UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE QUÍMICA
ARARAQUARA

Dissertação de Mestrado

Imobilização de peroxidase em filme de titânio

José Eduardo Melo Inocêncio

Orientadora: Profª. Drª. Hideko Yamanaka

2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

José Eduardo Melo Inocêncio

Imobilização de peroxidase em filme de titânio

Dissertação submetida ao corpo docente do
Instituto de Química de Araraquara da
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em Química

Orientadora: **Hideko Yamanaka**

Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química de Araraquara

"Quem vive unido a Cristo torna-se uma pessoa nova.
As coisas antigas passaram. Tudo é novo."

II Coríntios 5.17

"Quanto, porém, ao amor fraternal,
não necessitais de que se vos escreva,
visto que vós mesmos sois instruídos por Deus a
vos amardes uns aos outros"

I Tessalonicenses 4.9

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, serei eternamente grato.

A Quézia em que encontrei paciência e tranqüilidade de que tanto precisei no decorrer e para finalizar esse trabalho.

Aos meus pais, que me ajudaram chegar até aqui.

A minha orientadora Professora Hideko Yamanaka pela ajuda, apoio, e principalmente compreensão nos momentos em que mais precisei.

Aos colegas e amigos do laboratório de eletroanalítica do instituto de Química de Araraquara, pelas demonstrações de apoio, incentivo e contribuições que direta ou indiretamente auxiliaram para que esta dissertação chegasse ao fim.

Aos professores Fernando Luis Fertonani, Marcos Lanza e Nelson Ramos Stradiotto por aceitarem participar do exame de qualificação e da banca de defesa, e pelas observações apresentadas, atenção disponibilizada, prestatividade e sugestões valiosas para o presente trabalho.

Aos funcionários e demais colaboradores do Instituto de Química, pela paciência e atenção no trabalho desenvolvido.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro.

Aos amigos da república Xikeirão, pela amizade e apoio.

Resumo

Os biossensores são dispositivos no qual o material de origem biológica é imobilizado junto a um transdutor, ou seja, um dispositivo que combina a especificidade de um elemento biológico ativo para o analíto de interesse com a sensibilidade de um transdutor para converter um sinal proporcional à concentração do analíto. Para a construção do biossensor é necessário fixar a biomolécula em um transdutor. Neste trabalho foi utilizado como transdutor um eletrodo de grafite recoberto por um filme polimérico de titânio a partir de uma suspensão. A modificação do eletrodo de trabalho (grafite de lapiseira 0,9 mm) foi efetuada empregando o método *dip-coating* em 5 diferentes marcas de grafites comerciais. Para os testes foram utilizados grafites na ausência e presença do filme de titânio e outros eletrodos com a enzima imobilizada por oclusão ou por adsorção. As voltametrias cíclicas foram efetuada em uma célula contendo 10 mL de solução tampão Br com o sistema H_2O_2/I^- como eletrólito. Nos testes envolvendo somente os eletrodos com filme, observa-se a formação de um pico de oxidação no potencial de -0,8V (Pico 4). A resposta encontrada nas voltametrias deve-se a oxidação do H_2 produzido pela redução. O biossensor foi construído através do método de adsorção, onde observado um pico referente à catálise enzimática em torno de -0,75 V (Pico 12). Portanto, neste presente trabalho, foi observado a construção de um biossensor com a modificação de sua superfície sem a necessidade de calcinação e com a observação da imobilização eficiente, observada através da catálise enzimática medida.

Sumário

1. Introdução.....9

1.1. Biossensores.....9

1.2. Biossensores Amperométricos.....11

1.3. Biossensores a base de peroxidase.....13

1.4. Imobilização da enzima peroxidase.....15

1.5. Deposição de filme fino sobre eletrodo por *dip-coating*.....17

1.6. Imobilização por oclusão.....17

1.7. Imobilização por adsorção.....18

2. Objetivo.....18

3. Metodologia.....19

3.1. Preparo da suspensão do filme para modificação física do eletrodo de grafite.....19

3.2. Modificação física da superfície do eletrodo de grafite.....19

3.2.1. Imobilização por oclusão.....20

3.2.2. Imobilização por adsorção.....20

3.3. Medidas de voltametria cíclica.....20

3.4. Micrografias.....21

4. Resultados e Discussão.....21

4.1. Estudo de diferentes marcas de grafites.....21

4.2. Influência da velocidade de imersão e emersão na deposição do filme de titânio pelo método do "Dip-coating".....26

4.3. Influência do número de depósitos do filme.....28

4.4. Diferentes tipos de grafites da mesma marca.....30

4.5. Remoção da parafina presente nos grafites.....31

4.6. Variação do valor de pH da solução do tampão.....33

4.7. Micrografia dos eletrodos de grafite.....37

4.8. Peroxidase imobilizada por oclusão.....40

4.9. Estudo do efeito da velocidade de varredura.....43

4.10. Estudo sobre o pH ótimo da enzima.....46

4.11. Estudo da variação da concentração da enzima imobilizada por oclusão.....48

4.12. Estudo da variação da concentração da enzima imobilizada por adsorção.....49

4.13. Estudo do efeito do sistema peróxido/iodeto.....51

5. Conclusões.....53

Referências.....55

1. Introdução

1.1. Biossensores

É cada vez maior a preocupação dos químicos de determinar em tempo real, e preservando ao máximo as condições existentes na natureza, os compostos ou substâncias presentes em alimentos e materiais de interesse clínico, biológico e ambiental. Isso justifica o grande interesse no desenvolvimento de biossensores em diversas áreas. Atualmente existe um consenso universal a respeito da necessidade de monitorar continuamente o teor de contaminantes químicos nos cursos de águas naturais e nos inúmeros efluentes industriais descarregados nestes recursos hídricos (1,2). O tempo e o custo envolvidos com a detecção de poluentes ambientais (por exemplo, coleta da amostra, preparação da amostra, análise de laboratório) tem imposto limitações no número de amostras que podem ser analisadas para um determinado projeto de monitoramento ambiental (3). A detecção de substâncias em tempo real é a tendência da química analítica para o futuro.

A limitação no número das análises tem criado uma demanda por tecnologias analíticas que possam permitir um aumento no número destas análises num menor tempo e com custos acessíveis (4-5). Até o presente momento, análises tanto de fenol como de espécies fenólicas, por exemplo, têm sido realizadas, principalmente, por meio de métodos espectrofotométricos e cromatográficos, como por exemplo, cromatografia gasosa com ionização em chama ou acoplada com espectrometria de massa; ou ainda, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (6,7). Entretanto, estas técnicas não permitem, facilmente, um monitoramento contínuo, pois são caras, lentas, necessitam de analistas bem treinados, e em alguns casos, requerem etapas de extração ou pré-concentração, que aumentam o risco de perda do analíto (2,5). A necessidade de métodos analíticos mais versáteis para o monitoramento ambiental tem estimulado a produção de uma grande variedade de métodos analíticos.

Os biossensores revelam grandes perspectivas quanto a sua utilização no monitoramento de efluentes (e outras matrizes de interesse ambiental), possibilitando uma rápida adaptação nos processos de tratamento. A incorporação de moléculas com atividade biológica em metodologias analíticas tem aumentado sensivelmente nos últimos anos, obtendo sucesso nos mais variados procedimentos analíticos,

principalmente nos que visam à área de controle ambiental (8-10). Biossensores, como pra este presente trabalho, representam uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas existentes, devido as suas características únicas, tais como: seletividade; relativo baixo custo de construção e estocagem; potencialidade para miniaturização; facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento rápido.

Os biossensores são dispositivos no qual o material de origem biológica, tais como enzimas, organelas, tecido animal ou vegetal, microrganismos, antígeno ou anticorpo, ácidos nucléicos, lectina, entre outros, é imobilizado junto a um transdutor, ou seja, um dispositivo que combina a especificidade de um elemento biológico ativo para o analíto de interesse com a sensibilidade de um transdutor para converter um sinal proporcional à concentração do analíto. (Figura 1).

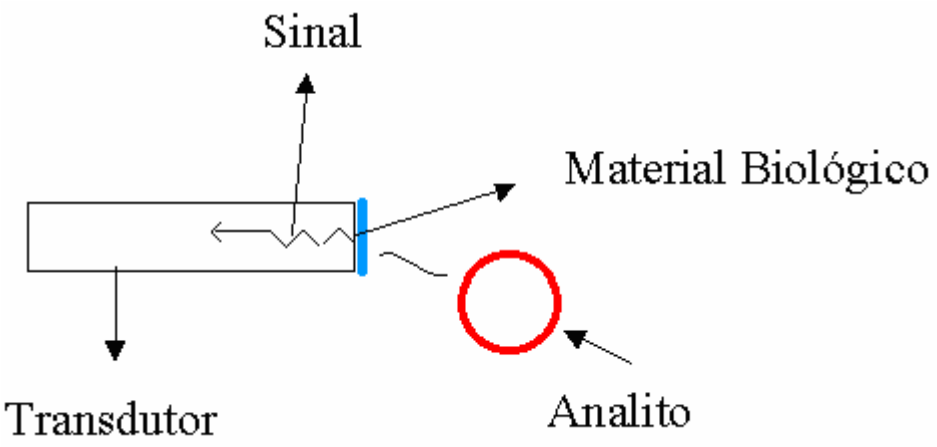

Figura 1: Esquema de um biossensor

De acordo com o transdutor utilizado, o biossensor é classificado como eletroquímico (potenciométrico, amperométrico e condutimétrico), óptico (medida de luminescência, fluorescência, elipsometria e etc.), detector de massa (relaciona a oscilação da freqüência dos cristais piezelétricos com variação de massa) de acordo com a tabela abaixo (Tabela 1). Assim, um biossensor é um dispositivo que combina a especificidade de um elemento biológico ativo para o analíto de interesse com a sensibilidade de um transdutor para converter o sinal proporcional à concentração do analíto (11).

Tabela 1: Tipos de biossensores e seus respectivos sinais.

Tipo de Biossensor	**Sinal**
Amperométricos	Elétrons
Potenciométricos	Íons
Condutimétricos	Íons
ENFET	Íons
Calorimétrico	Calor
Piezelétrico	Massa
Óptico	Luz

Conforme o tipo de interação que ocorre entre a substância a ser determinada e o material biológico, o biossensor é classificado como catalítico ou de afinidade. Os biossensores de reações catalíticas possuem como material biológico imobilizado as enzimas. Já nos biossensores com reações de afinidade podem ser imobilizados os ácidos nucléicos, a lectina, antígenos/anticorpos e as proteínas recombinadas (12).

1.2. Biossensores Amperométricos

Compostos podem ser determinados amperometricamente através de uma oxidação eletroquímica direta. Entretanto, este procedimento possui uma série de desvantagens, principalmente, devido a uma alta sobrevoltagem. O alto potencial aplicado provoca um alto nível de ruído. Além disto, nas oxidações diretas, um grande número de reações paralelas pode ocorrer levando, principalmente, a formação de produtos poliméricos que passivam a superfície do eletrodo. (13)

Os biossensores amperométricos vem sendo estudados como uma excelente ferramenta para a determinação e monitoramento, pois estes operam com um baixo potencial aplicado em relação a um eletrodo de referência, onde se mede a corrente gerada pela reação biocatalisada de oxidação ou redução das espécies eletroativas (figura 2) (2,13,14).

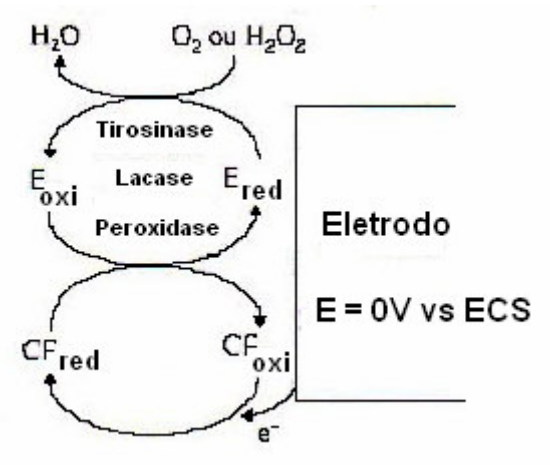

Figura 2: Esquema mostrando as reações de oxirredução de um biossensor.

Dentre os materiais utilizados para a construção dos biossensores amperométricos, os carbonáceos são os mais usados, como por exemplo, os eletrodos de carbono vítreo, grafite pirolítico, pasta de carbono e carbono compósito. As enzimas redox tirosinase, lacase e peroxidase são as mais utilizadas para a construção de biossensores amperométricos (15,16).

De acordo com a Figura 2, nota-se que as moléculas de enzima na superfície dos eletrodos são oxidadas pelo oxigênio ou pelo peróxido de hidrogênio (peroxidase), sendo reduzida pelos compostos fenólicos (possível analíto) em seguida. Nesta última reação os compostos fenólicos são basicamente transformados em quinonas e/ou radicais livres, e esses produtos, usualmente eletroativos, podem ser reduzidos na superfície do eletrodo em potenciais próximos de 0 V vs ECS (Eletrodo de Calomelano Saturado).

Apesar da grande versatilidade e perspectivas apresentadas por esses sensores eletroquímicos, a utilidade de um eletrodo é muitas vezes limitada devido a uma passivação gradual de sua superfície, que é conseqüência principalmente da adsorção dos produtos da própria reação de óxido-redução utilizada na detecção, ou ainda, dos sub-produtos destas reações que podem se polimerizar e se depositar sobre a superfície dos eletrodos. Além disso, a sensibilidade de muitos analítos importantes pode ser prejudicada em função da cinética de transferência de elétrons entre estes compostos e os materiais dos eletrodos serem excessivamente lenta, sendo isto solucionado com a adição de um mediador (17).

Os mediadores são substâncias redox de baixa massa molar (ferroceno, hexacianoferrato, azul de metileno, fenol, iodeto, etc.), que facilitam a transferência de

elétrons entre a enzima e o eletrodo, além de minimizar drasticamente os efeitos da passivação do biossensor. O mediador, evidentemente, deve ser seletivo e diminuir o valor do potencial a ser aplicado diminuindo assim os eventuais interferentes da reação. Os mediadores têm sido empregados aos eletrodos por adsorção, oclusão em filme polimérico, ligação covalente ou misturados em pasta de carbono. Alem disso, estas substâncias podem ser adicionadas ao próprio eletrólito, onde não podem ter nenhum tipo de interação com o analíto anterior a medida (18).

1.3. Biossensores a base de peroxidase

Esta classe de enzima é assim denominada por ter o peróxido de hidrogênio como o seu principal substrato. A peroxidase de raiz forte (HRP, horseradish peroxidase) tem sido a mais freqüente utilizada, devido principalmente a sua alta estabilidade por longos períodos de tempo à temperatura ambiente e em um amplo intervalo de pH, além de ser relativamente barata e disponível comercialmente em diferentes graus de pureza. De acordo com a classificação referente à reação catalisada, está inserida na classe 1 (oxidoredutases) as quais catalisam reações de oxirredução. As peroxidases são Hemeproteinas, ou seja, apresentam como sítio ativo o Fe3+ (protoporfirínico) com um ciclo catalítico comum, ocorrido com melhor resposta a pH = 7, conforme esquematizado na Figuras 3 e 4.

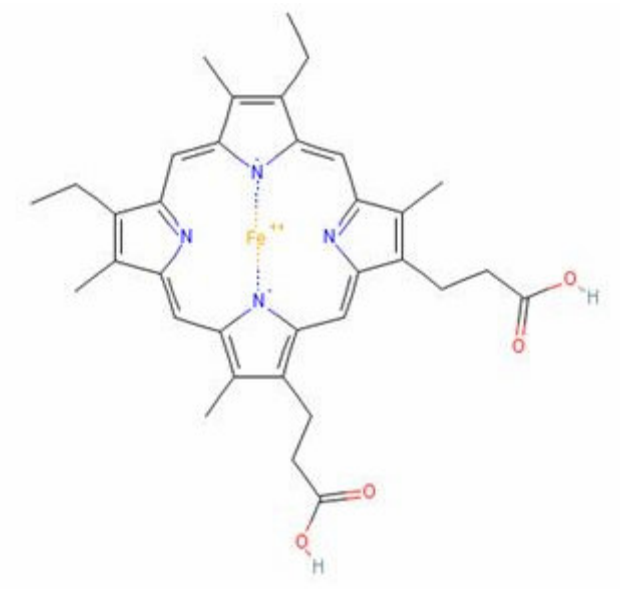

Figura 3: Estrutura básica do grupo prostético da enzima peroxidase. Grupo heme, contendo uma porfirina de ferro ($C_{34}H_{32}N_4O_4Fe$).

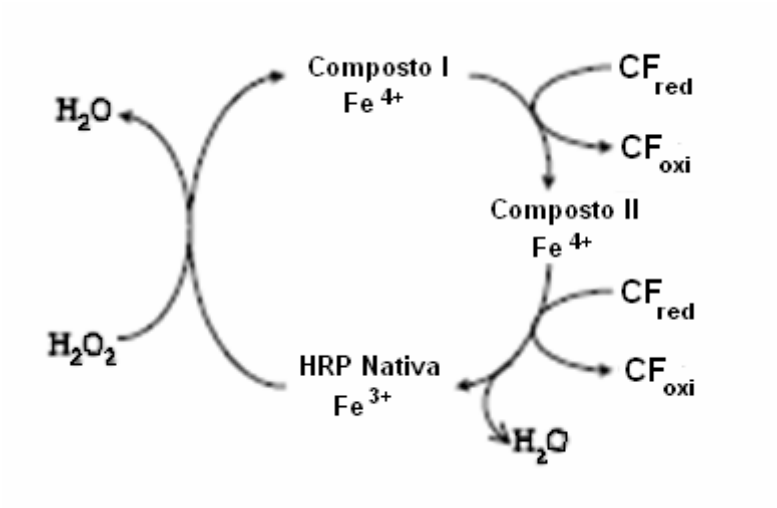

Figura 4. Ciclo catalítico da enzima peroxidase (HRP). R+ = radical protoporfirina. CF= composto fenólico.

