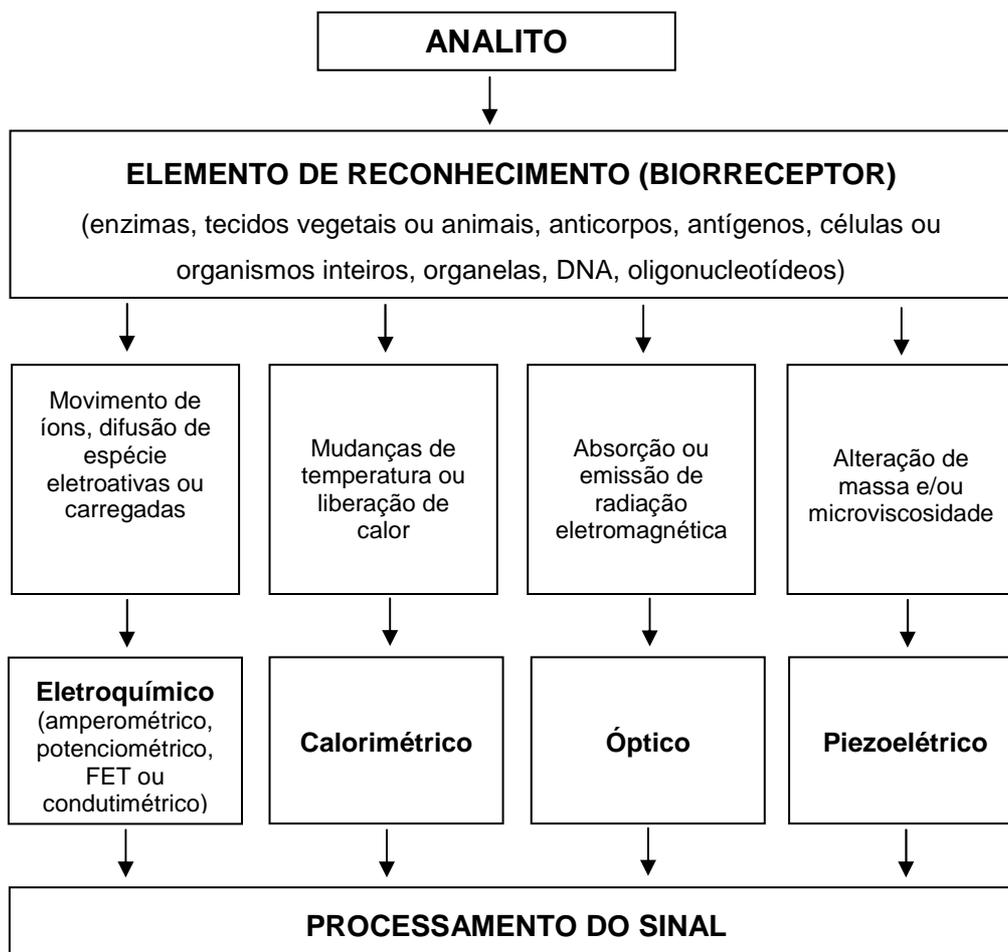
A enzima polifenol oxidase (PFO) pode ser utilizada na construção de biossensores para determinação de compostos fenólicos. Esses compostos encontram-se largamente distribuídos em produtos naturais e industrializados que consumimos. Um exemplo destes compostos é a esculetina (6,7-dihydroxicumarina), um antioxidante de interesse químico, farmacêutico e biológico que pode atuar como bactericida, inibidor para outros metabólitos e na prevenção do câncer.

Assim, tendo em vista o desenvolvimento de um biossensor de pasta de carbono contendo nanopartículas de ouro dispersas em líquido iônico e PFO vegetal imobilizada em montmorilonita, este trabalho tem como finalidade construir um eletrodo sensível e reprodutível para determinação de esculetina em amostras de chá preto comercial, contribuindo para o controle de qualidade deste antioxidante em amostras de interesse alimentício.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Biossensor e eletrodo de pasta de carbono

Um biossensor pode ser definido como um sensor que emprega um material biológico, podendo ser enzimas, anticorpos, DNA, ou quaisquer outras células ou organelas de seres vivos, ligado a um transdutor adequado (KISSINGER, 2005; CAMPÀS *et al.*, 2008). A Figura 1 apresenta esquematicamente os principais biocomponentes e transdutores empregados na construção de biossensores. O funcionamento destes biossensores baseia-se na interação seletiva do analito com o biorreceptor (MELLO e KUBOTA, 2002).



**Figura 1.** Biocomponentes e transdutores empregados na construção de biossensores (traduzido e adaptado de MELLO e KUBOTA, 2002).

Biossensores podem ser construídos com diferentes materiais eletródicos, como ouro, platina ou eletrodo de pasta de carbono (EPC). O desenvolvimento do EPC foi relatado pela primeira vez em 1958 por Adams (ŠVANCARA *et al.*, 2009), sendo composto por uma mistura de pó de grafite e um aglutinante. Uma vasta quantidade de modificadores de origem biológica e sintética (ŠVANCARA *et al.*, 2009; CAMPÀS *et al.*, 2008) agregados a eletrodos tem sido investigada em busca de biossensores cada vez mais sensíveis e seletivos, como por exemplo as enzimas, tanto na sua forma purificada quanto de extrato bruto, sendo denominados de biossensores enzimáticos (VIEIRA *et al.*, 2003). Outros modificadores da pasta são os líquidos iônicos (LI) e os líquidos iônicos com nanopartículas metálicas (LI-NP) usados como aglutinantes, conferindo alta condutividade e elevada taxa de transferência de elétrons para o eletrodo. A literatura oferece um grande número de artigos que relatam o desenvolvimento de biossensores à base de pasta de carbono, sendo alguns exemplos citados a seguir.

Brondani e colaboradores (2009) desenvolveram um biossensor para determinação de adrenalina empregando a enzima lacase e nanopartículas de platina dispersas em LI, obtendo uma faixa linear de  $9,99 \times 10^{-7}$  a  $2,13 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> com um limite de detecção (LD) de  $2,93 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>.

Fernandes *et al.* (2009) desenvolveram um biossensor para determinação de ácido clorogênico empregando a enzima PFO obtida de fruta do conde e nanopartículas de irídio dispersas em LI, obtiveram uma faixa linear de  $3,48 \times 10^{-6}$  a  $4,95 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> com um LD de  $9,15 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>.

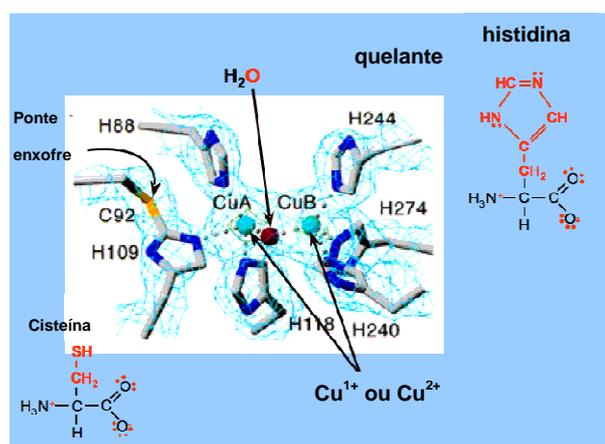
Vieira e coautores (2003) desenvolveram um biossensor para determinação de paracetamol empregando a enzima peroxidase obtida de abobrinha e obtiveram uma faixa linear de  $1,2 \times 10^{-6}$  a  $2,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> com um LD de  $6,9 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>.

## **2.2 Enzima polifenol oxidase**

As enzimas, comumente denotadas de catalisadores biológicos ou biocatalisadores, são formadas por uma associação de pequenas unidades de moléculas, os aminoácidos, o que resulta em uma estrutura tridimensional e longa. O seu poder catalítico é devido à presença de uma região específica

denominada de sítio ativo da enzima, que é o local onde se realiza a ligação com o substrato e se processa a catálise (ROSKOSKI, 1997).

A enzima PFO, também denominada de tirosinase, catecolase ou catecol oxidase, está sistematicamente distribuída na classe das oxidorreduções, sendo encontrada em plantas e também em microorganismos (fungos, bactérias e protozoários). Possui massa molar da ordem de 120 kDa e um sítio ativo contendo dois átomos de cobre coordenados com grupos residuais de histidinas, como representado na Figura 2 (MARKO-VARGA *et al.*, 1995; GAWLIK-DZIKI *et al.*, 2007). Em presença de oxigênio molecular, a PFO é responsável pelo escurecimento de frutas e vegetais devido ao fato de catalisar a oxidação de compostos fenólicos à correspondente quinonas (FREITAS *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Representação da estrutura do sítio ativo da enzima polifenol oxidase (PFO).

### 2.2.1 Extração e imobilização de enzimas

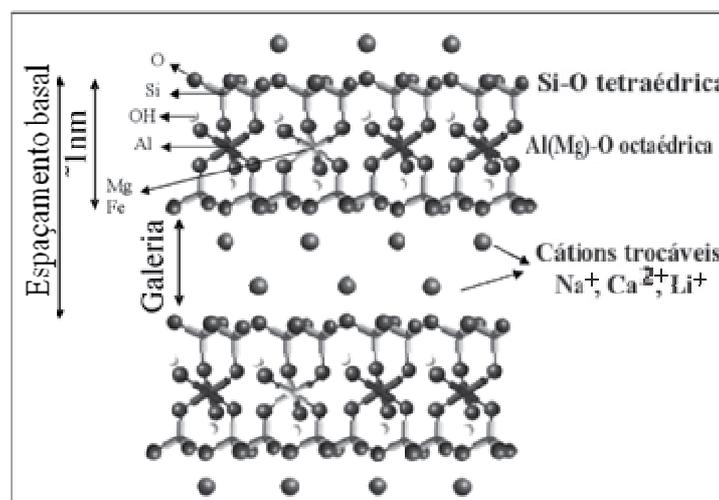
Há grande interesse no uso de extratos brutos e/ou tecidos vegetais como fonte de enzimas em substituição à enzima purificada. A vantagem deste procedimento está na utilização da enzima em seu habitat natural, conferindo-lhe um maior tempo de vida e maior estabilidade (VIEIRA *et al.*, 2003).