O grupo prostético de um monômero de peroxidase encontra-se inserido entre dois domínios (Figura 5). Para HRP, o ferro heme encontra-se covalentemente ligado a um nitrogênio contido numa molécula de histidina contida em um anel imidazólico.

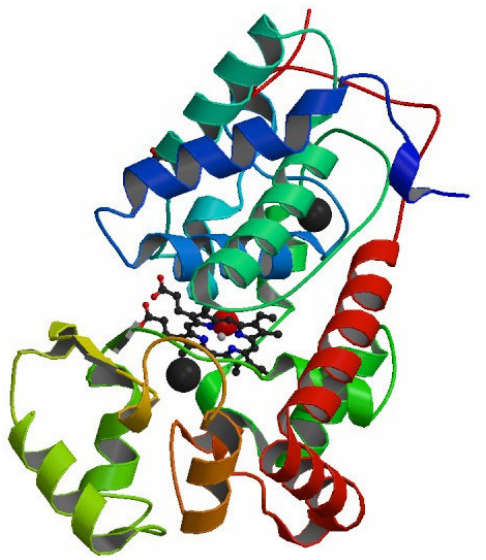

Figura 5: Estrutura em três dimensões da horseradish peroxidase (HRP). Dois domínios contendo um grupamento heme inserido.

A reação enzimática da peroxidase (HRP) ocorre em três etapas distintas, como mostram as equações 1, 2 e 3:

$$HRP\ (Fe^{3+}) + H_2O_2 \rightarrow Composto\text{-}I\ (Fe^{4+}) + H_2O \qquad (1)$$

$$Composto\text{-}I\ (Fe^{4+}) + AH_2 \rightarrow Composto\text{-}II + AH\cdot \qquad (2)$$

$$Composto\text{-}II + AH_2 \rightarrow HRP(Fe^{3+}) + AH\cdot + H_2O \qquad (3)$$

Na primeira etapa, a enzima reduz H_2O_2 formando um composto oxidado intermediário (Composto-I) onde é observado o ferro do sitio ativo com numero de oxidação 4+. A forma oxidada da enzima é então, reduzida à sua forma nativa em duas etapas, sendo que em cada etapa uma substância orgânica é oxidada. A Figura 4 ilustra o ciclo catalítico da HRP (19,20).

Na busca de eletrodos modificados com peroxidase, com maior sensibilidade e melhor limite de detecção, *Lindgren e col.* estudaram diferentes técnicas de imobilização da enzima na superfície de grafite sólido, incluindo adsorção e ligação covalente, onde que neste estudo verificaram que os eletrodos submetidos a tratamento térmico apresentam um menor ruído, melhor limite de detecção e melhor sensibilidade. A variação da temperatura provocaria um aumento no número de sítios para a deposição do filme, tornando mais reprodutível o processo imobilização. Lindgren e col. também investigaram a utilização de diferentes tipos de peroxidases como a peroxidase de raiz forte (HRP), peroxidase de *Arthromyces ramosus* (ARP), peroxidase da soja (SBP), cloroperoxidase de fungo *Caldariomyces* (ChlP), lactoperoxidase de leite de vaca (LP), e peroxidase de tabaco, *Nicotiana sylvestris* (TOP). Estas peroxidases se diferem na capacidade de receber elétrons e mostram respostas para diferentes tipos analíto como, por exemplo, compostos fenólicos. (21)

1.4. Imobilização da enzima peroxidase

Muitos processos eletroquímicos e suas velocidades de transferência de elétrons podem ser significativamente afetadas e controladas alterando-se as superfícies dos eletrodos, isto é, modificando-as. Assim, muitos esforços têm sido direcionados para desenvolver diferentes abordagens de modificação das superfícies dos eletrodos (17,22-24). Existem muitos métodos para formar camadas funcionais finas sobre estas

superfícies. A utilização de polímeros como modificadores têm sido muito popular, e muitos trabalhos sobre a modificação de superfícies de eletrodos empregando-se polímeros foram realizados (25,26).

Kubota e col. descreveram a imobilização da enzima sobre sílica gel modificada com óxido de titânio em um biossensor a base de pasta de carbono. Com a presença da sílica-titânio a transferência direta de elétrons da redução do peróxido de hidrogênio para a HRP foi bloqueada, aumentando a sensibilidade do biossensor para um potencial aplicado de 0 mV *vs.* ECS. Porém, este eletrodo mostrou uma menor sensibilidade em relação àquele onde a enzima foi imobilizada diretamente sobre grafite (27).

O grupo de pesquisa em eletroanalítica do Instituto de Química de Araraquara tem empregado a peroxidase como enzima marcadora em biossensores empregando antígeno. As proteínas do *Trypanosoma cruzi* foram usadas para a construção de um imunossensor amperométrico para o diagnóstico da doença de Chagas'. As proteínas usadas tiveram uma massa molecular variar de 30 ao kDa 100. O eletrodo do ouro foi tratado com o cisteamina e o glutaraldeído antes do imobilização do antígeno. Os anticorpos dos pacientes com doença de Chagas foram capturados pelos antígenos imobilizados e a interação da afinidade foi monitorada por cronoamperometria em um potencial de -400 mV (28, 29).

Outro estudo realizado é o emprego de DNA ao biossensor. Neste tipo do biossensor, uma ponta de prova do DNA é imobilizada em um transdutor e a hibridização com o DNA é monitorado pela metodologia apropriada. Os híbridos da streptavidina (STA) são encapsulados no óxido do siloxane-poly(propylene-poly(propylene das películas finas) preparados pelo método sol-gel e depositado na superfície do elétrodo do grafite pelo processo *dip-coating* . O DNA hibridizado à ponta de prova que é alvo específico do oligonucleotidio imobilizado na superfície do elétrodo de grafite e depois o conjugado avidin-avidin-peroxidase foi adicionado. A resposta enzimática foi investigada pelo potencial amperométrico constante em –0,45V contra Ag/AgCl usando soluções de H_2O_2 e de KI. Os controles negativos e positivos do RNA de HCV e as amostras positivas de pacientes foram analisados e os resultados foram comparados com uma metodologia comercial. O presente trabalho estuda a construção de um biossensor que poderia ser aplicado ao método descrito acima. Os avanços recentes aceleraram o desenvolvimento dos biossensores para a análise de seqüências específicas do gene (30).

1.5. Deposição de filme fino sobre eletrodo por *dip-coating*

O processo de revestimento por imersão ou *dip-coating* é uma das formas para a modificação de superfícies de eletrodos e consiste de quatro estágios: imersão, emersão, deposição e escoamento/evaporação (figura 6). As três últimas etapas ocorrem simultaneamente, resultando na formação de uma fina camada do produto a ser depositado na superfície do eletrodo.

Durante o movimento de emersão, a suspensão é arrastada com o eletrodo, causando um aumento na taxa de evaporação e na taxa de secagem, o que leva a formação de uma camada delgada constituída pelas partículas coloidais.

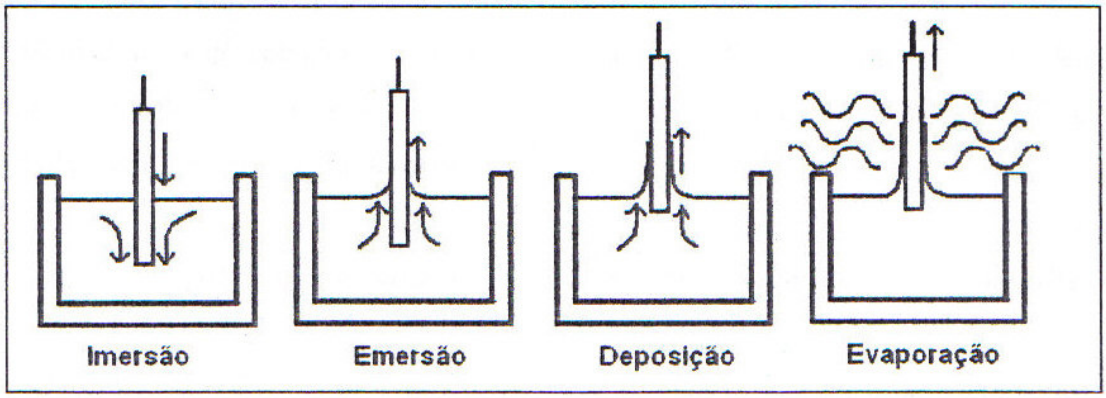

Figura 6: Etapas envolvidas do processo *dip-coating*.

Este tipo de imobilização possibilita um rígido controle na formação do filme. O equipamento proporciona um controle efetivo da velocidade de imersão/emersão e do tempo de contato da suspensão com a superfície do eletrodo, tornando também a formação do filme reprodutível (31).

1.6. Imobilização por oclusão

Este processo consiste na imobilização do biocatalizador confinada ao interior da matriz do filme, sem que seja estabelecida qualquer ligação química. A enzima é adicionada a suspensão do filme, onde a modificação da superfície do eletrodo e a imobilização da enzima ocorrem ao mesmo tempo. Esta imobilização enzimática não proporciona alterações estruturais e também qualquer interação com o sítio ativo da

biomolécula. O contato da enzima com o substrato ocorre através da difusão do mesmo pelo filme.

Uma das vantagens deste método é a sua estabilidade durante o experimento, pois a enzima se encontra no interior do filme utilizado, protegendo de qualquer possível remoção em quantidade considerável.

A desvantagem é o difícil acesso do substrato à enzima, onde a difusão citada acima pode não ocorrer de forma eficaz, diminuindo a sensibilidade do experimento realizado.

1.7. Imobilização por adsorção

É o mais antigo método de imobilização de enzimas. Este método consiste em imobilizar a enzima escolhida para a construção do sensor, após o eletrodo de trabalho ter sua superfície modificada. As enzimas são adsorvidas a polímeros orgânico/inorgânicos, vidros, sais minerais, óxidos metálicos e vários materiais silicatos, tais como bentonita e sílica coloidal.

A adsorção causa pouca ou nenhuma mudança de conformação da enzima ou destruição de seu centro ativo. Outra das suas vantagens seria, pela enzima ser imobilizada após o filme ter sido depositado, o seu maior contato com o eletrólito, proporcionando uma resposta mais efetiva.

Apresenta a desvantagem de que a enzima adsorvida pode dessorver-se do suporte, ou seja, o eletrodo de trabalho, durante a utilização, porque a interação entre a enzima e o suporte é fraca.

2. Objetivo

A proposta do presente trabalho consiste modificação da superfície de eletrodos de grafite com a deposição de um filme polimérico com a presença de titânio sem tratamento térmico e nas investigações sobre a imobilização da peroxidase (HRP) neste eletrodo modificado.

3. Metodologia

3.1. Preparo da suspensão do filme para modificação física do eletrodo de grafite

Para a construção do biossensor é necessário fixar a biomolécula em um transdutor. Neste trabalho foi utilizado como transdutor um eletrodo de grafite recoberto por um filme de titânio a partir de uma suspensão preparadas pelo processo sol-gel. Na preparação da suspensão, o tetraisopropóxido de titânio (Aldrich) foi adicionado a uma solução de ácido nítrico em água deionizada (Milli-Q) de tal modo que a razão molar seguiu a seguinte proporção: $Ti:H^+:H_2O$ – 1:0,5:200. O precipitado obtido foi agitado continuamente até completa peptização, para a obtenção de uma suspensão estável e então dialisado em água deionizada, pH em torno de 3,5, utilizando-se uma membrana de diálise Micropore (3500 MW) (32).

3.2. Modificação física da superfície do eletrodo de grafite

O tipo de imobilização utilizado foi o *dip-coating*, usando um equipamento MQCTL 2000-MP como controlador do processo de revestimento dos eletrodos por imersão. Como já foi descrito, este tipo de imobilização proporciona o controle da velocidade de imersão/emersão, sendo utilizado em várias marcas de grafites de lapiseira.

O filme a base de titânio foi depositado no eletrodo de grafite de diâmetro de 0,9 mm (grafites de lapiseira de várias procedências). Após este método, foi delimitado um comprimento de 5 mm da extremidade de cada eletrodo com parafilme, sendo a área de contato do eletrodo com o eletrólito de 14,8 mm^2.

Os eletrodos foram preparados, inicialmente, com velocidade de deposição de 300 mm min^{-1} (Dip-coating), mas diferentes velocidades tais como 50, 100 e 200 mm min^{-1} também foram testadas. Foi feito apenas 1 depósito do filme em cada eletrodo para os testes iniciais, mas também foi testada a possibilidade de 2 ou 3 depósitos melhorar a reprodutibilidade do método. O tempo de secagem após cada depósito foi de 24 horas

3.2.1. Imobilização por oclusão

Este método foi descrito no item 1.6, sendo a enzima misturada com o sol-gel e então a modificação do eletrodo foi realizada utilizando o método *dip-coating* (item 1.5). Foi efetuado 1 depósito para cada eletrodo em um béquer contendo 5 ml de suspensão. Neste mesmo béquer foram adicionados 15, 30 ou 100 μL de uma solução aquosa da enzima peroxidase de concentração 1 mg mL^{-1}. Após o depósito o eletrodo foi armazenado em local apropriado para a secagem de 24 horas.

3.2.2. Imobilização por adsorção

Este método foi descrito no item 1.7, onde neste procedimento foi realizado também utilizando o método *dip-coating*. Foi realizado 1 depósito, pela imersão/emersão descrita no item 1.5 empregando 5 mL da dispersão filme. Inicialmente foram feitos sem a adição da enzima peroxidase. Esta enzima foi adicionada somente após a modificação da superfície do eletrodo. A aplicação do método não ocorreu em um béquer contendo 5 mL da dispersão do filme, e sim em um béquer contendo 5 mL de água deionizada com a adição de 15, 30 ou 100 μL de uma solução aquosa da enzima peroxidase de concentração 1mg mL^{-1}. Mergulha-se o eletrodo já com o filme de titânio em sua superfície em uma solução aquosa da enzima.

3.3. Medidas de voltametria cíclica

Os voltamogramas cíclicos (VC) foram obtidos empregando-se o equipamento Potenciostato/Galvanostato Model – 263 EG&G – Princeton Applied Research, tendo como eletrodo de referência o $Ag/AgCl/KCl_{sat}$ e um eletrodo de platina como eletrodo auxiliar. Empregou-se velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}, porem outros valores de velocidades foram testadas, tais como 20, 100 e 200 mV s^{-1}. Para estes voltamogramas parte-se da redução para a oxidação.

Como eletrodos de trabalho foram utilizados cinco marcas de grafite 0,9 mm sem o filme de titânio, com o filme de titânio e com filme e a enzima peroxidase.

Os testes foram feitos em 10 mL de solução tampão BR inicialmente em pH 4, onde foram testados diferentes valores como pH 5, pH 6, pH 7 e pH 8 como eletrólito.

O tampão BR é uma mistura de 3 ácidos (ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico). Também foi testado o tampão acetato.

A adição de peróxido em qualquer experimento foi feita na quantidade de 100 μL de uma solução 0,1 mol L^{-1} para cada 10 mL de solução tampão BR.

A adição de iodeto de potássio em qualquer experimento foi feita na quantidade de 300 μL de uma solução 0,1 mol L^{-1} para cada 10 mL de solução tampão BR.

3.4. Micrografias

Foram obtidas micrografias com microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-T330A em aumentos de 2000 vezes.

4. Resultados e Discussão

4.1. Estudo de diferentes marcas de grafites

Os voltamogramas cíclicos (VC) obtidos de solução tampão BR pH 4 foram traçadas partindo-se da região anódica para a região catódica de potenciais, iniciando dos potenciais positivos para potenciais negativos. Empregou-se 5 marcas de grafite (identificados como marca 1-5) com ou sem o filme de titânio. Foram obtidos VC empregando dois eletrodos distintos de cada marca, ou seja, resultados em duplicata, e no caso de curvas muito discrepantes, empregou-se um terceiro eletrodo. Os V.C. estão apresentados na Figura 7.

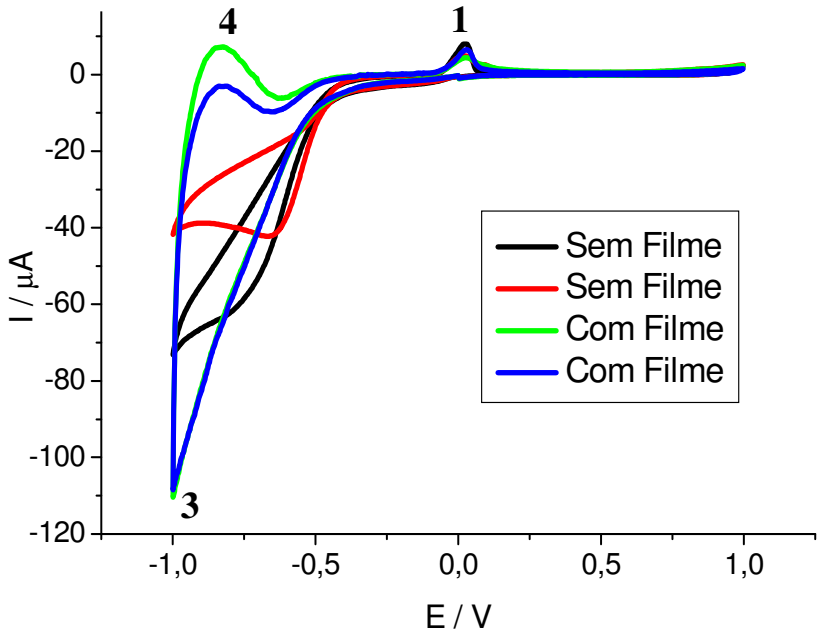

Figura 7a: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH 4 com eletrodos da marca 1 sem e com o filme; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl

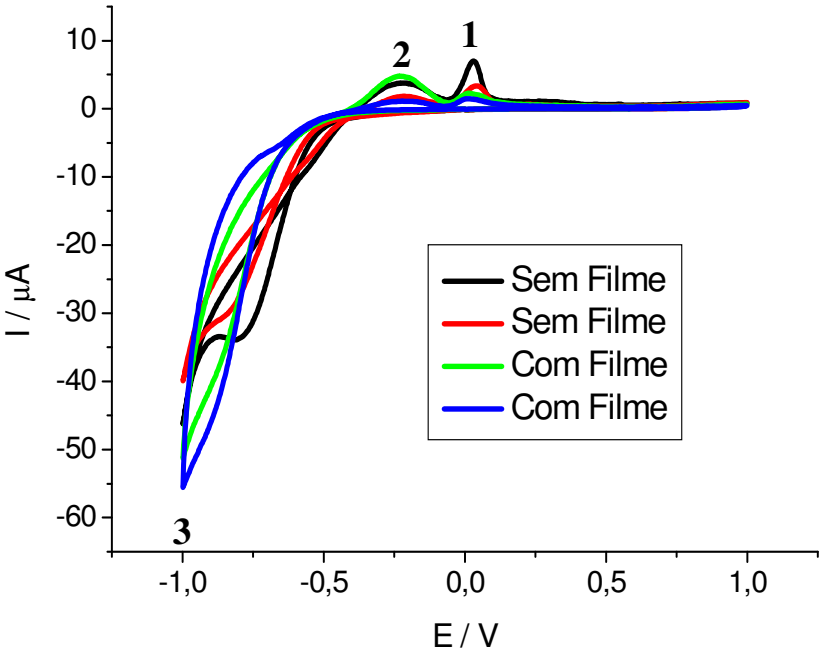

Figura 7b: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH 4 com eletrodos da marca 2 sem e com o filme; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl

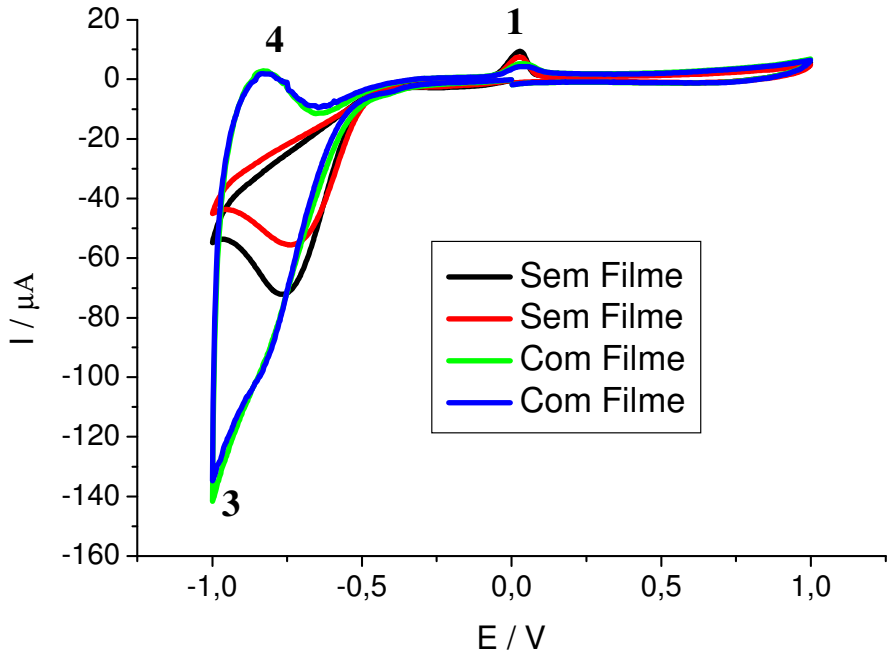

Figura 7c: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH 4 com eletrodos da marca 3 sem e com o filme; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl

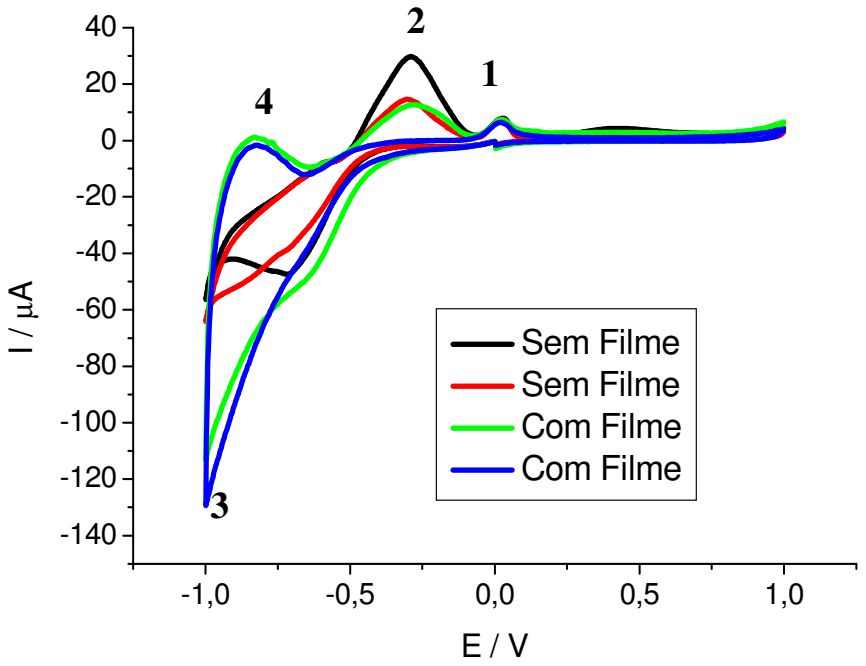

Figura 7d: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH 4 com eletrodos da marca 4 sem e com o filme; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl

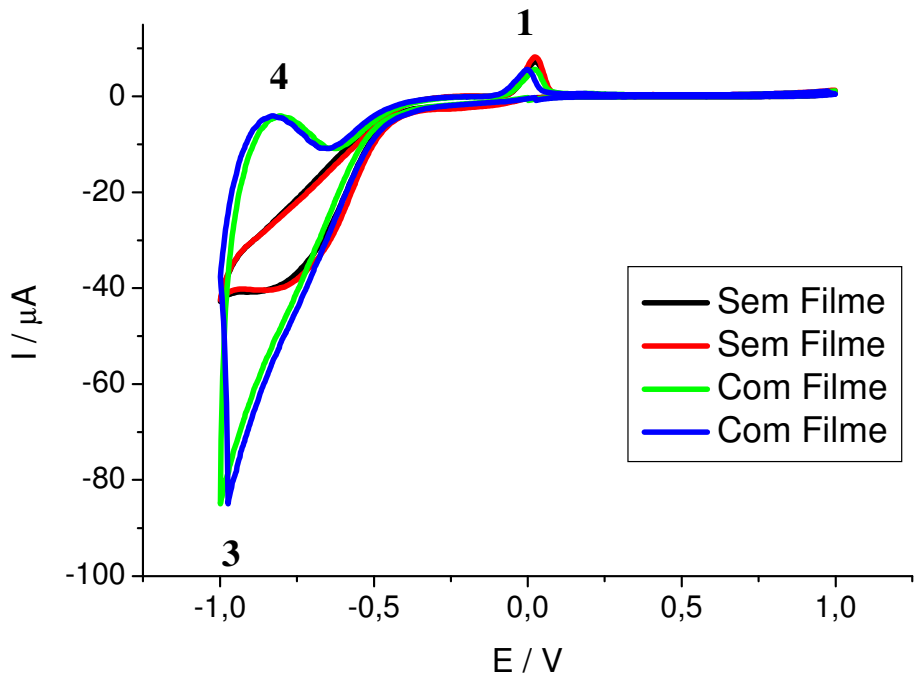

Figura 7e: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH 4 com eletrodos da marca 5 sem e com o filme; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl

Verifica-se que todas as marcas de grafite apresentam um pico de oxidação ao redor de 0 V, observado nos picos 1, que se mantêm mesmo com o recobrimento com o sol-gel. Os eletrodos de marca 2 e 4 (Figura 7b e 7d) apresentam picos ao redor de 0,25 V que são atenuados com o filme sol-gel, sendo estes observados no pico 2. Todos os eletrodos sem modificação apresentam resposta ao redor -0,7 V observando na Figura 7 o pico 3. Com a deposição do filme de titânio não se define mais o pico citado. A presença do filme, provavelmente, facilita a adsorção de hidrogênio molecular que então é oxidado ao redor –0,8 V (Pico 4) em todos os eletrodos, exceto a marca 2 (Figura 7b). Nota-se que a diferença na intensidade da corrente no potencial em torno de -0,8 V (Pico 4) nos eletrodos sem e com o filme, caracteriza a presença do filme. Outra característica dos V.C. apresentados na figura 7 é a reprodutibilidade dos experimentos, notando-se que 2 eletrodos diferentes, sem ou com o filme, apresentam o perfil semelhante.

Na Figura 8 foram agrupados voltamogramas cíclicos para cada marca de grafite, sem (Figura 8a) e com o filme de titânio (Figura 8b). O perfil do eletrodo 4 difere dos demais, tanto na presença e na ausência do filme devido o pico mostrado pelo pico 4.

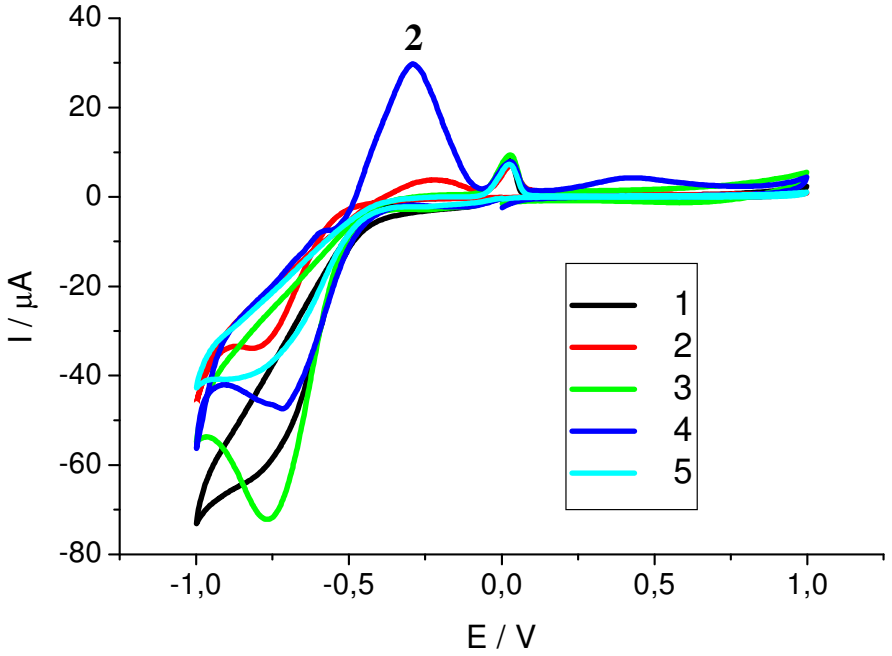

Figura 8a: Estudo da influência da marca do grafite por voltametria cíclica obtidas em solução tampão BR pH 4 com eletrodos de todas as marcas sem o filme; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl

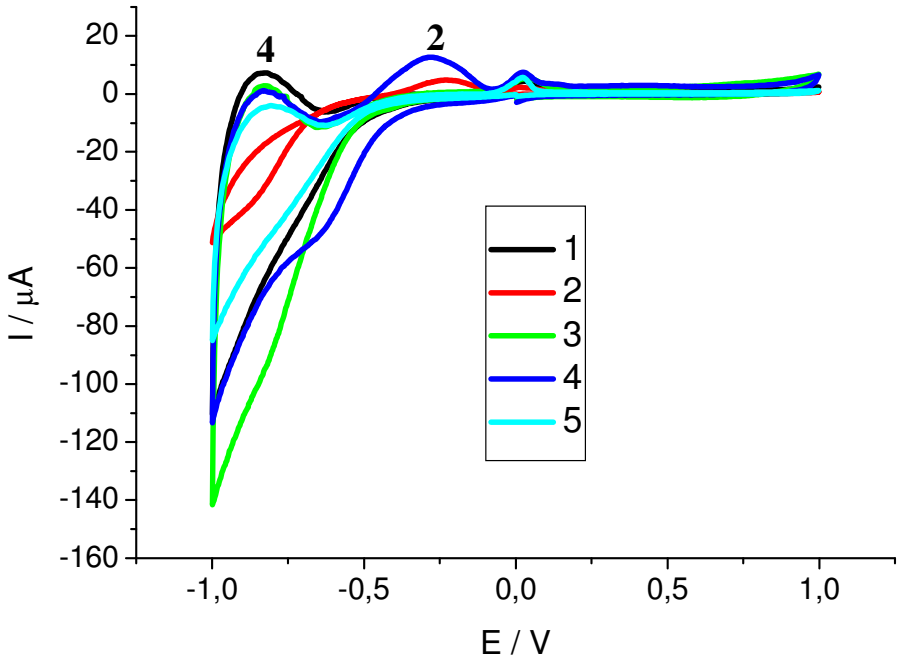

Figura 8b: Estudo da influência da marca do grafite por voltametria cíclica obtidas em solução tampão BR pH 4 com eletrodos de todas as marcas com o filme; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl

Um fator importante para a seleção da grafite para ser empregada como eletrodo no presente trabalho é a facilidade de serem encontradas no mercado. Uma marca de difícil aquisição poderia prejudicar a proposta em médio prazo, sendo o caso das marcas 2 (Figura 7b) e 5 (Figura 7e). Para o eletrodo marca 4 (Figura 7d), o problema foi a falta de reprodutibilidade e a presença de picos em outros potenciais (Pico 2), dificultando a interpretação em casos futuros. Dessa forma, investigações posteriores serão executadas com grafite da marca 1 e 3, pois possuem a maior adsorção de H_2 mostrado pelo pico 4 na figura 8b, onde é observa uma maior resposta para as marcas mencionadas.

4.2. Influência da velocidade de imersão e emersão na deposição do filme de titânio pelo método do "Dip-coating"

No experimento anterior, a velocidade empregada para a deposição do filme foi de 300 mm min^{-1}. Para este experimento serão utilizados todos os parâmetros descritos acima, mas possibilitando a variação da velocidade de imersão e emersão pelo método de *Dip-coating*.

Nestes experimentos foram empregadas as velocidades de 50, 100, 200 e 300 mm min^{-1}, onde foram obtidos voltamogramas cíclicos apenas com o filme nestas diferentes velocidades. Os experimentos forma realizados após 24 horas, tempo suficiente para a secagem dos filmes em cada eletrodo.

De acordo com a Figura 9a, não se observa o pico de oxidação referente à presença do filme para a marca 1, ou seja, a oxidação do hidrogênio molecular, independente da velocidade empregada para a deposição. O filme foi depositado a temperatura ambiente e qualquer mudança de temperatura alteraria a viscosidade do filme e impossibilitaria a deposição do filme para esta marca. No caso da grafite da marca 3, na Figura 9b, o aumento da temperatura ambiente não tem influência na aderência do filme. Dessa forma, o efeito da viscosidade do sol-gel parece ser maior no depósito em grafite da marca 1 do que para a marca 3. Nos experimentos posteriores a temperatura do ambiente no qual se efetua o deposito do filme foi mantida a 25 ^{0}C.