A imobilização de enzimas é de extrema importância para aplicação em biossensores, pois o material biológico é muito susceptível à influência do meio reacional quando na forma livre. A literatura descreve diferentes técnicas para

imobilização de enzimas, dentre elas a adsorção física, que assim como outros métodos de imobilização tem como objetivo a manutenção da integridade do sítio ativo da enzima (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007).

A imobilização de enzimas em suportes insolúveis por adsorção é resultado essencialmente de interações de caráter não covalente, tais como interações iônicas, polares, interações de van der Waals, interações de hidrogênio e eletrostáticas. Os materiais usados para tal finalidade são constituídos de uma grande superfície ativa; portanto, devido aos interstícios estruturais e alto poder de adsorção, a montmorilonita apresenta características favoráveis para esta aplicação (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; GHIACI *et al.*, 2009).

A montmorilonita ( $Mx[Al_{2-x}Mgx](Si_4)O_{10}(OH)_2$ ) é um argilomineral e encontra-se disponível comercialmente pela denominação Mont-K10. É uma esmectita composta de camadas de aluminossilicatos, sendo constituída por três folhas intercaladas, isto é, uma central de alumina octaédrica entre duas de sílica tetraédrica, como representado na Figura 3. Este argilomineral quando hidratado tem uma elevada área superficial, podendo atingir até doze vezes o seu tamanho, constituindo-se numa superfície porosa capaz de adsorver outras moléculas por atrações eletrostáticas, devido as suas duas superfícies amplas carregadas negativamente (superfície ácida), enquanto que as bordas são positivas (PAIVA *et al.*, 2008; GHIACI *et al.*, 2009).

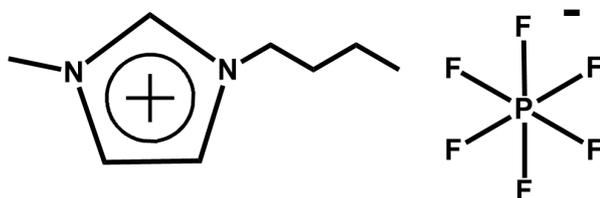


**Figura 3.** Representação esquemática da estrutura da montmorilonita (PAIVA *et al.*, 2008).

## 2.3 Líquido iônico

Líquido iônico (LI) pode ser definido como um composto orgânico com as características de uma substância iônica, tais como a alta condutividade elétrica, porém com a versatilidade de apresentar baixo ponto de fusão, mostrando-se líquido à temperatura e pressão relativamente baixas (condição ambiente). Os LI apresentam propriedades que permitem grande aplicação na área analítica, como ampla janela eletroquímica de potencial, alta condutividade iônica e habilidade catalítica (MUSAMEH e WANG, 2008).

Recentemente, uma série de diferentes LI foi desenvolvida por modificações no cátion ou ânion desses compostos. Pesquisas realizadas por Dupont e colaboradores (DUPONT, 2004) mostraram rotas sintéticas para novos líquidos iônicos, tais como o tetrafluoroborato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio (BMI.BF<sub>4</sub>) e o hexafluorofosfato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio (BMI.PF<sub>6</sub>), sendo este último representado na Figura 4.



**Figura 4.** Estrutura do líquido iônico hexafluorofosfato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio (BMI.PF<sub>6</sub>).

### 2.3.1 Nanopartículas metálicas em líquido iônico

Atualmente nanopartículas metálicas (NP) vêm sendo estabilizadas em líquidos iônicos constituídos pelo cátion 1-*n*-butil-3-metilimidazólio (DASH e SKOTT, 2009). O uso de LI justifica-se pela formação de uma estrutura polimérica de fracas interações que conferem um meio estabilizante para as NP, evitando a coalescência. Quando o LI BMI.PF<sub>6</sub> é empregado na estabilização de NP propõe-se que a presença do ânion PF<sub>6</sub><sup>-</sup> na superfície do

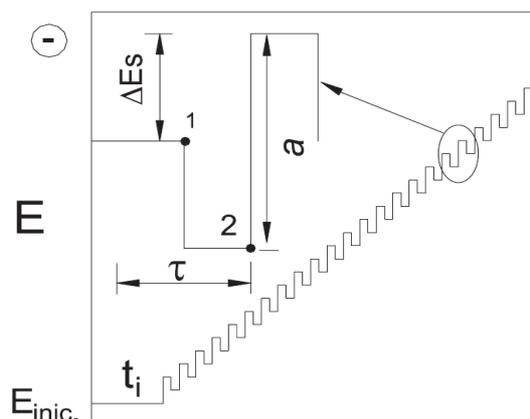
nanomaterial metálico atua na estabilização do mesmo (MIGOWSKI e DUPONT, 2007).

## **2.4 Voltametria**

A voltametria é uma técnica eletroanalítica, que com base nos registros de curvas corrente vs. potencial feitos durante o processo eletroquímico fornece informações sobre a espécie eletroativa. A cela é constituída de um eletrodo de trabalho, sensível ao analito, um eletrodo de referência, para controle do potencial, e um contra-eletrodo, para controle da corrente. Assim, a voltametria encontra aplicações nas mais diversas áreas do conhecimento, tais como a área médica, biológica, química e bioquímica (SOUZA *et al.*, 2004).

### **2.4.1 Voltametria de onda quadrada**

Uma técnica voltamétrica de pulso bastante sensível e rápida é a voltametria de onda quadrada (VOQ) – em inglês “*square wave voltammetry*” (SWV). Nesta técnica, a resposta obtida – pico de corrente resultante ( $\Delta i$ ) – provém da sobreposição de pulsos de potencial de altura  $a$  (amplitude de pulso), a uma escada de potenciais de largura  $\Delta E_s$  (incremento de varredura de potenciais) e duração  $\tau$  (período), representados na Figura 5, sendo esses os três parâmetros relevantes que determinam a sensibilidade e melhor aplicação desta técnica (SOUZA *et al.*, 2004). Assim, a sensibilidade obtida com essa técnica eletroquímica pode ser comparável a de outras técnicas analíticas instrumentais, como as técnicas cromatográficas e espectroscópicas (SOUZA *et al.*, 2004).



**Figura 5.** Sinal de excitação da voltametria de onda quadrada, onde  $E$  é o potencial,  $a$  é a amplitude de pulso,  $\Delta E_s$  é o incremento de varredura de potenciais e  $\tau$  período de duração do pulso, 1 representa final do pulso direto e 2 o final do pulso reverso (SOUZA *et al.*, 2004).

#### **2.4.2 Aplicação de técnicas voltamétricas na determinação de compostos fenólicos**

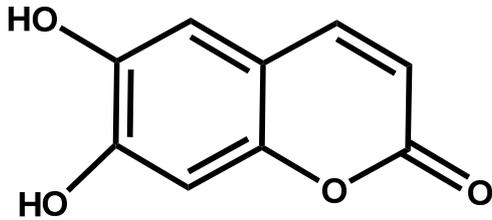
Detecções de compostos fenólicos são relatadas na literatura geralmente através de métodos espectrofotométricos e cromatográficos. Porém, a metodologia eletroquímica vem se tornando bastante difundida, principalmente com a utilização de biossensores ou outros eletrodos modificados, fazendo uso de técnicas como a VOQ no monitoramento desses compostos. Assim como as modernas e sofisticadas técnicas analíticas, as principais vantagens das metodologias voltamétricas são o baixo custo e a rapidez operacional (SOUZA *et al.*, 2004).

##### **2.4.2.1 Esculetina**

A esculetina é um antioxidante que compõe uma classe de compostos fenólicos de interesse químico, farmacêutico e biológico – as cumarinas – sendo encontrada em diferentes partes das plantas, tanto nas raízes como nas flores e frutos (KIM *et al.*, 2008).

A esculetina (6,7-di-hidroxicumarina) é uma cumarina simples bissubstituída, como representado pela Figura 6, devido à presença de dois

grupos hidroxí em posição *orto*. Em adição, um dos principais motivos da importância da quantificação deste metabólito é a sua capacidade antibacteriana, bem como seu poder de atuação como um inibidor para outros metabólitos e na prevenção do câncer (KANEKO *et al.*, 2007).



**Figura 6.** Estrutura da esculetina (6,7-di-hidroxicumarina).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver um biossensor contendo nanopartículas de ouro dispersas em líquido iônico (Au-BMI.PF<sub>6</sub>) e enzima PFO imobilizada em montmorilonita para determinação de esculetina.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar diferentes vegetais para obtenção de extrato contendo a enzima PFO e determinar a atividade enzimática utilizando método espectrofotométrico;
- Imobilizar a enzima PFO vegetal em suporte de montmorilonita;
- Construir o biossensor de pasta de carbono contendo PFO previamente imobilizada e Au-BMI.PF<sub>6</sub>;
- Investigar a resposta do biossensor proposto frente a diferentes substratos fenólicos (metildopa, L-dopa, carbidopa, catequina, fisetina e esculetina);
- Otimizar as condições experimentais do método: pH do eletrólito suporte, concentração de enzima no biossensor, e parâmetros voltamétricos (frequência, amplitude e incremento de potencial);
- Realizar estudos de estabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade do biossensor construído;
- Aplicar o biossensor otimizado no estudo de recuperação e na determinação de esculetina em amostras de chá preto comercial.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Equipamentos e eletrodos**

Para obtenção do extrato enzimático contendo PFO, efetuou-se a homogeneização do vegetal em um liquidificador Black & Decker (modelo IB900), e, posteriormente, a filtração em gaze e, quando necessário, filtração a vácuo com auxílio de um kitassato e funil de Büchner.