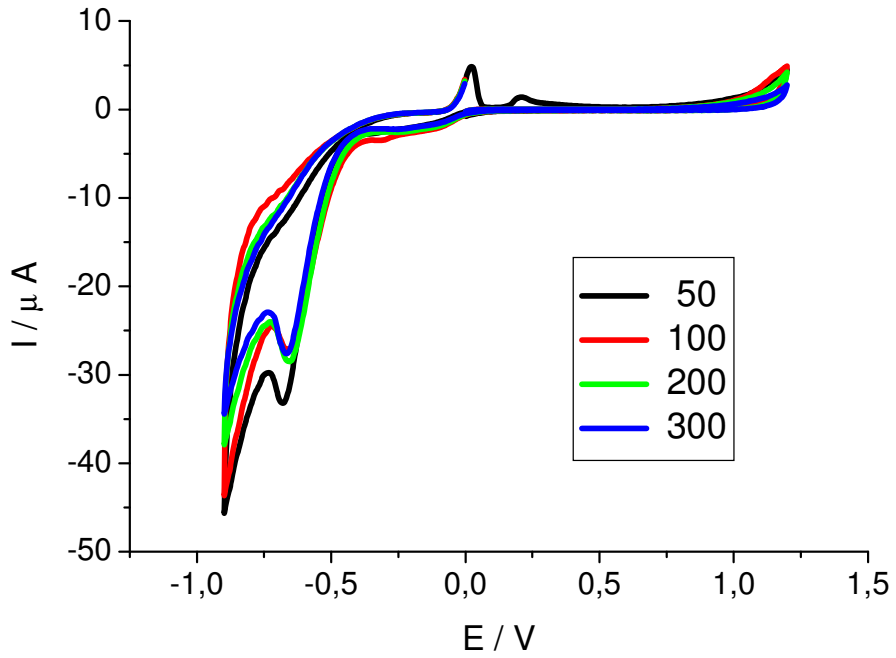

Figura 9a: Estudo da influência da velocidade de depósito do filme por voltametria cíclica obtida em solução tampão BR pH 4 com eletrodos da marca 1; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

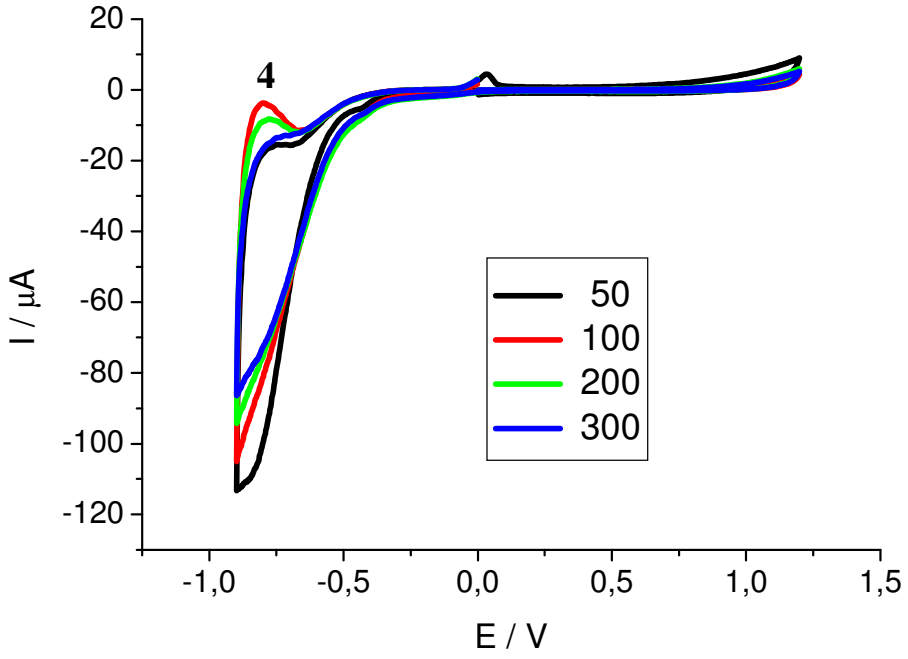

Figura 9b: Estudo da influência da velocidade de depósito do filme por voltametria cíclica obtida em solução tampão BR pH 4 com eletrodos da marca 3; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

Para a marca 3 (Figura 9b), quanto maior a velocidade de imersão/emersão mais fino é o filme formado, pois proporciona uma menor variação de corrente para o pico de oxidação referente à presença do filme mostrado no pico 4, exceto para a velocidade de 50 mm min^{-1}. Nesta velocidade, o filme formado é relativamente espesso ou menos poroso, onde, de certo modo, menor seria a quantidade de hidrogênio adsorvido. Com isso, determina-se a velocidade de 100 mm min^{-1} como a mais apropriada, pois não se forma um filme muito fino, mas também não muito espesso que seria mais resistivo a passagem de corrente.

4.3. Influência do número de depósitos do filme

Neste caso utilizou-se uma quantidade no número de depósitos variando de 1, 2 e 3 para as marcas 1 e 3 e velocidade de imersão/emersão 100 mm min^{-1}, determinada pelo experimento anterior. Após cada depósito, o filme foi seco a temperatura ambiente durante 24 h. Antes de cada experimento, como já visto, delimita-se a extremidade de cada grafite a um tamanho de 5 mm. Para o voltamograma da Figura 10a nota-se, diferentemente do experimento anterior, o surgimento do pico referente a deposição do filme para a marca 1, sendo este indicado pelo ponto 1. Observa-se também na Figura 10a que, quanto maior o número de depósitos, maior a variação da corrente deste pico. Isso também é observado para a marca 3 (Figura 10b), onde nota-se uma maior intensidade de corrente para o pico 4 no voltamograma referente a 3 depósitos. Para apenas 1 depósito observa-se uma menor variação da corrente para o pico de oxidação referente ao hidrogênio adsorvido.

Neste experimento, o importante a ser visto é como a variação desta quantidade de depósito pode otimizar o experimento. Com apenas 1 depósito, nota-se uma baixa reprodutibilidade, onde é observado, para alguns eletrodos espaços sem filme depositado. Ao aplicamos 2 ou 3 depósitos isto não é observado, todos os eletrodos são totalmente cobertos pelo filme. Para 3 depósitos, tendo a necessidade de secagem de 24 horas, torna-se mesmo pouco prático, pela necessidade de secagem de 24 horas, sendo que a modificação da superfície do eletrodo com 2 depósitos possui a mesma eficiência. Com isso, foram escolhidos 2 depósitos para a formação do filme fino na superfície do eletrodo.

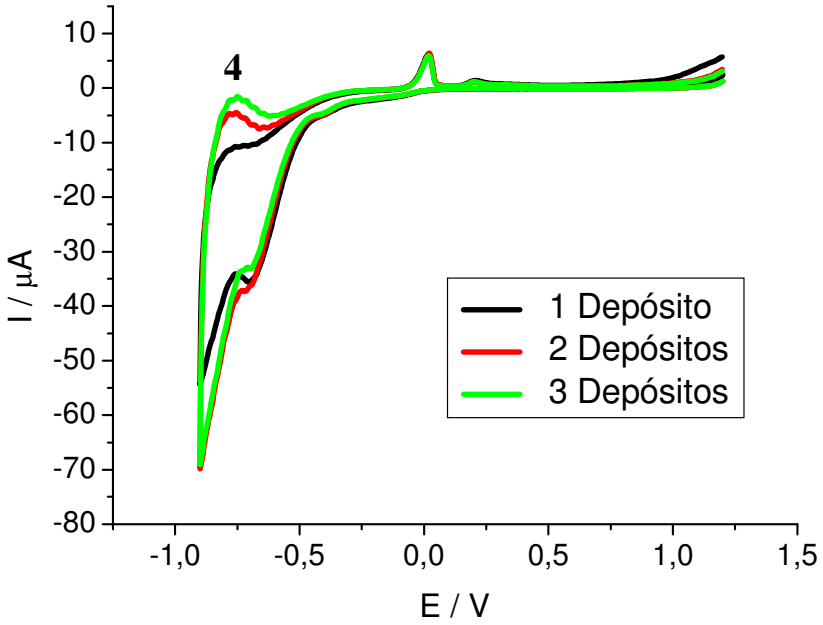

Figura 10a: Estudo da influência do número de depósitos por voltametria cíclica traçada em solução tampão BR pH 4 com eletrodos da marca 1, com velocidade de depósito do filme de titânio de 100 mm.min^{-1}; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

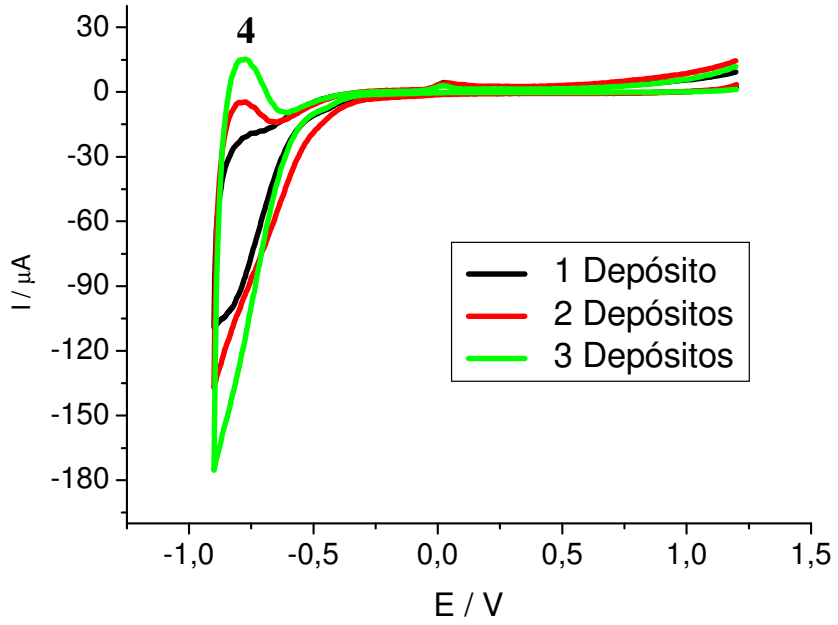

Figura 10b: Estudo da influência do número de depósitos por voltametria cíclica traçada em solução tampão BR pH 4 com eletrodos da marca 1, com velocidade de depósito do filme de titânio de 100 mm.min^{-1}; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

Comparação entre as marcas 1 e 3, com 2 depósitos, indica a intensidade de corrente mais significativa para a marca 3 (Pico 4). Após este experimento, e a observação dos anteriores, os experimentos seguintes serão feitos apenas com a marca 3, chamada PENTEL, devido à falta de reprodutibilidade com a variação da temperatura da marca 1.

4.4. Diferentes tipos de grafites da mesma marca

Em todos os experimentos anteriores, foram realizados testes com grafites de lapiseira 0,9 mm comercial, onde o grafite escolhido dentre cinco marcas foi o de marca 3 por inúmeros fatores já descritos. Esta marca proporciona ao comprador diferentes tipos de grafites, tendo estes diferentes tipos de escrita. Estes tipos de grafites são os HB e os 2B, onde o HB proporciona uma escrita mais macia e o 2B uma escrita mais firme, sendo um grafite mais rígido.

O experimento realizado em relação a este fato, foi a possibilidade de modificação da superfície de seus diferentes tipos de grafites. Foram depositados filmes de titânio para grafites HB e 2B, de acordo com o método descrito no item 1.5, sem a adição de enzima, e obtidos os voltamogramas de acordo com o item 3.3 (Figura 11).

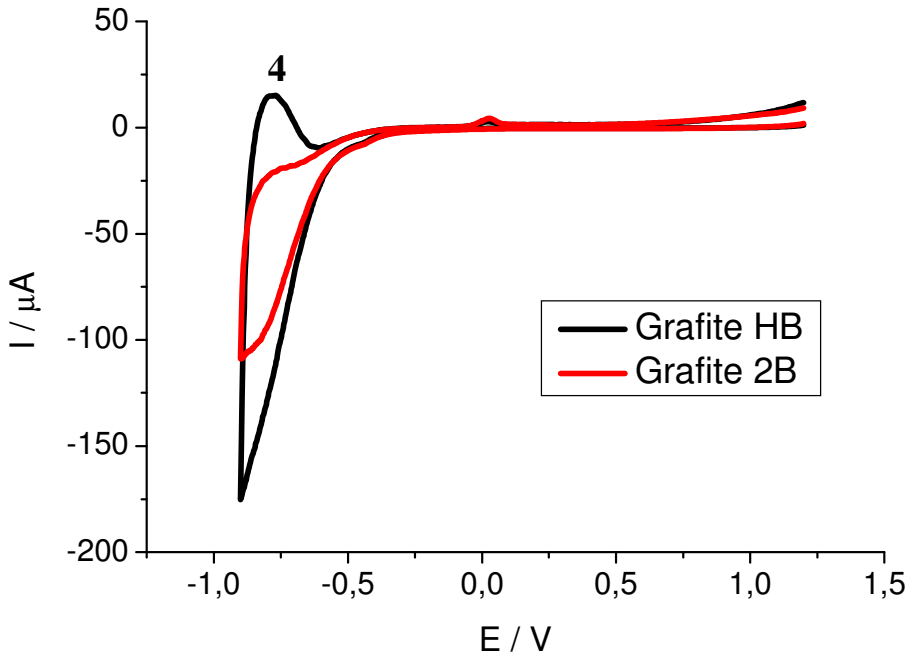

Figura 11: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH 4 com eletrodos de grafite da marca 3 de tipo HB e 2B com o filme; velocidade de depósito de 100mm min^{-1} e 2 depósitos realizados;ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

Neste experimento, para os grafites HB, verifica-se um aumento na corrente no pico de oxidação do hidrogênio mostrado no pico 4 da Figura 11, sendo este pico referente a presença do filme no eletrodo, como foi visto. Já para os eletrodos 2B, não ocorre a formação deste pico de oxidação, sendo este tipo de grafite inapropriado para a formação de um filme fino de titânio em sua superfície. Este comportamento é devido à estrutura diferente para cada grafite, pois possuem diferentes vantagens pelo qual foram feitos, a escrita. Visualmente, também não é observada no eletrodo a região de depósito do filme.

4.5. Remoção da parafina presente nos grafites

Considerando todas as marcas de grafite, sabendo que estes serão utilizados em lapiseiras, suas produtoras adicionam em sua superfície a parafina, com a finalidade de lubrificar e facilitar o mecanismo de ejeção do grafite. Esta substância pode interferir na resposta, sendo para este experimento, removida com acetona.

Para confirmar a interferência da parafina, foram obtidos voltamogramas cíclicos com um eletrodo de grafite convencional (Figura 12) e também com eletrodos de grafite de lapiseira com a parafina (Figura 13) e sem a parafina (Figura 14) de sua superfície.

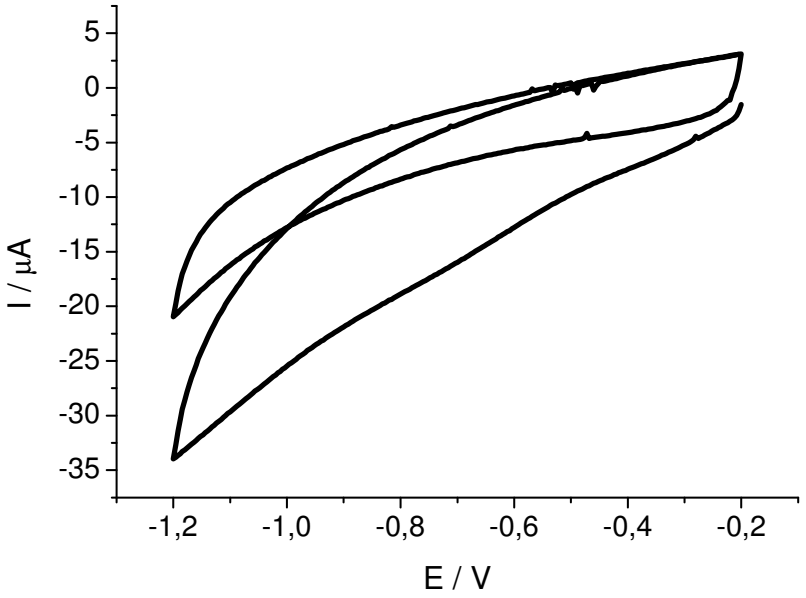

Figura 12: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH 4 com eletrodos de grafite convencional sem filme;ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

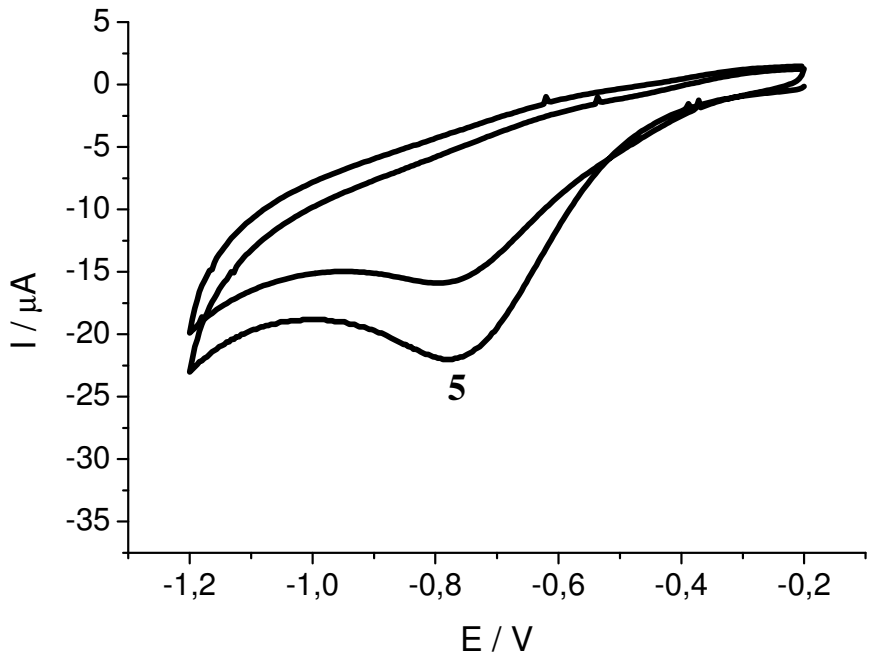

Figura 13: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH4 com eletrodos de grafite da marca 3 antes da remoção da parafina, sem filme;ν = 50 mV s^{-1} *vs* Ag/AgCl.

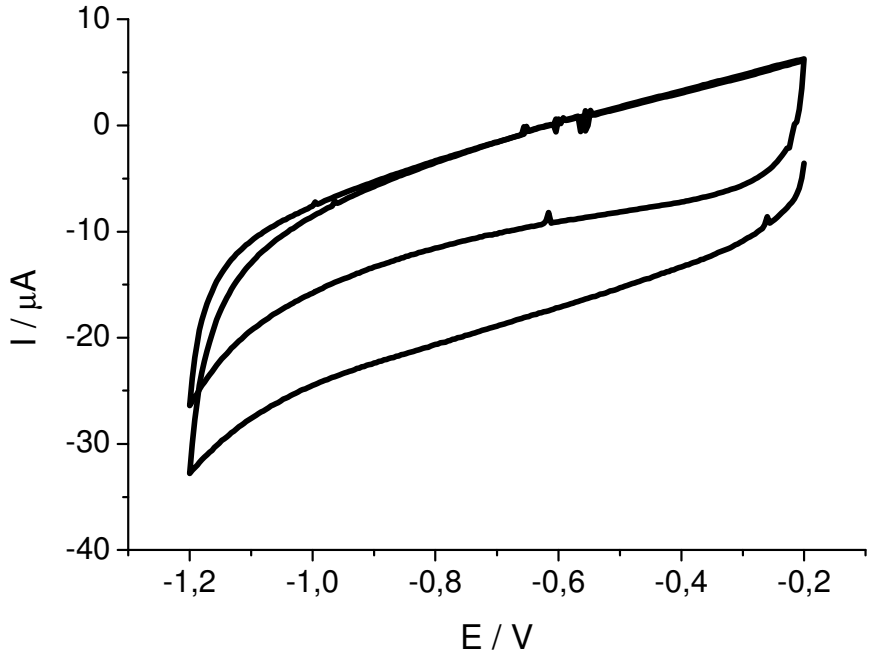

Figura 14: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH 4 com eletrodos de grafite da marca 3 após da remoção da parafina por acetona, sem filme;ν = 50 mV s^{-1} *vs* Ag/AgCl.

Neste experimento, observa-se que um eletrodo de grafite convencional possui um perfil voltamétrico diferente de um eletrodo de grafite de lapiseira sem preparação nenhuma. O grafite de lapiseira possui um pico de redução indicado pelo pico 1 na Figura 13 o que não ocorre em eletrodos de grafite convencional (Figura 12). Após a remoção desta parafina com acetona este pico de redução não é observado (Figura 14), o que mostra a parafina como uma possível interferência em resultados posteriores, necessitando a sua remoção antes das deposições do filme de titânio.

4.6. Variação do valor de pH da solução do tampão

Para este teste foi utilizada a voltametria cíclica para solução tampão BR com valores de pH 4, 5, 6, 7 e 8, empregando-se eletrodos sem e com o filme.

Na Figura 15a estão representados os VC obtidos com eletrodo sem o filme. Nota-se um aumento significativo da intensidade de corrente com o aumento da concentração de H^+, ou seja, com a diminuição do pH, no potencial de redução em torno de -0,75 V indicado pelo pico 3. Na presença do filme (Figura 15b) observa-se o mesmo comportamento neste potencial, mas também possui os picos de oxidação de hidrogênio em torno de -0,8 V, referente à presença do filme e indicados pelo pico 4. Nota-se que este pico se comporta da mesma maneira que o de redução, quanto menor o pH, maior a intensidade de corrente.

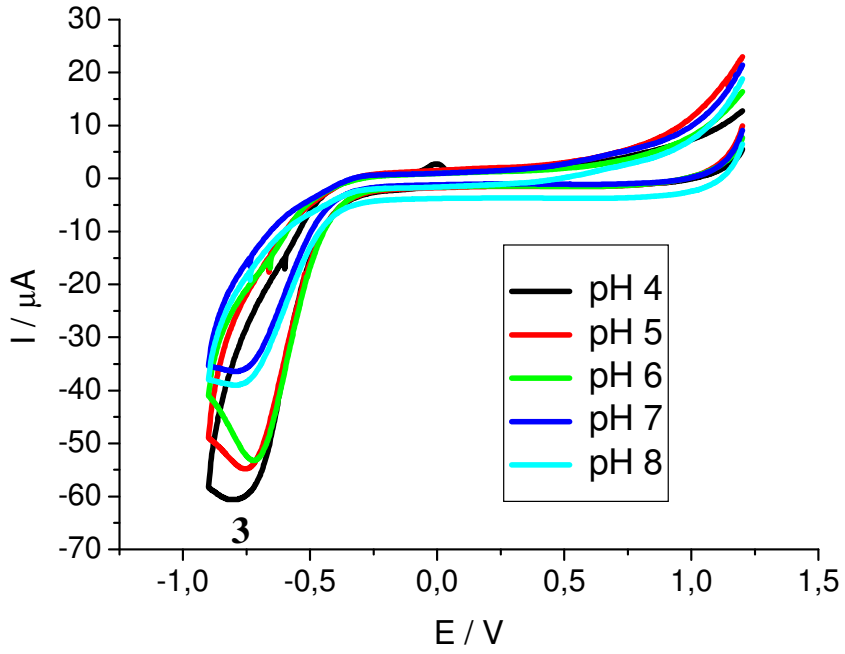

Figura 15a: Estudo da influência da variação de pH por voltametria cíclica traçada em solução tampão BR com eletrodos das marcas 3 sem o filme, velocidade de depósito de 100 mm min^{-1} e 2 depósitos do filme; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

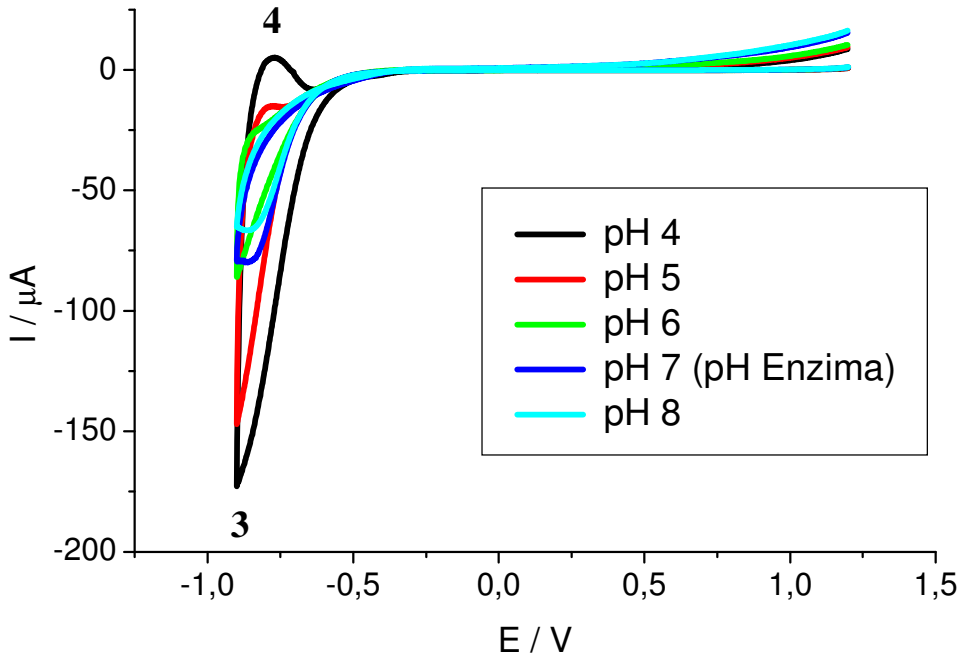

Figura 15b: Estudo da influência da variação de pH por voltametria cíclica traçada em solução tampão BR com eletrodos das marcas 3 com o filme, velocidade de depósito de 100 mm min^{-1} e 2 depósitos do filme; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

O próximo estudo foi realizado para verificar o efeito da composição da solução tampão, trocando o tampão BR pelo tampão acetato. Este tampão foi utilizado em diferentes pH, sendo estes: 4,0 , 4,6 e 5,2. Fora deste intervalo de pH, o tampão acetato perde a sua capacidade tamponante. Nas Figuras 16a, 16b e 16c, nota-se o comportamento do eletrodo sem e com o filme em diferentes valores de pH, mostrando um comportamento semelhante ao tampão BR (Figura 7c), exceto no pH 5,2.

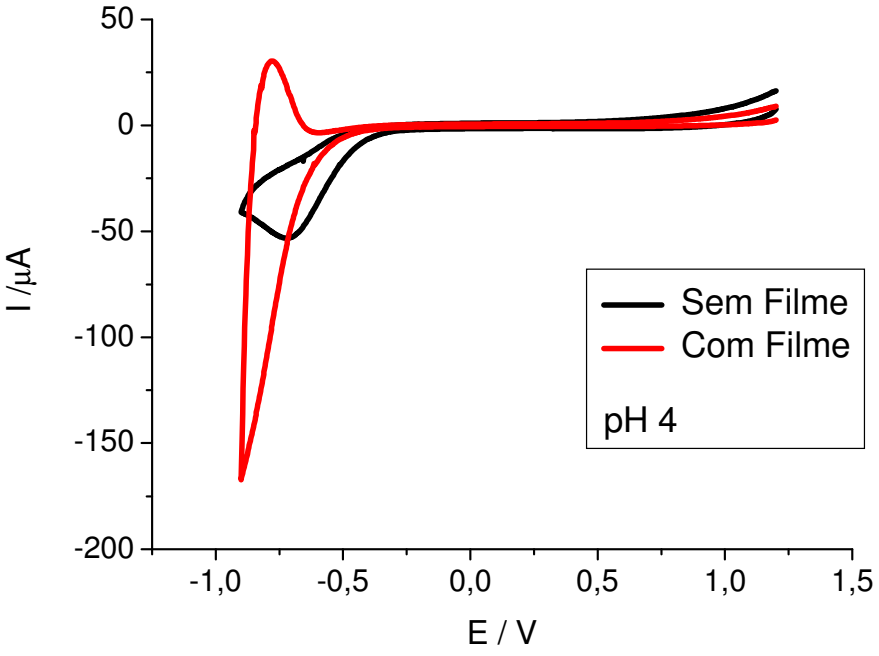

Figura 16a: Estudo da influência da variação da solução tampão por voltametria cíclica traçada em solução tampão acetato pH = 4,0 com eletrodos da marca 3 sem e com o filme, velocidade de depósito de 100 mm min^{-1} e 2 depósitos realizados; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl

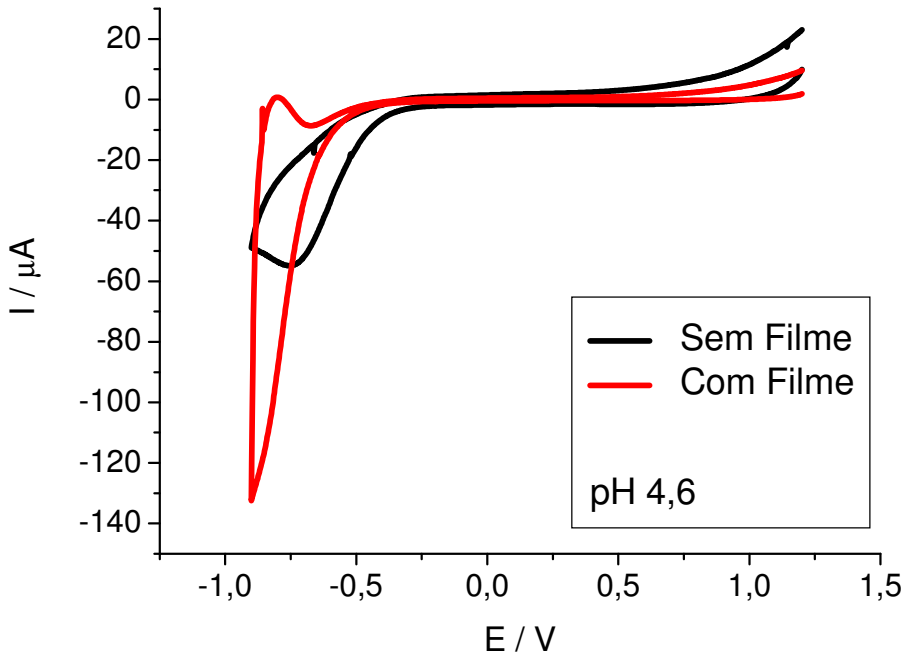

Figura 16b: Estudo da influência da variação da solução tampão por voltametria cíclica traçada em solução tampão acetato pH 4,6 com eletrodos da marca 3 sem e com o filme, velocidade de depósito de 100 mm min^{-1} e 2 depósitos realizados; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl

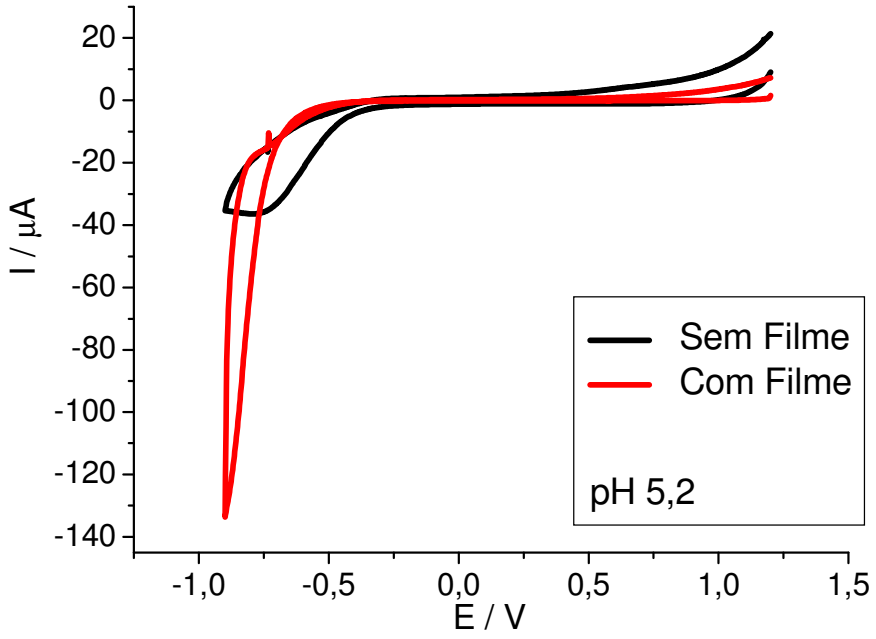

Figura 16c: Estudo da influência da variação da solução tampão por voltametria cíclica traçada em solução tampão acetato pH 5,2 com eletrodos da marca 3 sem e com o filme, velocidade de depósito de 100 mm min^{-1} e 2 depósitos realizados; ν = 50 mV s^{-1} *vs* Ag/AgCl

Na Figura 17, compara-se os diferentes pH e nota-se o mesmo perfil de comportamento para o tampão acetato como para o tampão BR, ou seja, quanto maior a concentração de H^+, maior a intensidade de corrente no pico de oxidação referente a presença do filme indicado pelo pico 4. Portanto a influência neste tipo de resposta seria da concentração hidrogeniônica e não da composição da solução do tampão. Para os próximos experimentos o tampão escolhido seria o tampão BR, pois proporciona um perfil voltamétrico semelhante ao tampão acetato, mas a capacidade tamponante do tampão acetato não abrange o pH ótimo da enzima a ser estuda e imobilizada.

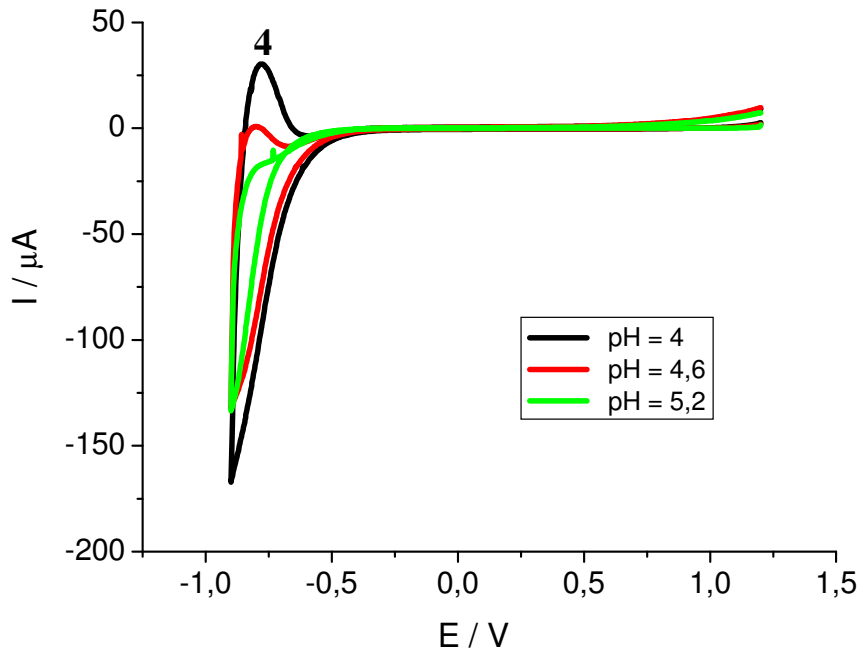

Figura 17: Estudo da influência da variação da solução tampão por voltametria cíclica obtida em solução tampão acetato em diferentes pH com eletrodos da marca 3 com o filme, velocidade de depósito de 100mm min^{-1} e 2 depósitos realizados; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl

4.7. Micrografia dos eletrodos de grafite

Considera-se que o pH de maior atividade da peroxidase é o pH = 7 e que, conforme visto na Figura 15b, se o filme for exposto a este pH, diminui a intensidade de corrente no potencial referente a presença do filme no eletrodo. Nesse valor de pH o filme seria destruído ou apenas a oxidação do hidrogênio seria diminuída? Experimentos de micrografia foram então efetuados.