A atividade da enzima PFO foi determinada por meio de espectrofotometria visível, utilizando para isso um espectrofotômetro Micronal B 572, com uma cubeta de vidro de 1,00 cm de caminho óptico.

Os eletrodos usados nos estudos voltamétricos foram: o biossensor proposto contendo PFO de alho e Au-BMI.PF<sub>6</sub> como eletrodo de trabalho, um eletrodo de platina com área de 0,5 cm x 1,0 cm como contra-eletrodo (eletrodo auxiliar) e um eletrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) com solução interna de KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>.

As medidas eletroanalíticas foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato da Autolab modelo PGSTAT12, conectado a um microcomputador, e uma cela de vidro com capacidade aproximada de 15 mL, com tampa contendo orifícios circulares para encaixe dos eletrodos e adição das soluções. Foi utilizado um agitador magnético marca Dist (DI-01) para auxiliar na homogeneização da solução de medida.

A caracterização morfológica das pastas de carbono que constituíam os biossensores construídos com diferentes aglutinantes foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca JEOL, modelo JSM 5800, operando sob tensão de 10 e 20 kV e ampliação de 500–16000 X. As amostras de pasta de carbono contendo Au-BMI.PF<sub>6</sub> foram submetidas também à análise elementar por espectroscopia de energia dispersiva (inglês: *Energy Dispersive Spectroscopy* – EDS).

## 4.2 Reagentes e soluções

As soluções usadas neste estudo foram preparadas empregando-se água deionizada como solvente, e todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Soluções tampão fosfato na concentração  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  foram preparadas utilizando-se uma mistura de monohidrogenofosfato e dihidrogenofosfato de potássio (Vetec). O ajuste do pH destas soluções foi realizado na faixa de 6,5 a 8,0, através da adição de hidróxido de sódio (F. Maia) ou ácido fosfórico (Nuclear) conforme necessário.

Soluções tampão acetato na concentração  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  foram preparadas usando-se uma mistura de acetato de sódio (F. Maia) e ácido acético (CRQ). O ajuste do pH destas soluções foi realizado na faixa de 4,0 a 6,0, através da adição de hidróxido de sódio (F. Maia) ou ácido acético.

Solução de catecol (Aldrich) na concentração  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , usada para determinação da atividade da PFO foi preparada através da solubilização de 0,1376 g deste reagente em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0), em um balão volumétrico de 25 mL.

No processo de construção do biossensor foi empregado o pó de grafite (Acheson), e como aglutinante empregou-se uma mistura de Nujol (Aldrich) e líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazol ( $\text{BMI.PF}_6$ ) ou líquido iônico contendo nanopartículas de ouro ( $\text{Au-BMI.PF}_6$ ). O LI  $\text{BMI.PF}_6$  e  $\text{Au-BMI.PF}_6$  (~0,4% de Au) foram sintetizados e caracterizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Jairton Dupont, no Laboratório de Catálise Molecular (LAMOCA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e cedidos ao nosso grupo de pesquisa para realização deste trabalho em colaboração. A montmorilonita sódica, Mont-K10 (Fluka), foi utilizada como suporte para imobilização da enzima.

A solução de esculetina (Aldrich) na concentração  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , empregada como padrão analítico nos estudos de otimização e aplicação do biossensor, foi preparada diariamente a partir da dissolução de 1,8 mg do reagente em água deionizada contendo 30% (v/v) de etanol (Nuclear), em um balão volumétrico de 10 mL, utilizando um banho ultrasônico para homogeneização.

Amostras de chá preto comercial foram obtidas em supermercados de Florianópolis-SC.

### **4.3 Extração da enzima PFO**

Os quatro vegetais selecionados (alho, batata-salsa, carambola e quiabo) foram adquiridos em supermercados de Florianópolis – SC e utilizados como fonte da enzima PFO. Para a obtenção do extrato bruto, pesou-se 25,0 g do vegetal, previamente lavado (no caso da carambola, quiabo e batata-salsa) ou descascado (no caso do alho) e homogeneizou-se em um liquidificador, com a adição de 100 mL de solução tampão fosfato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 7,0). O homogenato obtido foi filtrado em 4 camadas de gaze e, na sequência, em um funil de Büchner sob vácuo. Todas as filtragens foram feitas em banho de gelo para evitar a degradação e, conseqüente, perda da atividade enzimática. A solução filtrada (contendo enzima e os diversos cofatores naturais presentes no vegetal) foi dividida em alíquotas menores, sendo armazenadas sob refrigeração a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , para posterior uso como fonte da PFO na construção dos biossensores.

### **4.4 Determinação da atividade da PFO**

A investigação da atividade enzimática foi realizada pelo acompanhamento da absorbância do produto formado na reação enzimática na presença de catecol. Utilizou-se para isto 0,2 mL da solução do extrato enzimático, 2,8 mL de catecol  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , e depois de homogeneizadas foi acompanhada a cinética enzimática através do comportamento da absorbância em um comprimento de onda de 420 nm durante 2 minutos.

A atividade enzimática – que é medida em unidades  $\text{mL}^{-1}$  ( $\text{U mL}^{-1}$ ) – define-se como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto e é determinada pela equação abaixo (LUPETTI *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

$$A (\text{U mL}^{-1}) = (\Delta\text{Abs} \cdot 1000) / V \Delta t \quad (\text{equação 1})$$

Onde: A = atividade da enzima ( $\text{U mL}^{-1}$ );

$\Delta\text{Abs}$  = variação da absorbância ( $\lambda = 420 \text{ nm}$ );

V = volume do homogenato (mL);

$\Delta t$  = variação do tempo (s).

#### **4.5 Imobilização PFO em montmorilonita**

A imobilização da PFO obtida de alho foi realizada em uma matriz de argilomineral montmorilonita através de adsorção física. Para tal processo, pesou-se 0,02 g do suporte, e adicionou-se um volume do extrato enzimático contendo 1500 unidades mL<sup>-1</sup> de PFO. Uma pasta foi obtida após homogeneização e deixada em repouso por 24 horas para que ocorresse a adsorção da enzima ao suporte.

#### **4.6 Construção dos biossensores**

A construção dos biossensores contendo PFO imobilizada em montmorilonita, e uma proporção 50:50% Nujol: Au-BMI.PF<sub>6</sub> foi realizada em etapas de homogeneização da pasta de carbono pretendida. Primeiramente, foram homogeneizados 140 mg de pó de grafite, 70 % (m/m), e 20 mg do suporte montmorilonita, 10 % (m/m), contendo em sua matriz 1500 unidades de PFO imobilizada, durante 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 20 mg de Nujol, 10 % (m/m), e novamente homogeneizou-se a pasta por mais 15 minutos. E por fim, adicionou-se 20 mg de Au-BMI.PF<sub>6</sub>, com mais 15 minutos de maceração para a completa homogeneização da pasta. Após este procedimento, a pasta de grafite contendo a enzima imobilizada e Au-BMI.PF<sub>6</sub> foi compactada na ponta de uma seringa plástica de 1 mL com 1,0 mm de diâmetro interno. Por último, um fio de cobre de dimensões 0,4 cm x 10,0 cm foi inserido para obtenção do contato elétrico e, então, este biossensor foi usado como eletrodo de trabalho.

O biossensor sem líquido iônico foi preparado de acordo com o mesmo procedimento, utilizando 100% de Nujol como aglutinante.

O biossensor sem nanopartículas de ouro foi preparado de acordo com o mesmo procedimento, substituindo Au-BMI.PF<sub>6</sub> por somente LI BMI.PF<sub>6</sub>.

O EPC não modificado foi preparado de forma similar através da homogeneização de grafite em pó e Nujol em um almofariz com auxílio de um pistilo.

Os biossensores construídos foram estocados em local seco e sob temperatura ambiente quando não estavam sendo utilizados.

#### **4.7 Medidas eletroquímicas**

As medidas eletroquímicas foram obtidas usando uma cela eletroquímica para montagem do sistema de três eletrodos (trabalho, referência, auxiliar) contendo 10 mL de solução tampão acetato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 4,5), usada como eletrólito suporte, juntamente com alíquotas da solução padrão de esculetina. Após um tempo de agitação de 60 segundos para homogeneização da solução, os voltamogramas foram registrados com auxílio do potenciostato. Estas medidas foram empregadas para otimização do método proposto, estudos de reprodutibilidade e repetibilidade, além de estudo de recuperação e quantificação da esculetina em amostras de chá preto.

#### **4.8 Preparo das amostras e determinação da esculetina**

As amostras de chá preto comercial selecionadas foram preparadas por infusão em solução tampão acetato aquecida. Para o preparo de cada amostra, primeiramente, uma massa de 3,0 g do material vegetal foi pesada e transferida para um béquer de 100 mL, subseqüentemente, foi adicionado 50 mL de tampão acetato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 4,5) a uma temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$ . Um vidro relógio foi colocado sobre o béquer e então as amostras deixadas em repouso por 10 minutos para a extração. Transcorrido o tempo de repouso as amostras foram filtradas com auxílio de um funil simples e papel filtro para remover as partículas sólidas. Então, as amostras de chá preto foram apropriadamente armazenadas em frascos âmbar com tampas para posterior quantificação de esculetina usando o biossensor proposto.

A determinação de esculetina nas amostras de chá preto foi realizada através do método de adição de padrão. Alíquotas das amostras previamente preparadas foram transferidas para a cela eletroquímica contendo solução tampão acetato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 4,5) e quantificadas com base nas correntes resultantes obtidas por VOQ, após sucessivas adições de solução padrão de esculetina.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Escolha da fonte enzimática

Os vegetais previamente selecionados como possíveis fontes da enzima PFO foram utilizados para obtenção de um homogenato contendo a enzima e um agregado de co-fatores naturais que favorecem a atividade enzimática. A determinação da atividade da PFO foi feita com o intuito, primeiramente, de escolher o homogenato vegetal com maior atividade enzimática, a fim de aplicá-lo como fonte de PFO na construção do biossensor. Na Tabela 1 são apresentados os resultados referentes à atividade da PFO dos vegetais investigados.