Nas Figuras 18 e 19 estão registradas as imagens obtidas por micrografia pelo Microscópio Eletrônico de Varredura com um aumento de 2000 vezes. Nas Figuras 18a e 18b, observa-se imagens dos eletrodos sem e com o filme antes da aplicação da voltametria. Para os eletrodos com filme (Figura 18b), nota-se onde foi marcado, a presença de uma substância gelatinosa, sendo esta o filme, pois já na Figura 18a isto não é observado. Foram feitos ensaios dos eletrodos com filme submetidos as soluções tampão de pH 4, 5, 6, 7 e 8 (eletrodos utilizados experimento da Figura 15b), cujas imagens estão representadas nas Figura 19. Observa-se que conforme se aumenta o pH, o filme não seria deteriorado.

Em todas as micrografias, independente do valor de pH, verifica-se, como foi notado na Figura 18b, a presença da substância gelatinosa, seja ela em forma de placas ou em forma de gotas, as quais foram assinaladas nas micrografias.

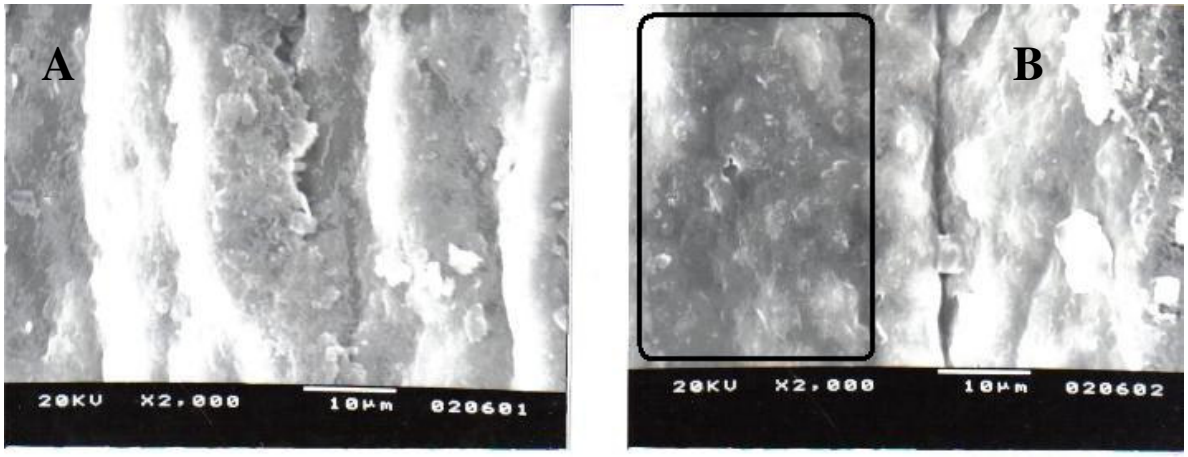

Figura 18: Imagens (MEV) dos eletrodos da marca 3 sem (A) e com (B) filme antes da aplicação da voltametria cíclica.

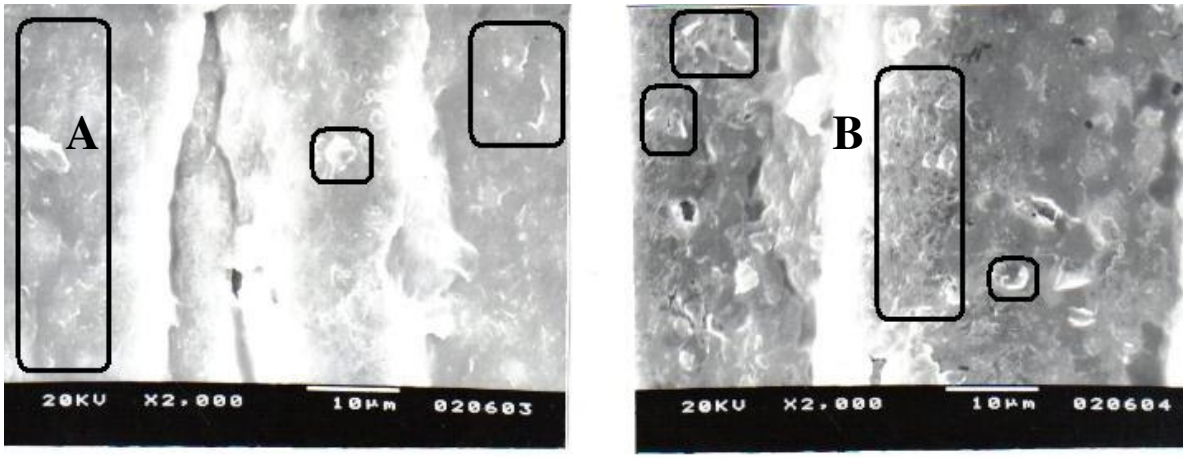

Figura 19: Micrografia após traçadas as voltametrias cíclicas em solução tampão BR pH 4 (A) e pH 5 (B) no aumento de 2000 vezes.

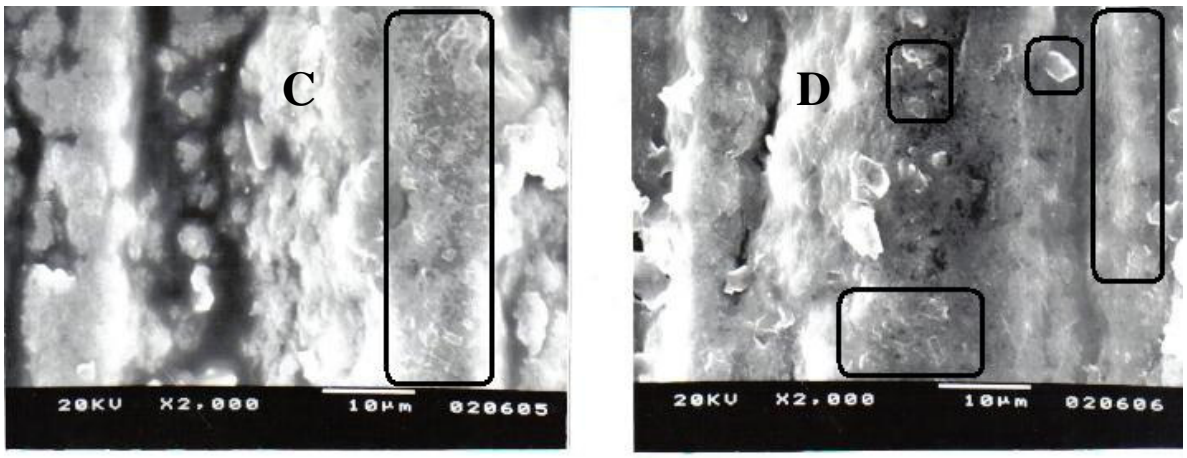

Figura 19: Micrografia após traçadas as voltametrias cíclicas em solução tampão BR pH 6 (C) e pH 7 (D) no aumento de 2000 vezes.

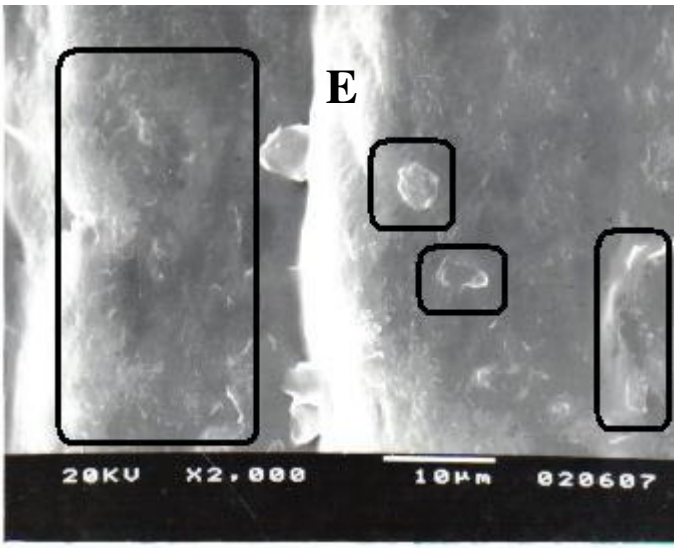

Figura 19: Micrografia após traçadas as voltametrias cíclicas em solução tampão BR pH 8 (E) no aumento de 2000x.

Com isso, após o aumento do pH, o filme não foi removido, portanto a hipótese de que o filme não resistiria ao aumento no pH foi descartada. Para a explicação então da diminuição da corrente no potencial de oxidação em torno de -0,8 V (Pico 4 na Figura 15b) é que este é referente a oxidação de H_2 para H^+, sendo maior o sinal conforme o aumento na concentração de H^+, como foi visto.

4.8. Peroxidase imobilizada por oclusão

Foram feitos os primeiros estudos sobre o comportamento da enzima peroxidase imobilizada no eletrodo pelo filme de titânio. Neste experimento, a concentração de peroxidase em relação à quantidade de filme era de 30 unidades da enzima para 5 mL de filme colocados em um béquer onde foi realizado o *dip-coating*, ou seja, a quantidade de enzima adicionada para a realização da deposição é de 30 µL de uma solução aquosa da enzima de concentração 1mg mL^{-1} (Item 3.2.1).

Os testes foram feitos para eletrodos com o filme, sendo estes divididos em 2 grupos, um sem a enzima imobilizada (Figura 20a) e outro com enzima imobilizada por oclusão (Figura 20b), utilizando-se os parâmetros pré-determinados. Foram traçados VC em solução tampão BR pH 4, outro com a solução tampão BR e solução de H_2O_2

($1{,}0x10^{-3}$ mol L^{-1}), outro com a solução tampão BR e solução de KI ($3{,}0x10^{-3}$ mol L^{-1}) e por ultimo com a solução tampão BR e as soluções de H_2O_2 e KI citadas acima.

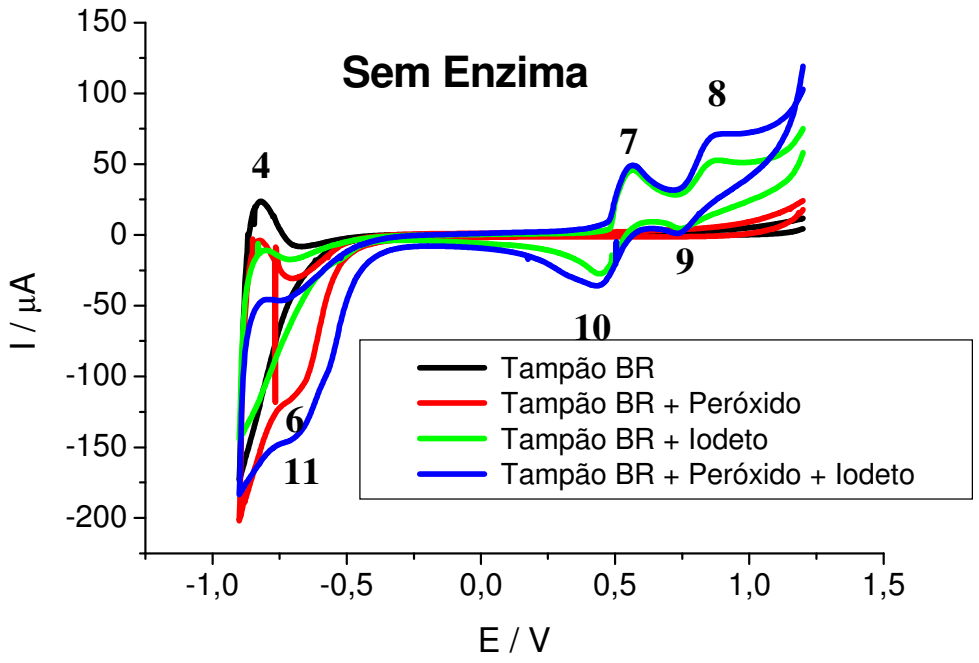

Figura 20a: Estudo da influência do sistema H_2O_2/I^- na solução tampão BR pH = 4 por voltametria cíclica traçada com eletrodos da marca 3 com filme e sem a peroxidase, velocidade de depósito de 100 mm min^{-1} e 2 depósitos realizados; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

Na Figura 20a, sendo todos os testes sem enzima, observa-se um comportamento já esperado para o teste apenas com a solução tampão BR em pH 4 (curva em preto), com o pico de oxidação em torno de -0,8V referente ao filme indicado pelo pico 4. Com a adição de H_2O_2 (curva em vermelho), ocorre um aumento na intensidade de corrente em torno do potencial de redução de -0,6V indicado pelo pico 6. Na presença do mediador I^- (curva em verde), nota-se o surgimento de picos de redução e oxidação entre os potenciais 0 a +1,5V, referentes a esta substância indicados pelos picos 7, 8, 9 e 10. E com a adição de ambas as substâncias (azul), nota-se os picos referentes a cada um, tanto em -0,6V para o peróxido (Pico 11) como entre 0 e +1,5V para o iodeto.

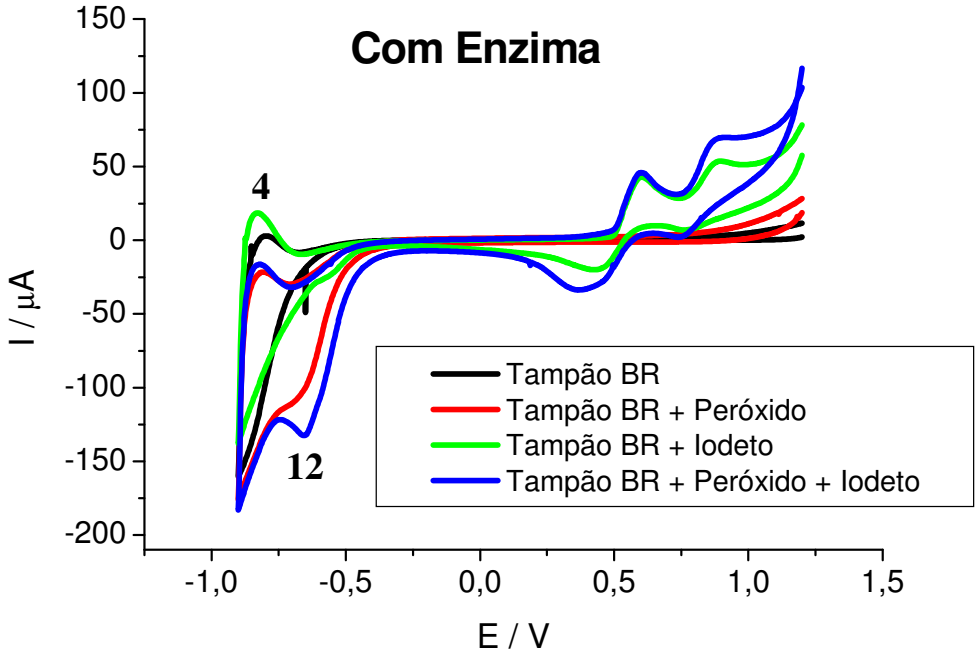

Figura 20b: Estudo da influência do sistema H_2O_2/I^- na solução tampão BR pH 4 por voltametria cíclica traçada com eletrodos da marca 3 com filme e com a enzima peroxidase na concentração 30uL/5mL de filme, velocidade de depósito de 100 mm min^{-1} e 2 depósitos realizados; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

Na Figura 20b, onde em todos os testes os eletrodos possuíam a enzima, nota-se todos os comportamentos já descritos acima, exceto para o sistema H_2O_2/I^- (curva em azul), onde para este, observa-se a intensificação de um pico em torno do potencial de redução -0,6 V indicado pelo pico 12, referentes à catálise do sistema peroxidase/peróxido com a contribuição na transferência de elétrons do mediador I^-.

De acordo com os experimentos realizados, nota-se na Figura 20b, que a resposta sobre a catálise enzimática estará representada em voltametrias na redução, pois esta catálise em relação à peroxidase consiste na redução do peróxido que oxida o Fe^{3+} do sitio ativo da enzima à Fe^{4+}. A presença o iodeto como mediador proporciona uma maximização da reação.

Para os próximos experimentos será excluída a parte do voltamograma que possui potencial positivo, pois esta parte se relaciona com apenas com a oxirredução referente à adição do iodeto.

4.9. Estudo do efeito da velocidade de varredura

Para os próximos experimentos será excluída a parte do voltamograma que possui potencial positivo, pois esta parte se relaciona com apenas com a oxirredução referente à adição do iodeto.

Nesta etapa estuda-se a influência da velocidade de varredura nas respostas referentes aos voltamogramas cíclicos obtidos. Sabe-se que a velocidade de varredura menor permite a observação de reações de cinética reduzida, sendo todo tipo de reação visualizada na voltametria. Por outro lado, esta velocidade menor possibilitaria a síntese de óxidos que poderiam passivar o eletrodo em questão. Varreduras com velocidades elevadas não permitem a observação de reações da baixa cinética ocorrem, sendo assim omitidos alguns dados importantes.