**Tabela 1.** Atividade da PFO em diferentes vegetais

<b>Vegetal</b>	<b>Atividade da PFO (unidades mL<sup>-1</sup>)</b>
Alho	4410
Batata-salsa	855
Carambola	410
Quiabo	30

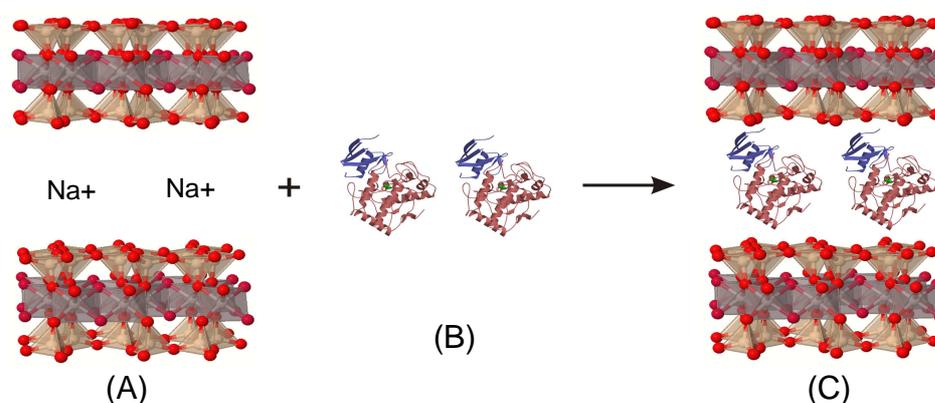
Como evidenciado nos valores expostos na Tabela 1, o vegetal que apresentou maior atividade enzimática para PFO foi o alho, sendo, portanto, o vegetal escolhido como fonte enzimática para a aplicação nos estudos de imobilização e construção do biossensor.

### 5.2 Imobilização da enzima

A técnica de imobilização via adsorção física mostrou-se eficiente, não somente pela simplicidade e facilidade de aplicação do método, mas também se apresentou como uma opção economicamente viável. Além disso, os resultados experimentais demonstraram pouca influência quanto à adsorção do analito e outras substâncias do meio reacional. A imobilização em matriz de argilomineral também conferiu boa estabilidade à PFO, possibilitando a aplicação dos eletrodos por um

maior tempo sem perdas de resposta e sem a necessidade de armazenamento sob refrigeração.

Uma proposta para a imobilização enzimática na matriz de (A) montmorilonita é mostrada na Figura 7, onde a permanência das moléculas de (B) PFO nos interstícios existentes entre a estrutura tridimensional dos tetraedros de sílica e octaedros de alumina se faz por meio de interações intermoleculares do tipo van der Waals e interações de hidrogênio, além de interações eletrostáticas devido à existência de superfícies carregadas dentro da estrutura do argilomineral. A imobilização também é favorecida devido à existência de cátions trocáveis na região interlamelar da montmorilonita.



**Figura 7.** Esquema para imobilização enzimática em argilomineral: (A) montmorilonita, (B) PFO e (C) enzima imobilizada.

### 5.3 Investigação dos substratos fenólicos

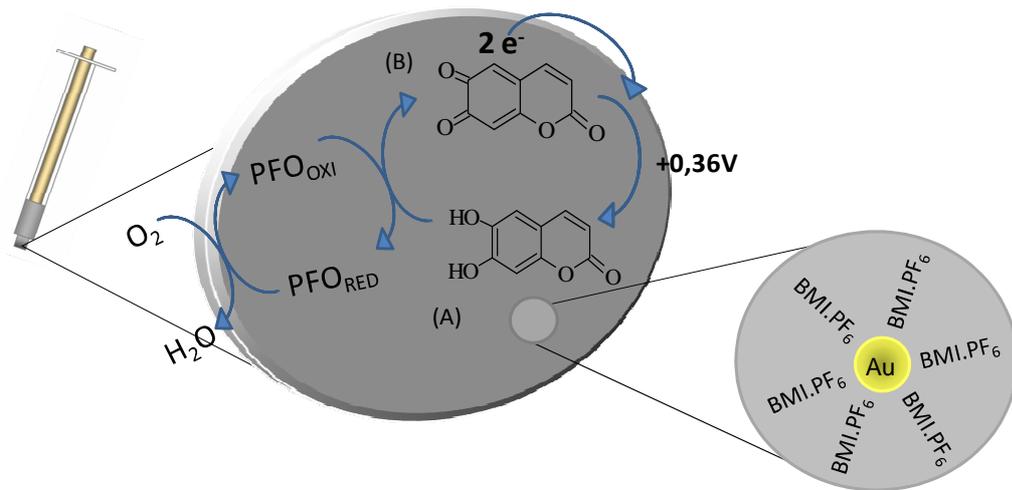
O biossensor construído à base de PFO de alho foi testado quanto à sua seletividade e sensibilidade para seis diferentes substratos fenólicos (metildopa, L-dopa, carbidopa, catequina, fisetina e esculetina). Soluções destes analitos, em iguais concentrações na cela reacional ( $8,26 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), foram analisadas utilizando-se VOQ. Os resultados obtidos para estes analitos foram comparados em relação ao perfil dos voltamogramas e as correntes de resposta, os dados estão dispostos sob a forma de resposta relativa na Tabela 2 juntamente com os potenciais de redução em relação a um eletrodo de referência de Ag/AgCl. Desta forma, a esculetina foi o substrato escolhido para aplicação do biossensor, já que

apresentou a maior corrente de resposta, além de um perfil bem definido no voltamograma.

**Tabela 2.** Resposta e potencial do biossensor proposto para os substratos fenólicos estudados

<b>Substrato</b>	<b>Resposta Relativa (%)</b>	<b>Potencial (V)</b>
Esculetina	100,0	+0,36
Fisetina	98,2	+0,13
Catequina	61,5	+0,15
Metildopa	26,9	-0,10
Carbidopa	17,5	-0,21
L-Dopa	16,6	-0,18

Uma proposta do mecanismo de oxidação e redução da esculetina na superfície do eletrodo, na presença de oxigênio, está ilustrada na Figura 8. As moléculas de PFO na superfície do eletrodo são oxidadas pelo oxigênio e, posteriormente, são reduzidas na presença de esculetina. Durante esta última reação, a esculetina é convertida na sua respectiva *orto*-quinona, sendo esse produto (usualmente eletroativo) reduzido eletroquimicamente na superfície do eletrodo em potencial +0,36 V vs. Ag/AgCl, conforme previamente estudado através de VOQ. A corrente elétrica resultante do processo de redução (corrente catódica) é proporcional à concentração de esculetina presente na solução na qual o eletrodo está imerso.



**Figura 8.** Representação da reação enzimática na superfície do eletrodo, mostrando a oxidação da (A) esculetina à (B) *o*-quinona, e a redução eletroquímica. PFO<sub>oxi</sub>: forma oxidada da polifenol oxidase; PFO<sub>red</sub>: forma reduzida da polifenol oxidase.

#### 5.4 Otimização do biossensor

O biossensor à base de pasta de carbono contendo Au-BMI.PF<sub>6</sub> e PFO imobilizada em montmorilonita foi otimizado para aplicação na determinação de esculetina. Primeiramente, estudaram-se os parâmetros referentes à técnica de VOQ, como frequência, amplitude e incremento de potencial. Em seguida, investigou-se a influência do pH do eletrólito suporte sobre a resposta do biossensor, e também o efeito da concentração da enzima no eletrodo.

##### 5.4.1 Estudo dos parâmetros da voltametria de onda quadrada

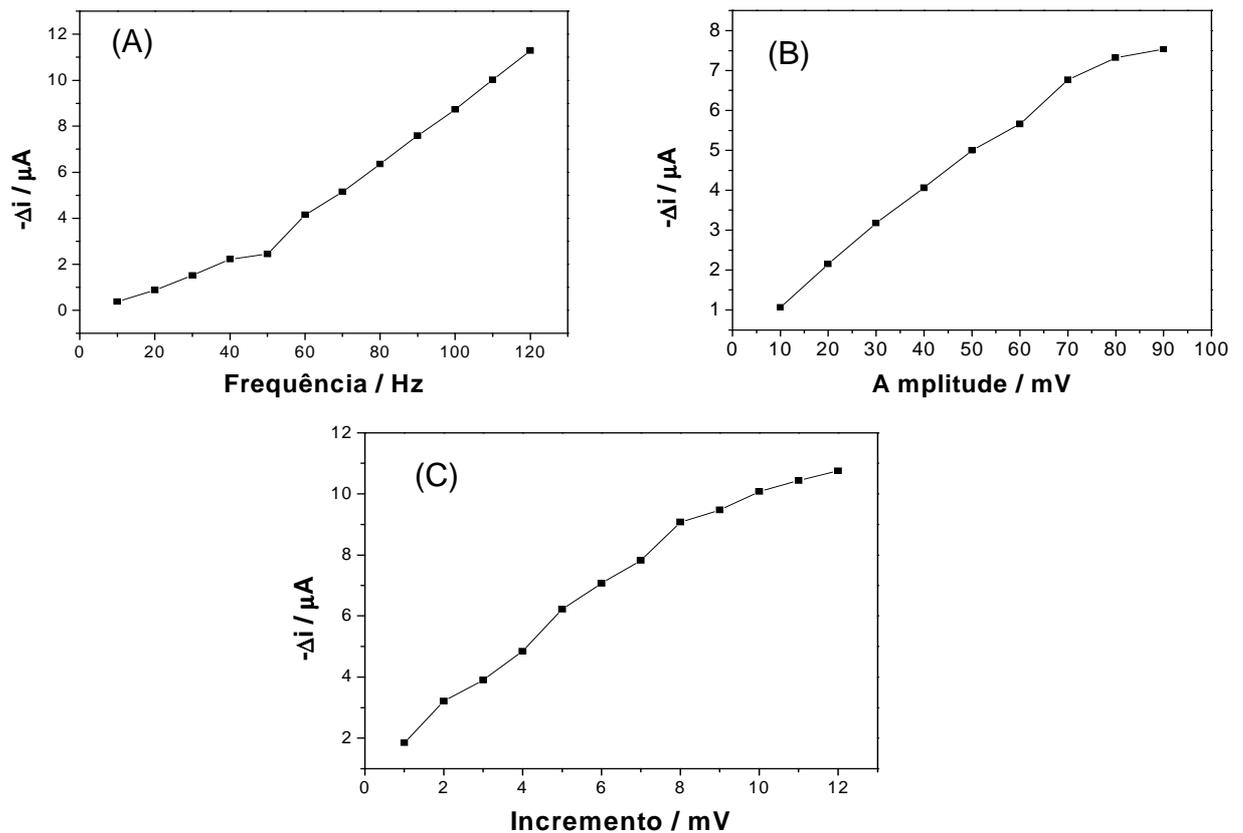
O estudo dos parâmetros da VOQ é de considerável importância, pois é a partir do ajuste de valores de frequência, amplitude e incremento que se obtém voltamogramas mais estreitos (melhor resolução) e com maior valor de corrente (resposta analítica), atingindo um melhor desempenho do biossensor.