Os experimentos foram realizados variando a velocidade de varredura entre 20, 50, 100 e 200 mV s^{-1}, sendo todos os experimentos realizados com eletrodos de grafite com o filme de titânio sem e com enzima.

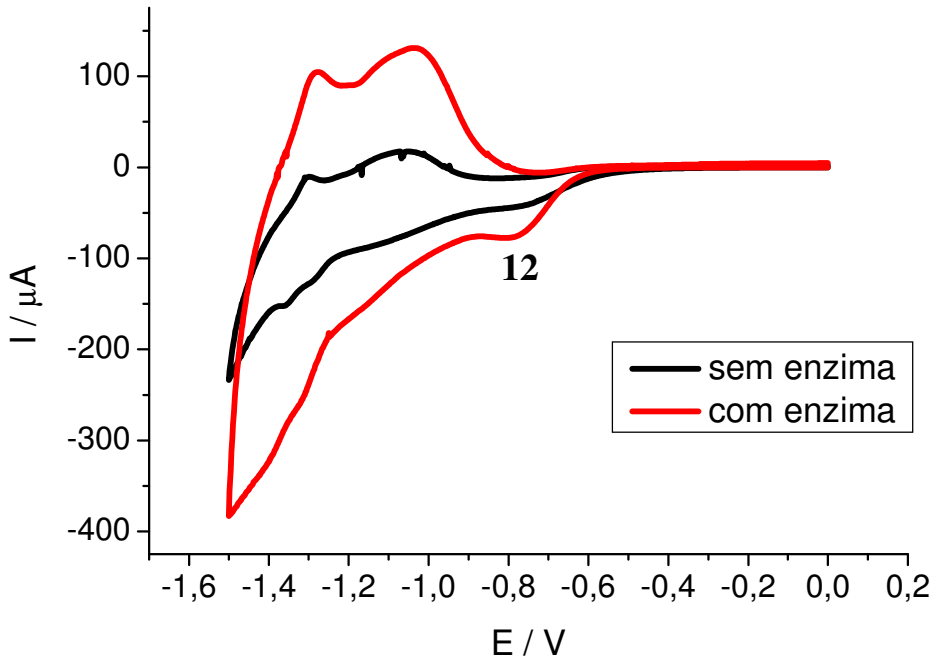

Figura 21a: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH 4 e o sistema H_2O_2/I^- com eletrodos de grafite da marca 3 , com filme e sem enzima e com filme e a enzima imobilizada por oclusão; ν = 20 mV s^{-1} (a) *vs.* Ag/AgCl.

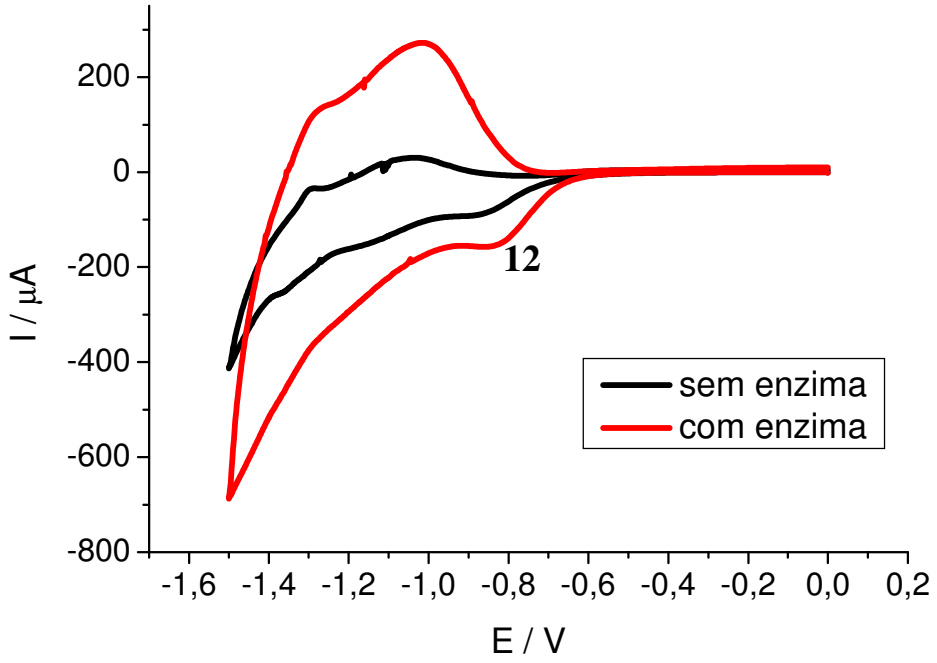

Figura 21b: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH 4 e o sistema H_2O_2/I^- com eletrodos de grafite da marca 3 , com filme e sem enzima e com filme e a enzima imobilizada por oclusão; ν = 50 mV s^{-1} (b) *vs.* Ag/AgCl.

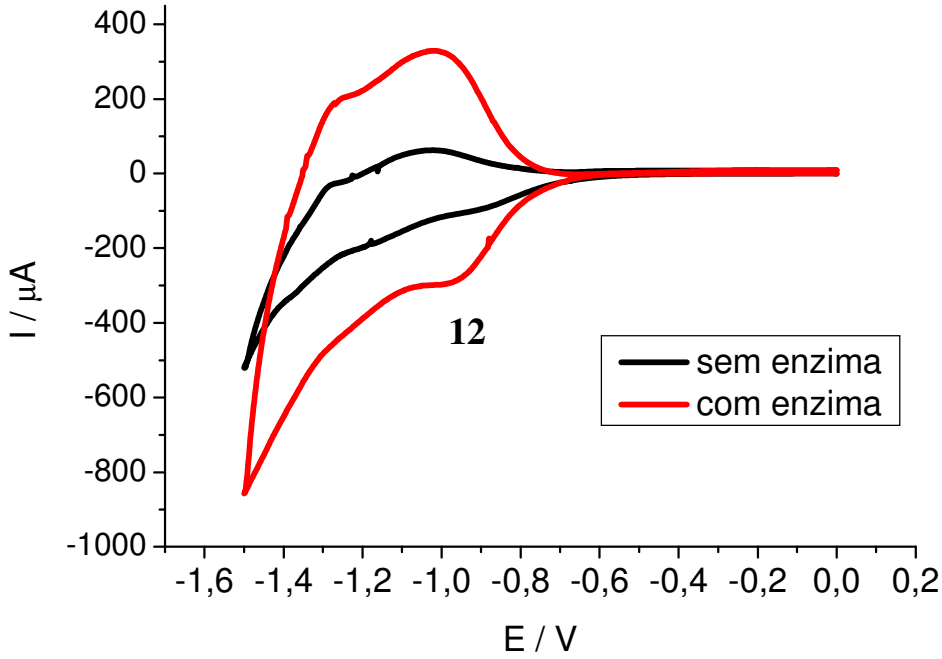

Figura 21c: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH 4 e o sistema H_2O_2/I^- com eletrodos de grafite da marca 3 , com filme e sem enzima e com filme e a enzima imobilizada por oclusão; ν = 100 mV s^{-1} (c) *vs.* Ag/AgCl.

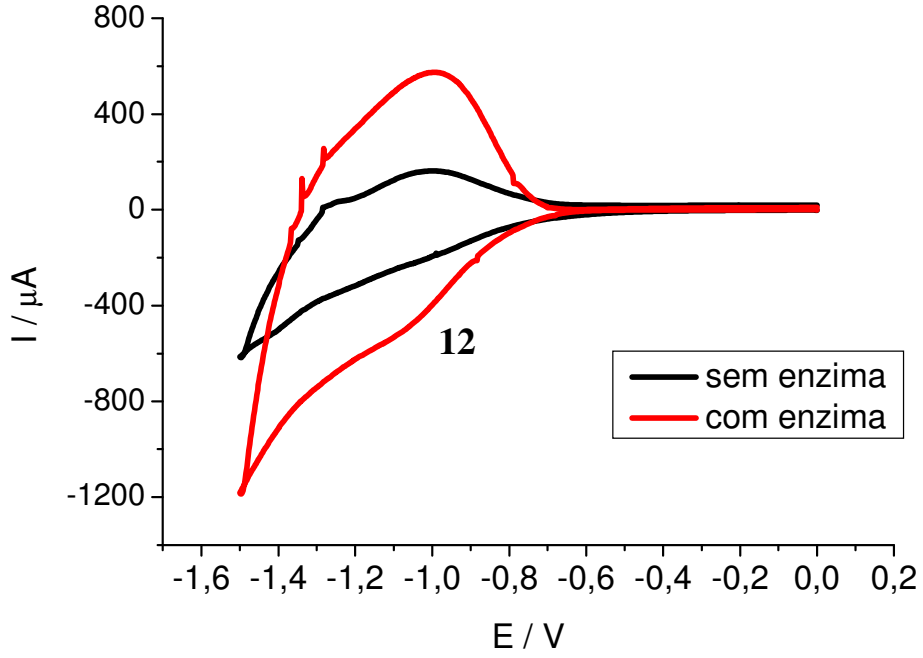

Figura 21d: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH 4 e o sistema H_2O_2/I^- com eletrodos de grafite da marca 3 , com filme e sem enzima e com filme e a enzima imobilizada por oclusão; ν = 200 mV s^{-1} (d) *vs.* Ag/AgCl.

Observa-se em todos os experimentos, na região catódica, um pico marcado pelo pico 12 em torno de -0,8 V, deslocado conforme o aumento da velocidade de varredura, sendo este pico referente à resposta da catálise enzimática. Nota-se que nas Figuras 21a, 21b, 21c e 21d, quanto mais rápida a velocidade de varredura menos definido fica o pico descrito acima. Com isso continua-se a utilizar velocidades de varredura de 50 mV s^{-1}, pois esta velocidade garante a observação do pico de redução desejado, sem ser muito lenta a ponto de produtos serem formados na superfície do eletrodo, passivando-o.

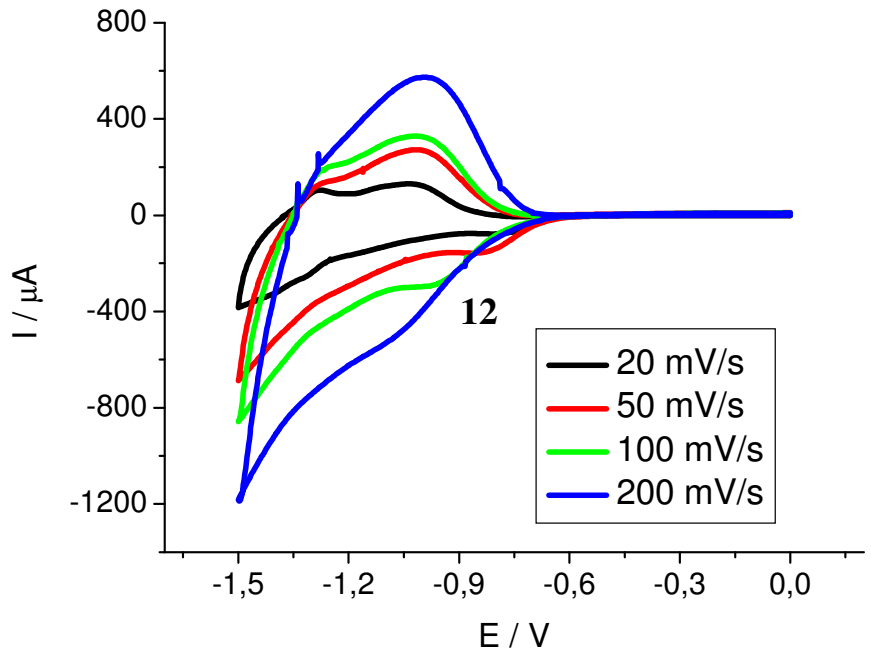

Figura 22: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH 4 e o sistema H_2O_2/I^- com eletrodos de grafite da marca 3 com filme e a enzima imobilizada por oclusão; ν = 20, 50, 100, 200 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

Na comparação entre as voltametrias cíclicas com velocidades de varredura diferentes, nota-se que o aumento desta velocidade proporciona uma maior passagem de corrente. Também nota-se que a mudança na velocidade de varredura desloca o potencial de pico referente a catálise enzimática marcado pelo pico 12 da Figura 22.

4.10. Estudo sobre o pH ótimo da enzima

Como foi visto, todos os testes realizados até agora foram feitos com pH = 4, pois este pH proporciona nas voltametrias um pico oxidação referente ao filme em torno de -0,8 V mostrado no pico 12 da Figura 20b. Isto só ocorre devido ao pH citado possibilitar a formação de H_2, sendo este adsorvido apenas em eletrodos com filme. Com o H_2 adsorvido, na oxidação ele se torna H^+, onde se observa o pico citado no pico 4 na Figura 23.

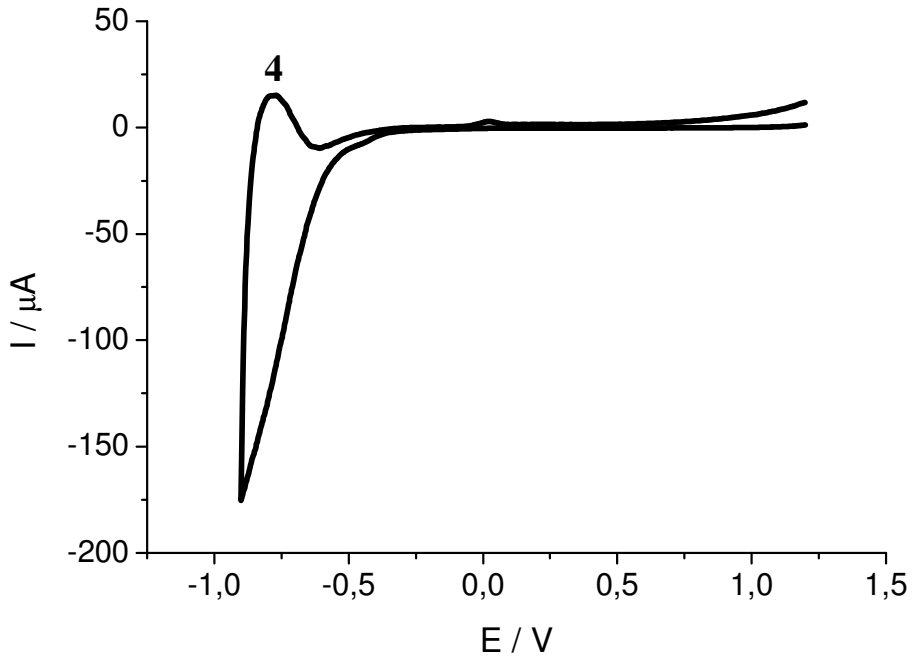

Figura 23: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH 4 com eletrodos de grafite da marca 3 , com filme e sem enzima; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

Já para pH = 7, por possuir no eletrólito uma quantidade bem menor de H^+, o pico referente à presença do filme (Pico 4 da Figura 23) não aparece (Figura 24).

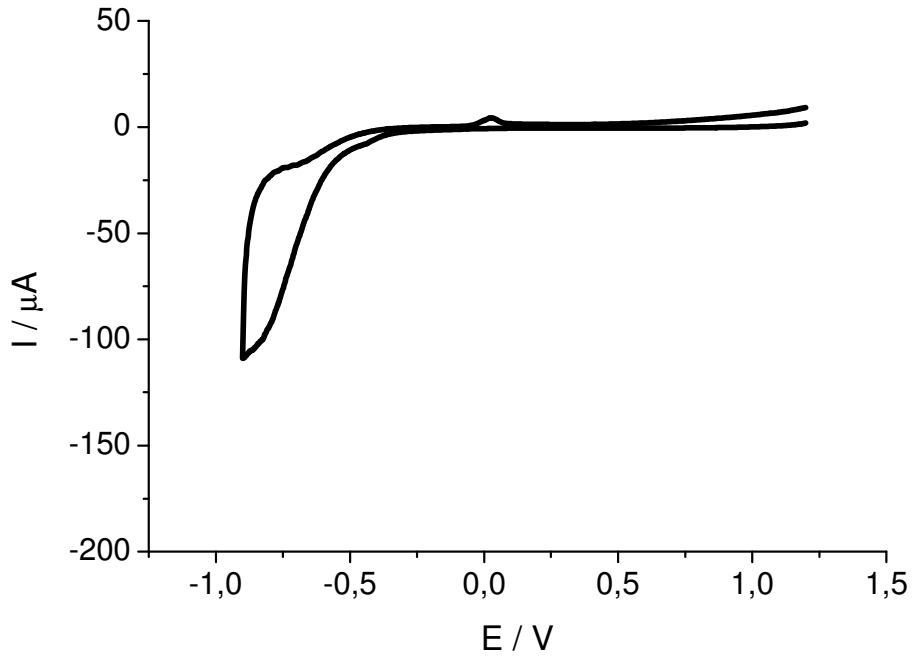

Figura 24: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH 7 com eletrodos de grafite da marca 3 , com filme e sem enzima; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

É interessante ressaltar que o pH 4 é de vital importância para se observar, através de um voltamograma, a presença do filme fino na superfície do eletrodo. Sabendo que o pH ótimo da enzima peroxidase é o pH = 7, escolheu-se a partir de agora, já que a deposição do filme foi estudada, este pH para serem realizadas as voltametrias cíclicas. Uma outra vantagem é que este pH = 7 proporciona uma menor passagem de corrente, diminuindo assim a escala de corrente dos voltamogramas traçadas. Com a escala menor, o pico de redução referente a catálise ficaria mais definido, sendo algo que melhoraria os resultados.