O efeito da frequência foi estudado em intervalo de 10 a 120 Hz sobre a resposta do biossensor em  $8,26 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de solução de esculetina em tampão fosfato (0,1 mol L<sup>-1</sup>; pH 7,0), usando uma amplitude de potencial de 50 mV e incremento de 6 mV, os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 9-A. Observa-

se um aumento relativamente linear da resposta do biossensor com o aumento dos valores de frequência. Porém, em frequências muito altas houve o aparecimento de ruídos nos voltamogramas, portanto 100 Hz foi o valor selecionado para os estudos posteriores.

Outro parâmetro importante a ser otimizado nessa técnica eletroanalítica é a amplitude do pulso de potencial aplicado. O efeito da variação desse parâmetro foi estudado em uma faixa de 10 a 120 mV usando  $8,26 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de solução de esculetina em tampão fosfato, frequência de 100 Hz e incremento de 8 mV. Os resultados deste estudo são mostrados na Figura 9-B, onde se pode observar um aumento linear até 50 mV, havendo depois uma saturação no valor de resposta, por isso selecionou-se 50 mV como valor ideal de amplitude para os estudos seguintes.

O incremento de potencial foi também otimizado através de um estudo no intervalo de 1 a 12 mV. As respostas do biossensor frente a estas variações de incremento são apresentadas na Figura 9-C, sendo as análises realizadas em  $8,26 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de solução de esculetina, frequência de 100 Hz e amplitude de 50 mV. Houve um aumento das correntes com a elevação dos valores de incremento, contudo selecionou-se 8 mV para os estudos, pois acima deste valor o acréscimo de corrente não era mais tão pronunciado.

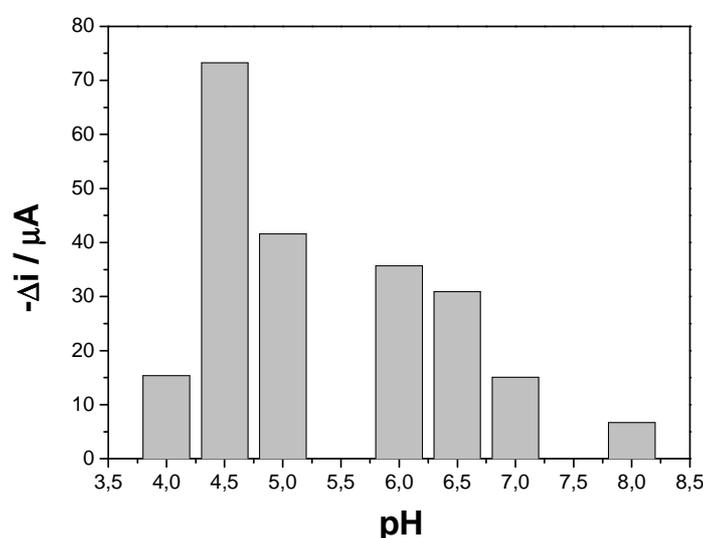


**Figura 9.** Estudo do efeito da (A) frequência, (B) amplitude e (C) incremento sobre a resposta analítica do biossensor utilizando  $8,26 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de solução de esculetina em tampão fosfato (0,1 mol L<sup>-1</sup>; pH 7,0).

#### 5.4.2 Efeito do pH sobre a PFO no eletrodo

As enzimas são moléculas cujo comportamento é afetado significativamente pelo pH do meio em que estão atuando. Em geral, as enzimas possuem um pH ótimo no qual a atividade e a velocidade das reações se tornam máximas, além da variação do estado de ionização das moléculas com a variação do pH do meio (HILAL *et al.*, 1999). Portanto, levando em consideração essa dependência de pH das enzimas, fez-se um estudo a fim de avaliar a influência desse parâmetro na atuação da PFO imobilizada contida no biossensor. Foram feitas análises em uma faixa de pH que variou de 4,0 a 8,0, investigando-se o perfil dos voltamogramas de onda quadrada encontrados, assim como o valor da corrente de resposta.

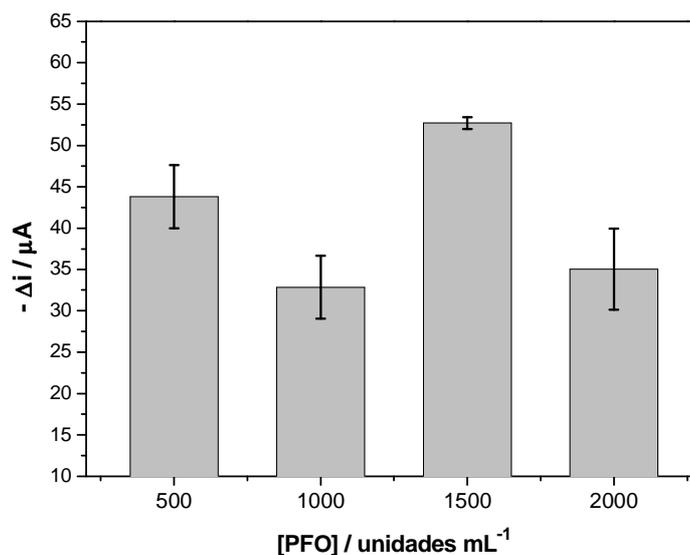
Para a realização deste estudo foi usado  $5,66 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de solução de esculetina preparada em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de tampão acetato (pH 4,0 a 6,0) ou em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato (pH 6,5 a 8,0). Os resultados estão apresentados na Figura 10, onde se pode verificar uma forte influência do pH na resposta do biossensor de PFO. A maior resposta foi alcançada em pH 4,5, sendo, portanto, este valor de pH escolhido para os estudos subsequentes. Além disso, é importante destacar que alterações de pH podem afetar de forma significativa as enzimas que se encontram na forma livre, podendo inclusive ocorrer a perda de atividade das mesmas; contudo, as enzimas imobilizadas apresentam uma maior resistência a variações de pH do meio.



**Figura 10.** Estudo da influência do pH sobre a resposta do biossensor de PFO, utilizando  $5,66 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de solução de esculetina em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de tampão acetato (pH 4,0 a 6,0) e em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato (pH 6,5 a 8,0).

#### 5.4.3 Estudo da concentração de PFO no biossensor

O efeito da concentração da enzima imobilizada em montmorilonita foi estudado para a otimização da construção dos biossensores. Foram preparados eletrodos contendo de 500 a 2000 unidades mL<sup>-1</sup> de solução do extrato imobilizado no suporte. Os valores de corrente de pico resultante ( $-\Delta i$ ) obtidos em  $5,66 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de solução de esculetina para os biossensores construídos com diferentes concentrações de enzima são mostrados na Figura 11.



**Figura 11.** Estudo da influência da concentração de PFO no biossensor utilizando  $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de solução de esculetina em tampão acetato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 4,5).

Os resultados das medidas voltamétricas mostrados na Figura 11 evidenciam uma maior resposta para o biossensor contendo 1500 unidades de enzima, sendo, portanto esta a concentração de PFO imobilizada selecionada para os demais estudos.

### 5.5 Incorporação de LI

A escolha do metal nanoparticulado disperso em BMI.PF<sub>6</sub>, assim como a proporção de líquido iônico adicionado juntamente com o Nujol na construção dos eletrodos seguiu o que já foi relatado em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa (BRONDANI *et al.*, 2009; FRANZOI *et al.*, 2009 A). Como descrito por Franzoi *et al.* (2009 A) em um estudo realizado com NP de diferentes metais dispersas em BMI.PF<sub>6</sub>, foi obtida uma melhor resposta analítica para os biossensores modificados com NP de ouro. Um estudo semelhante foi realizado por Brondani *et al.* (2009) e Franzoi *et al.* (2009 A) no que diz respeito à proporção entre Nujol e LI (ou NP-LI) empregada na construção de biossensores, no qual foi constatada uma melhor resposta dos eletrodos usando a proporção de 50:50% (m/m) de Nujol:LI.

A Tabela 3 reporta alguns trabalhos já descritos na literatura empregando NP-LI como materiais modificadores no desenvolvimento de eletrodos.

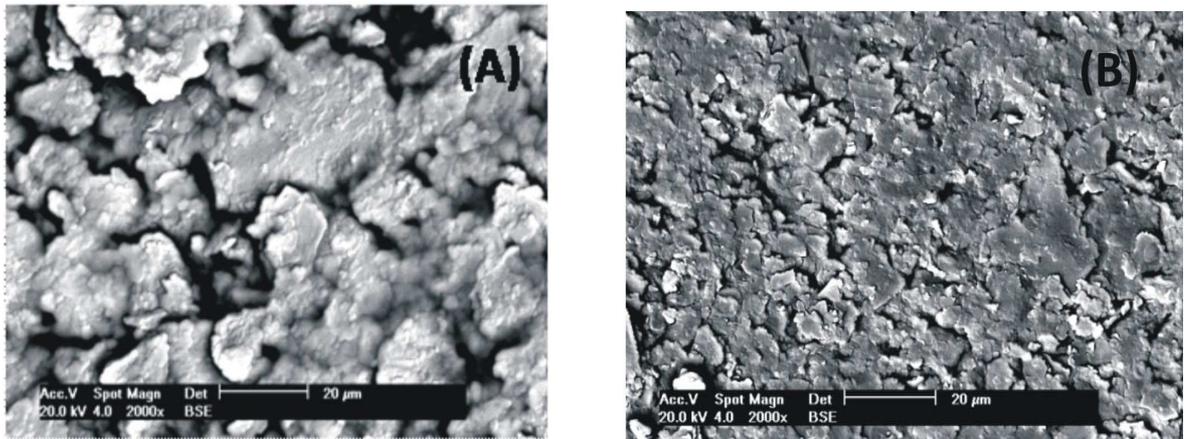
**Tabela 3.** Eletrodos modificados com líquido iônico e nanopartículas metálicas reportados na literatura

<b>Analito</b>	<b>Líquido iônico</b>	<b>Nanopartícula metálica</b>	<b>Limite detecção</b>	<b>Referência</b>
Luteolina	BMI.PF <sub>6</sub>	Ouro	0,028 µM	FRANZOI <i>et al.</i> , 2009 A
Ácido clorogênico	BMI.PF <sub>6</sub>	Írídio	0,915 µM	FERNANDES <i>et al.</i> , 2009
Luteolina	BMI.PF <sub>6</sub>	Prata	0,054 µM	FRANZOI <i>et al.</i> , 2009 A
Cloranfenicol	OMI.PF <sub>6</sub>	Ouro	0,005 µM	XIAO <i>et al.</i> , 2007
Adrenalina	BMI.PF <sub>6</sub>	Platina	0,293 µM	BRONDANI <i>et al.</i> , 2009
Glicose	VEI.BF <sub>4</sub>	Platina	10 µM	CHU <i>et al.</i> , 2010

### 5.6 Morfologia dos eletrodos

A incorporação de LI na construção de biossensores à base de pasta de carbono, principalmente em substituição a outros aglutinantes, reflete com grande significância na morfologia adquirida pela pasta, isto é reafirmado em trabalhos relatados na literatura (FRANZOI *et al.*, 2009 B; FERNANDES, 2009).

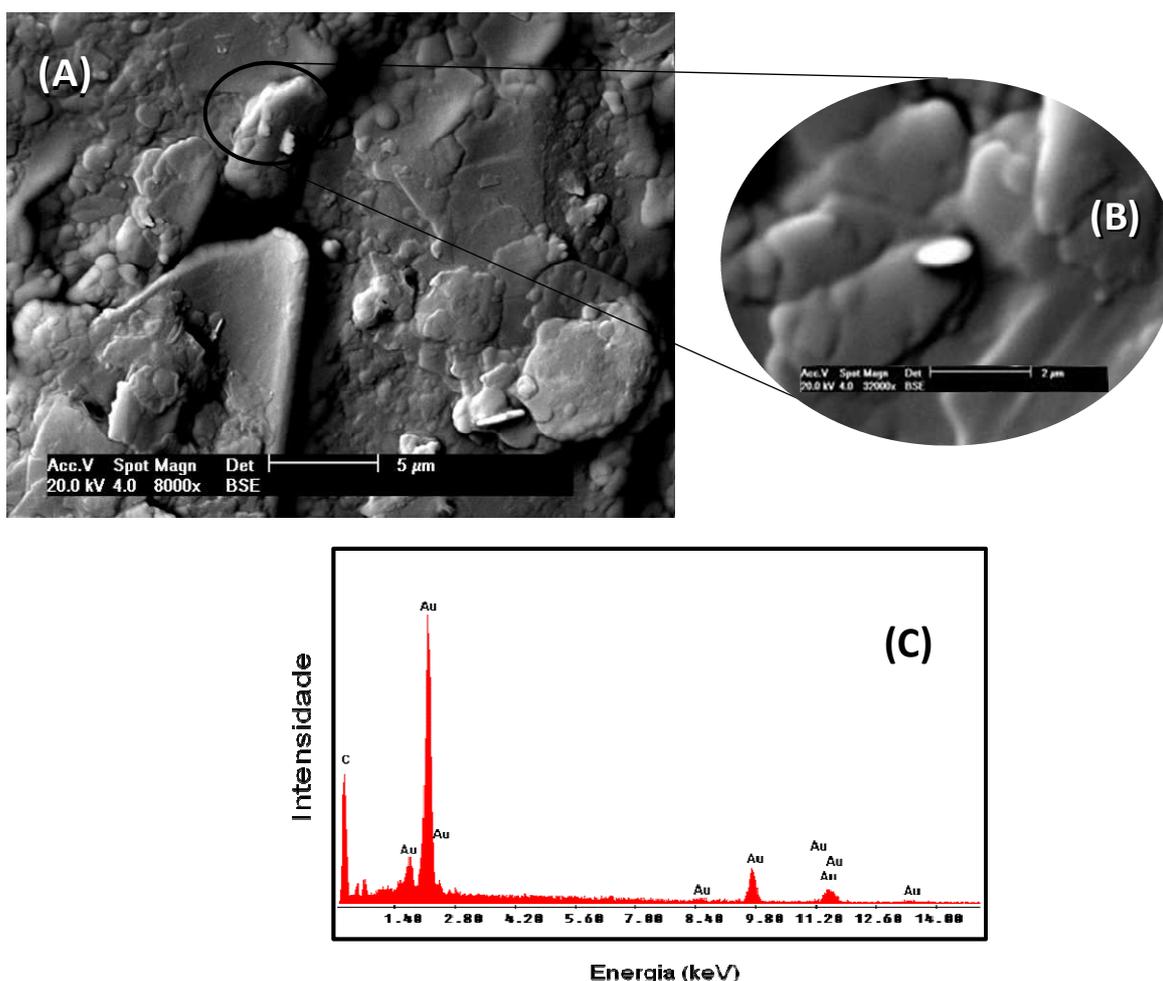
Essa alteração encontrada na morfologia da pasta é confirmada por imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), como apresentado na Figura 12, onde (A) corresponde ao biossensor contendo apenas Nujol como aglutinante e (B) refere-se ao biossensor contendo uma mistura de 50:50% de Nujol:LI.



**Figura 12.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biossensores contendo apenas Nujol (A) e Nujol:LI na proporção de 50:50% (B) como aglutinante.

Com base nas imagens apresentadas fica evidente uma diferenciação no estado de agregação da pasta de carbono, dependendo do aglutinante empregado. Observa-se uma estrutura bastante irregular quando apenas o Nujol foi usado como aglutinante (método tradicional de construção) (Figura 12-A). Contudo, a incorporação do LI confere à estrutura uma melhor agregação, resultando numa maior uniformidade da pasta (Figura 12-B).

A Figura 13-A é uma imagem de microscopia destacando a presença das NP de ouro (pontos claros) na pasta de carbono (região ampliada na Figura 13-B). O espectro de EDS comprova a existência de ouro na composição da pasta de carbono que constitui o biossensor, como representado na Figura 13-C, onde a distribuição do metal foi determinada.

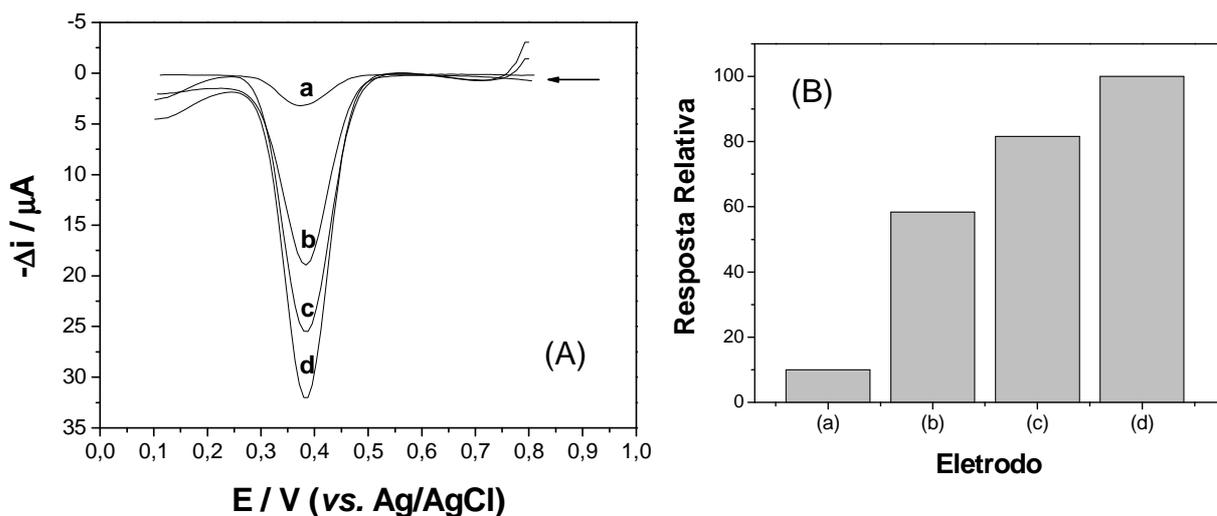


**Figura 13.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da pasta de carbono contendo Au-BMI.PF<sub>6</sub> com ampliação de (A) 8000 X e (B) 32000 X e (C) espectro EDS relativo à região mostrada em (B).

### 5.7 Contribuição da incorporação de Au-BMI.PF<sub>6</sub>

Para avaliar a contribuição das NP-LI sobre a resposta analítica do biossensor foram construídos 4 diferentes eletrodos, sendo (a) EPC sem modificação, (b) biossensor contendo apenas Nujol como aglutinante, (c) biossensor contendo Nujol:BMI.PF<sub>6</sub> (50:50%, m/m), (d) biossensor contendo Nujol:Au-BMI.PF<sub>6</sub> (50:50%, m/m). A partir desse estudo foi possível observar um significativo aumento de resposta eletroanalítica adquirida pelo biossensor contendo NP-LI em relação aos demais eletrodos (Figura 14-A). Como representado na Figura 14-B, a maior

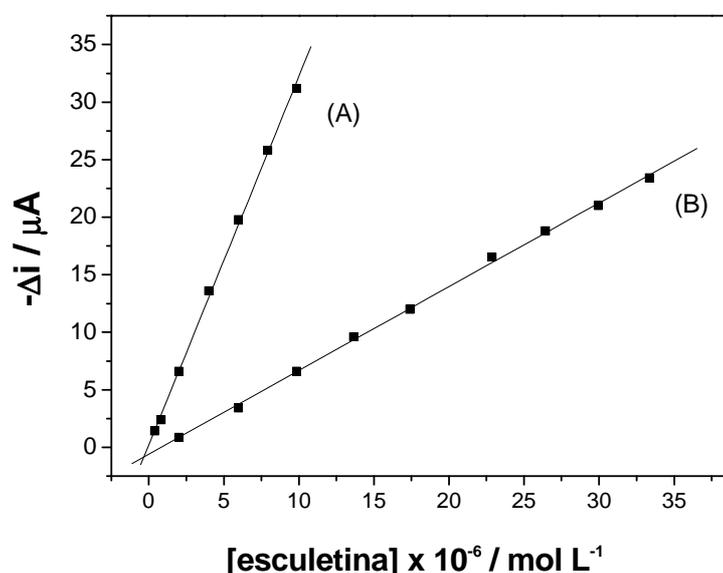
resposta relativa usando  $1,18 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de solução de esculetina foi obtida para o eletrodo contendo Au-BMI.PF<sub>6</sub>, sendo que o biossensor contendo LI sem NP de ouro apresentou uma resposta relativa de 81,6%, o biossensor sem adição de LI uma resposta de 58,4% e o EPC de apenas 10% em relação ao biossensor contendo NP-LI. Esse estudo mostra o aumento da resposta analítica, uma das vantagens obtidas com a aplicação de NP-LI como material modificador de biossensores.



**Figura 14.** (A) Voltamogramas obtidos para diferentes eletrodos: (a) EPC não modificado, (b) biossensor-Nujol, (c) biossensor-Nujol:BMI.PF<sub>6</sub>, (d) biossensor-Nujol:Au-BMI.PF<sub>6</sub>, usando  $1,18 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de solução de esculetina em tampão acetato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 4,5), com frequência de 100 Hz, amplitude de 50 mV e incremento de 8,0 mV. (B) Resposta relativa para os eletrodos estudados.

A contribuição de Au-BMI.PF<sub>6</sub> para o aumento da sensibilidade do biossensor proposto (biossensor-Nujol:Au-BMI.PF<sub>6</sub>) também foi avaliada em comparação com um biossensor sem NP-IL (biossensor-Nujol). A Figura 15 mostra as curvas de calibração para esculetina usando estes dois biossensores e diferentes concentrações de analito, nas condições descritas anteriormente. Como pode ser observado, uma inclinação (*slope*) mais acentuada foi obtida para a curva A (*slope* =  $3,21 \pm 0,03 \mu A \mu mol^{-1} L^{-1}$ ), indicando a maior sensibilidade do biossensor-Nujol:Au-BMI.PF<sub>6</sub> em relação ao biossensor-Nujol (curva B, *slope* =  $0,73 \pm 0,01 \mu A \mu mol^{-1} L$ ). É importante notar que a inclinação (coeficiente angular) da corrente de pico resultante vs. [analito] representa o fator de sensibilidade do biossensor para o analito

específico. Além disso, o biossensor proposto tem um menor limite de detecção (curva A,  $LD = 1,29 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) em comparação ao outro biossensor (curva B,  $LD = 7,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). Este estudo confirma as vantagens da incorporação de Au-BMI.PF<sub>6</sub> no desenvolvimento de biossensores com maior detectabilidade. Além disso, de acordo com o que foi relatado por Fernandes *et al.* (2009) e Franzoi *et al.* (2009 A), as NP-IL também podem fornecer um microambiente adequado para a enzima, permitindo a transferência direta de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo.

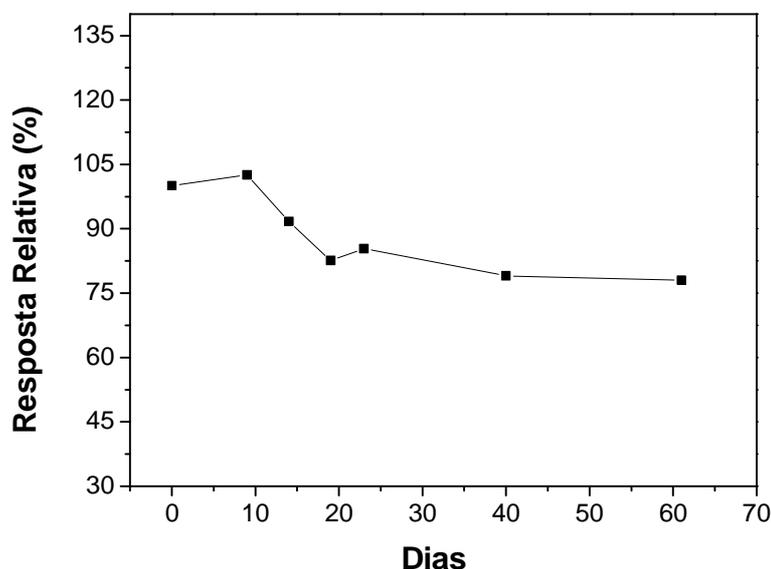


**Figura 15.** Comparação da sensibilidade: curvas de calibração obtidas com (A) biossensor-Nujol: Au-BMI.PF<sub>6</sub> e (B) biossensor-Nujol utilizando diferentes concentrações de solução esculetina padrão em tampão acetato (pH 4,5) com frequência de 100 Hz, amplitude de 50 mV e incremento 8,0 mV.

### 5.8 Estabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade

A estabilidade operacional dos biossensores é considerada um importante fator para avaliação do desempenho destes dispositivos. Por esta razão, o biossensor proposto foi avaliado em diferentes intervalos de tempo, durante um período de 60 dias, através de medidas de corrente realizadas em  $1,18 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de solução de esculetina. Nos 15 primeiros dias, após a construção do eletrodo, foi mantida uma resposta relativa acima de 90% em relação ao dia de construção. Aos

60 dias o biossensor exibiu uma resposta relativa de 78% em relação ao dia de construção (Figura 16), sendo armazenado em temperatura ambiente. A baixa perda de atividade apresentada é atribuída principalmente à adequada imobilização da PFO em montmorilonita.



**Figura 16.** Estudo da estabilidade do biossensor, usando  $1,18 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de solução de esculetina em solução acetato (0,1 mol L<sup>-1</sup>; pH 4,5) com frequência de 100 Hz, amplitude de 50 mV e incremento de 8,0 mV.

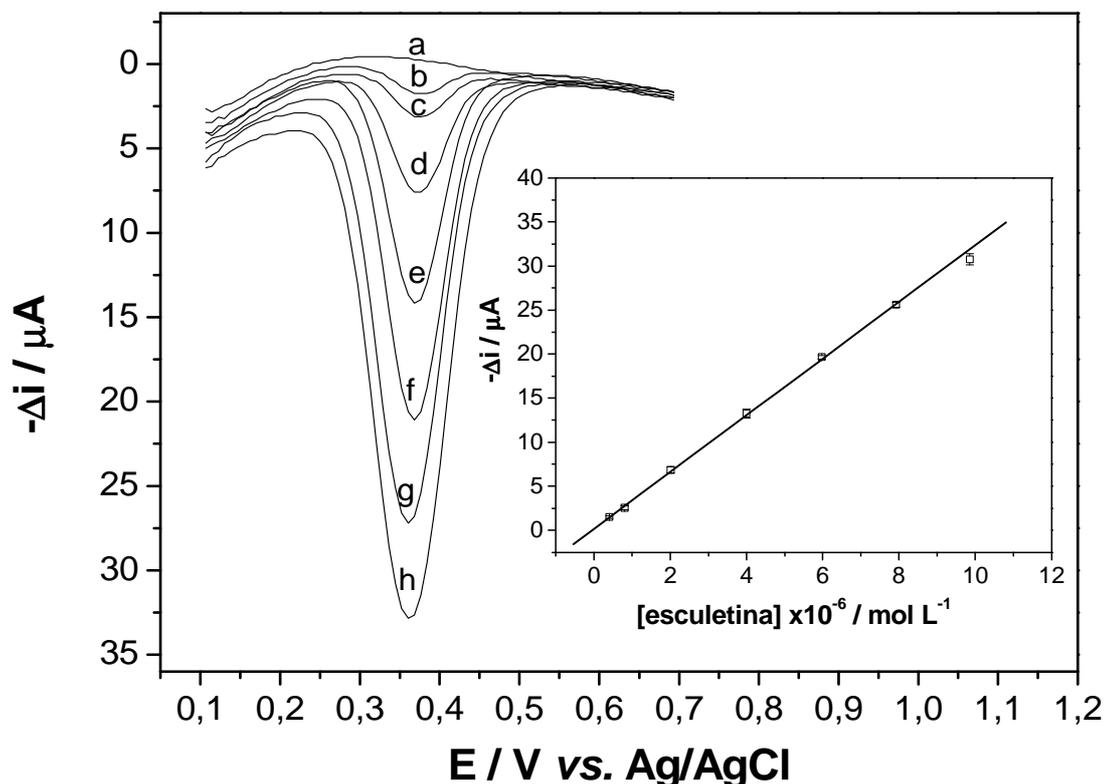
O estudo da repetibilidade foi realizado a partir de dez medidas sucessivas com o biossensor proposto em soluções contendo  $1,18 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de esculetina. A partir dos valores de corrente resultante calculou-se o desvio padrão relativo que foi de 3,5% para o estudo realizado.

A reprodutibilidade da resposta analítica (corrente resultante) de cinco biossensores construídos igualmente foi investigada em solução contendo  $1,18 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de esculetina. Nesse estudo, o desvio padrão relativo apresentado entre os dados foi de 4,6%.

## 5.9 CURVA ANALÍTICA

Depois das etapas de otimização dos parâmetros de trabalho para o biossensor proposto, procedeu-se a construção da curva analítica para esculetina utilizando a voltametria de onda quadrada. Como apresentado na Figura 17, a curva

de calibração apresentou linearidade de  $4,04 \times 10^{-7}$  a  $9,86 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de esculetina ( $-\Delta i = 0,182 + 3,21 \times 10^6$  [esculetina];  $r = 0,9997$ ), com limite de detecção de  $1,29 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. Sendo  $-\Delta i$  a corrente de pico resultante ( $\mu\text{A}$ ) e [esculetina] a concentração de esculetina (mol L<sup>-1</sup>).



**Figura 17.** Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto em (a) solução acetato (0,1 mol L<sup>-1</sup>; pH 4,5) e soluções de esculetina nas seguintes concentrações: (b)  $4,04 \times 10^{-7}$ ; (c)  $8,07 \times 10^{-7}$ ; (d)  $2,01 \times 10^{-6}$ ; (e)  $4,00 \times 10^{-6}$ ; (f)  $5,97 \times 10^{-6}$ ; (g)  $7,92 \times 10^{-6}$  e (h)  $9,86 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, com frequência de 100 Hz, amplitude de 50 mV e incremento de 8,0 mV. Inserido curva analítica para esculetina.

### 5.10 Estudo de recuperação e determinação de esculetina em chá preto

O estudo de recuperação de esculetina em duas amostras de chá preto comercial (A e B) foi realizado usando o biossensor contendo Au-BMI.PF<sub>6</sub>, através da adição de três diferentes concentrações de solução padrão de esculetina. Conforme apresentado na Tabela 4, a concentração de esculetina recuperada variou

de 97,5 a 100,5%, evidenciando que a influência de matriz na amostra é baixa para a metodologia proposta. O método de adição de padrão foi utilizado para quantificação de esculetina em chá, pois se tratava de amostras complexas.

**Tabela 4.** Estudo de recuperação de esculetina em chá preto

Amostra	Esculetina ( $\times 10^{-6}$ mol L <sup>-1</sup> )		
	Adicionado	Recuperado	Recuperação (%)
A	0,81	0,79	97,5
	1,61	1,61	100,0
	2,01	2,02	100,5
B	4,04	4,01	99,3
	2,01	2,02	100,5
	2,41	2,41	100,0

Além disso, o biossensor desenvolvido foi aplicado na determinação de esculetina nas duas amostras de chá preto selecionadas (A e B). O teor encontrado desse antioxidante nas amostras A e B foi de  $2,5 \pm 0,2$  e  $9,4 \pm 0,2$  mg 100mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

## 6 CONCLUSÕES

Os dados de desenvolvimento e avaliação do biossensor empregando a enzima PFO obtida do alho (*Allium sativum* L.) e imobilizada em montmorilonita apresentaram bons resultados para aplicação na quantificação de esculetina. Além disso, o presente estudo também mostra que a adição de nanopartículas de ouro dispersas em líquido iônico contribui para um aumento da sensibilidade do biossensor proposto, promovendo uma diminuição do limite de detecção.

Os biossensores foram otimizados usando a voltametria de onda quadrada e a maior resposta analítica foi obtida para esculetina em tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,5), frequência de 100 Hz, amplitude de potencial de 50 mV e incremento de 8 mV. As principais vantagens da construção e aplicação destes biossensores de pasta de carbono modificados com material nanoparticulado disperso em LI são a facilidade e simplicidade da arquitetura de construção, baixo custo, rapidez frente às análises, alta sensibilidade e seletividade além de fornecer medidas com reprodutibilidade e repetibilidade apropriada. A eficiência analítica do biossensor proposto pode ser atribuída à efetiva atividade catalítica da PFO imobilizada na MMT juntamente com a alta condutividade do LI combinada com a transferência de elétrons facilitada pelas nanopartículas de ouro.

Desta forma, destaca-se a importância da valorização desta técnica como opção para análises qualitativas e principalmente quantitativas de compostos fenólicos, tal como a esculetina presente no chá preto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRONDANI, D.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on platinum nanoparticles dispersed in ionic liquid and laccase for determination of adrenaline. **Sens. Actuators, B**, 140, 252–259, 2009.

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

CHU, X.; WU, B.; XIAO, C.; ZHANG, X.; CHEN, J. A new amperometric glucose biosensor based on platinum nanoparticles/polymerized ionic liquid-carbon nanotubes nanocomposites. **Electrochim. Acta**, 55, 2848–2852, 2010.

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

DASH, P.; SCOTT, R. W. J. 1-Methylimidazole stabilization of gold nanoparticles in imidazolium ionic liquids. **Chem. Commun.**, 812–814, 2009.

DUPONT, J. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. **J. Braz. Chem. Soc.**, 15, 341–350, 2004.

FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W.; OLIVEIRA, L. C. 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 A.

FRANZOI, A. C.; MIGOWSKI, P.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Development of biosensors containing laccase and imidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ionic liquid for the determination of rutin. **Anal. Chim. Acta**, 639, 90–95. 2009 B.

FERNANDES, S. C.; MOCCELINI, S. K.; SCHEEREN, C. W.; MIGOWSKI, P.; DUPONT, J.; HELLER, M.; MICKE, G. A.; VIEIRA, I. C. Biosensor for chlorogenic acid based on an ionic liquid containing iridium nanoparticles and polyphenol oxidase. **Talanta**, 79, 222–228, 2009.

FREITAS, A. A.; FRANCELIN, M. F.; HIRATA, G. F.; CLEMENTE, E.; SCHIMID, F. L. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase

(PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geléias. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 28, 173, 2008.

GAWLIK-DZIKI, U.; SZYMANOWSKA, U.; BARANIAK, B. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. **Food Chem.**, 105, 1047–1053, 2007.

GHIACI, M.; AGHAEI, H.; SOLEIMANIAN, S.; SEDAGHAT, M. E. Enzyme immobilization. Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Appl. Clay Sci.**, 43, 289–295, 2009.

KANEKO, T., TAHARA, S., TAKABAYASHI, F. Inhibitory effect of natural coumarin compounds. **Biol. Pharm. Bull.**, 30, 2052–2057, 2007.

KIM, S. H.; KANG, K. A.; ZHANG, R.; PIAO, M. J.; KO D. O., WANG Z. H., CHAE, S. W.; KANG, S. S.; LEE, K. H.; KANG, H. K.; KANG, H. W.; HYUN, J. W. Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species. **Acta Pharmacol. Sin.**, 29, 1319–1326, 2008.

KISSINGER, P. T. Biosensors – a perspective. **Biosens. and Bioelectron.**, 20, 2512–2516, 2005.

LUPETTI, K. O.; RAMOS, L. A.; VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. A zucchini-peroxidase biosensor applied to dopamine determination. **Il Farmaco**, 60, 179–183, 2005.

MARKO-VARGA, G.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; RUZGAS, T. Development of enzyme-based amperometric sensors for determination of phenolic compounds. **Trends Anal. Chem.**, 14, 319–32, 1995.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, 77, 237–256, 2002.

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.

MIGOWSKI, P.; DUPONT, J. Catalytic applications of metal nanoparticles in imidazolium ionic liquids. **Chem. Eur. J.**, 13, 32–39, 2007.

MUSAMEH, M.; WANG, J. Sensitive and stable amperometric measurements at ionic liquid–carbon paste microelectrodes, **Anal. Chim. Acta**, 606, 45–49, 2008.

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.

PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. R. V. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. **Cerâmica**, 54, 213–226, 2008.

ROSKOSKI, R. J. **Bioquímica**, Rio de Janeiro (RJ), Guanabara Koogan, 1997, 515 p.

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.

ŠVANCARA, I.; VYTRÁS, K.; KALCHER, K.; WALCARIUS, A.; WANG, J. Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: a review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. **Electroanalysis**, 21, 7–28, 2009.

VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*). **Quim. Nova**, 26, 39–43, 2003.

Xiao, F.; Zhao, F.; Li, J.; Yan, R.; Yu, J.; Zeng, B. Sensitive voltammetric determination of chloramphenicol by using single-wall carbon nanotube–gold nanoparticle–ionic liquid composite film modified glassy carbon electrodes. **Anal. Chim. Acta**, 596, 79–85, 2007.

**PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS E SUBMISSÃO DE TRABALHO PARA PERIÓDICO**

ZAPP, E., VIEIRA I. C. Biossensor à base de polifenol oxidase de alho (*Allium sativum* L.) imobilizada em montmorilonita para determinação de esculetina. **XIX Seminário de Iniciação Científica da UFSC**, 20 e 21 de outubro, Florianópolis (SC), 2009.

ZAPP, E.; BRONDANI, D.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Determinação de esculetina usando biossensor contendo polifenol oxidase e nanopartículas de ouro dispersas em líquido iônico. **XVII Encontro de Química da Região Sul – SBQ-Sul**, 18 a 20 de novembro, Rio Grande (RS), 2009.

ZAPP, E., VIEIRA I. C. Biossensor para esculetina contendo polifenol oxidase e nanopartículas de ouro dispersas em líquido iônico. **XX Seminário de Iniciação Científica da UFSC**, 21 e 22 de outubro, Florianópolis (SC), 2010.

ZAPP, E.; BRONDANI, D.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Garlic polyphenol oxidase and gold nanoparticles in hydrophobic ionic liquid for development of esculetin biosensor. Submetido em 2010.