Observando a Figura 21b, velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}, ou seja, velocidade escolhida no experimento nota-se que o pico de redução referente a catálise, mostrado no pico 12, não está muito bem definido, pois possui uma pequena variação de corrente. Para efeito de aperfeiçoar os resultados, foi realizada uma comparação entre os métodos de imobilização por oclusão, utilizado até o momento, e o método por adsorção.

4.11. Estudo da variação da concentração da enzima imobilizada por oclusão

Neste experimento, descrito no item 3.2.1., observa-se o surgimento do pico referente à catálise enzimática indicado pelo pico 12 na Figura 25. Com o aumento da concentração da enzima imobilizada por oclusão ocorre um aumento da corrente do pico citado (Figura 25).

Neste gráfico, observa-se que quanto maior a quantidade de enzima imobilizada, maior a passagem de corrente, principalmente na região de -0,75 V, indicado pelo pico 12. Isto prova que, na região catódica do gráfico, observa-se a catálise enzimática. Um dado importante é a voltametria cíclica para eletrodos preparados com 15 μL de enzima no procedimento já descrito. Neste caso, devido à pequena quantidade de enzima por eletrodo, não é observado o pico de redução citado.

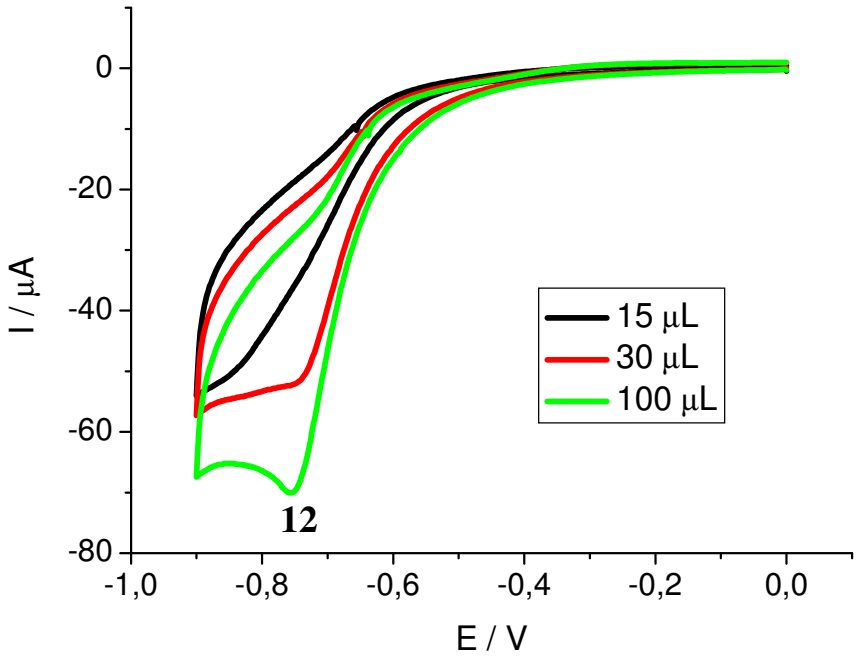

Figura 25: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR **pH = 7** e o sistema H_2O_2/I^- com eletrodos de grafite da marca 3 , com filme e com enzima imobilizada por oclusão; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

4.12. Estudo da variação da concentração da enzima imobilizada por adsorção

Neste experimento, descrito no item 3.2.2., observa-se o surgimento do pico referente à catálise enzimática indicado pelo pico 12 na Figura 26. Com o aumento da concentração da enzima imobilizada por adsorção ocorre um aumento da corrente do pico citado (Figura 26).

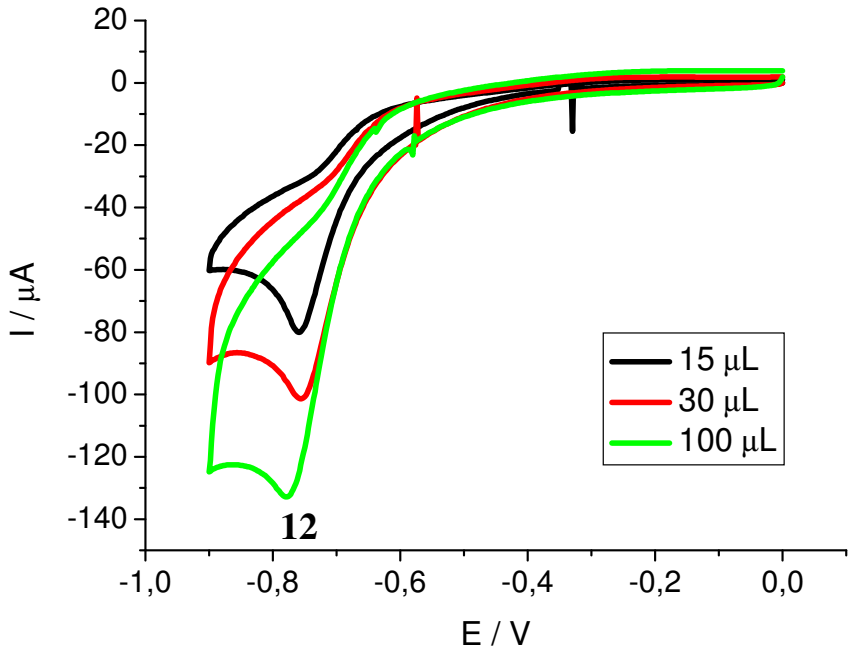

Figura 26: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR **pH = 7** e o sistema H_2O_2/I^- com eletrodos de grafite da marca 3 , com filme e com enzima imobilizada por adsorção; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

Neste gráfico, observa-se também que quanto maior a quantidade de enzima imobilizada, maior a passagem de corrente na região de -0,75 V para potenciais de redução. Isto prova que, nesta região do gráfico, observa-se a catálise enzimática.

Para ambas as imobilizações, a quantidade de 100 µL de enzima é a de melhor desempenho, pois possuem a maior quantidade de corrente no pico referente a catálise enzimática. Com isso, a comparação agora é entre os tipos de imobilização, descrita na Figura 27.

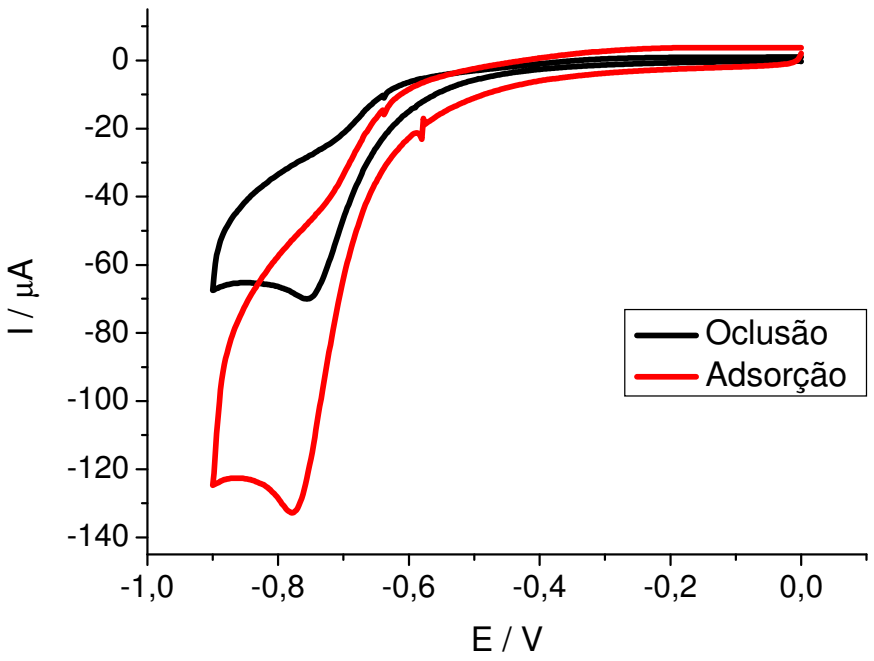

Figura 27: Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR pH = 7 com eletrodos de grafite da marca 3 , com filme e com enzima imobilizada por adsorção; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

Na comparação entre os 2 métodos de imobilização, observa-se, para o método de imobilização por adsorção, uma maior corrente de pico no potencial de redução referente à catálise. Isso ocorre devido o método de adsorção proporcionar uma maior exposição das moléculas da enzima peroxidase em relação ao eletrólito, o que não ocorre para a imobilização por oclusão, onde as moléculas da enzima ficam confinadas ao interior da matriz, onde já no processo de modificação da superfície do eletrodo a enzima é inserida.

4.13. Estudo do efeito do sistema peróxido/iodeto

Após a comparação entre os dois tipos de imobilizações e a diferença entre elas, o próximo experimento foi realizado apenas com a imobilização por adsorção. As VC foram traçadas em quatro grupos, mas todas possuem a enzima imobilizada. A primeira curva foi traçada tendo como eletrólito, apenas a solução tampão BR. A segunda foi traçada tendo como eletrólito a solução tampão e 300 µL da solução de KI. Já a terceira, o eletrólito era a solução tampão com a adição de 100 µL da solução de H_2O_2. E na quarta VC, o eletrólito era o sistema de estudo, com o tampão, o KI e o H_2O_2.

Na Figura 28, nota-se que as curvas com a adição de peróxido possuem o pico de redução em torno -0,75 V indicado pelo pico 6 e 12, o que não é observado nas curvas que não possui esta substância, ou seja, o pico descrito refere-se a redução do peróxido, que oxida o ferro do sitio ativo da peroxidase do eletrodo. Já a adição de iodeto em um sistema com peróxido mostra uma resposta referente à catálise muito maior indicado pelo pico 12 da Figura 28, sendo o KI o mediador da reação, facilitando a transferência eletrônica. Em VC sem o mediador (Pico 6) a resposta é relativamente menor.

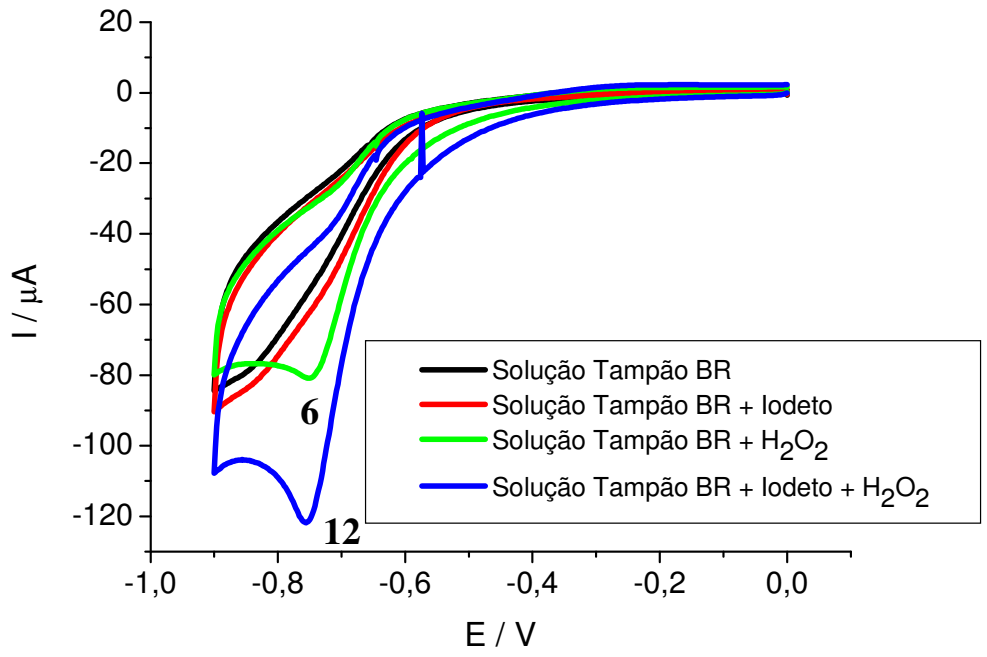

Figura 28: Voltamograma cíclico em solução tampão BR pH = 7 e o sistema H_2O_2/I^- com eletrodos de grafite da marca 3, com filme e com enzima imobilizada por adsorção; ν = 50 mV s^{-1} *vs.* Ag/AgCl.

5. Conclusões

Foram investigados 5 marcas de grafite de lapiseira, onde a marca escolhida foi a marca 3, pois possui intensidade de corrente adequada, excelente reprodutibilidade independente da temperatura ambiente e disponibilidade no mercado.

Comparando os diferentes tipos de grafites da mesma marca, ou seja, o HB e o 2B, conclui-se que o de melhor desempenho é o HB, pois este possui uma superfície própria para modificação pelo filme de titânio. As grafites de lapiseira são revestidas de parafina que devem ser removidas pois apresenta um pico de redução em torno de 0,75 V (Ponto 1 da Figura 13), muito próximo ao pico esperado para a resposta da catálise enzimática, porem com uma corrente baixa.

Outro parâmetro determinado foi a velocidade de depósito, onde quanto mais lenta a velocidade de imersão/emersão mais espesso o filme formado. Com isso, determina-se a velocidade de 100 mm min^{-1} como a mais apropriada.

Nota-se que, quanto maior o número de depósitos maior intensidade de corrente. Com 1 depósito alguns eletrodos não possuíam filme (baixa reprodutibilidade) enquanto que com 2 ou 3 depósitos praticamente todos os eletrodos foram recobertos pelo filme. Considerando a necessidade de secagem de 24 horas entre a deposição de um filme e outro e que 2 ou 3 depósitos apresentam a mesma eficiência, a modificação do eletrodo foi efetuada com 2 depósitos de filme.

Em relação a solução tampão, foi escolhido a solução tampão BR, pois possui o mesmo comportamento eletroquímico do que a solução tampão acetato, mas um intervalo de pH de 2 à 12, enquanto a última apenas de pH de 4 a 6.

O estudo da relação entre a variação de pH e o filme foi feito e mesmo com o aumento do pH as características físicas do filme não se alteram, onde isso foi confirmado por micrografias.

Os experimentos que se referem à velocidade de varredura para as voltametrias cíclicas mostram que a melhor velocidade a ser utilizada nestes casos é a de 50 mV s^{-1}, nesta velocidade, a resposta enzimática pode ser nota de maneira mais bem definida.

O estudo da imobilização da enzima peroxidase no eletrodo de grafite pelo filme de titânio foi feito. O perfil dos voltamogramas na presença e ausência da enzima é similar, mas o pico ao redor de –0,7 V (Ponto 1 da Figura 20b) estão mais bem definidos quando a enzima está imobilizada no filme. Para os tipos de imobilização,

tem-se que ambos, tanto a oclusão como a adsorção, podem ser utilizados para a construção do biossensor em questão, pois possuem como resposta a catálise enzimática um pico de redução em -0,75 V (Figura 27). A diferença entre os métodos é sua eficiência, sendo o método de imobilização por adsorção o de maior corrente quando ocorrida a catálise.

Para o efeito do sistema peróxido/iodeto, nota-se que, para as curva que se tem a presença do H_2O_2, a formação do pico em -0,75 V (Figura 28). Já para as curvas sem o peróxido, este pico não é observado, comprovando ainda mais a relação desta substancia com a resposta em relação à cátalise.

Portanto, neste presente trabalho, foi observado a construção de um biossensor com a modificação de sua superfície sem a necessidade de calcinação e com a observação da imobilização eficiente, observada através da catálise enzimática medida.

Referências

1 DEL OLMO, M.; DIEZ, C.; MOLINA, A. de ORBE, I.; VILCHEZ, J. L. Resolution of phenol, o-cresol, m-cresol and p-cresol mixtures by excitation fluorescence using partial least-squares (PLS) multivariate calibration. *Anal. Chim. Acta*, v. 335, n. 1-2, p. 23-33, 1996.

2 MARKOVARGA, G.; EMNÉUS, J.; Lo GORTON; RUZGAS, T. Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic-compounds. *Trends Anal. Chem.*, v. 14, p. 319-328, 1995.

3 KARUBE, I.; NOMURA, Y.; ARIKAMA, Y. Suppression of calphobindin-i (cpb-i) production in carcinoma of uterine cervix and endometrium. *Trends Anal. Chem.*, v. 14, p. 295-300, 1995.

4 NISTOR, C.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; CIUCU, A. Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds. *Anal. Chim. Acta*, v. 387, p. 309-326, 1999.

5 SVITEL, J.; MIERTUS, S. Development of tyrosinase based biosensor and its application for monitoring of bioremediation of phenol and phenolic compounds. *Environ. Sci. Technol.*, v. 32, p. 828-832, 1998.

6 PARELLADA, J.; NARVÁEZ, A.; LÓPEZ, M. A.; DOMÍNGUEZ, E.; FERNÁNDES, J. J.; PAVLOV, V.; KATAKIS, I. Amperometric immunosensors and enzyme electrodes for environmental applications. *Anal. Chim. Acta,* v. 362, p. 47-57, 1998.

7 PUIG, D.; BARCELO, D. Determination of phenolic compounds in water and waste water. *Trends Anal. Chem.,* v. 15, p. 362-375, 1996.

8 ORTEGA, F.; DOMÍNGUEZ, E.; BURESTEDT, E.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; MARKOVARGA, G. Phenol oxidase-based biosensors as selective detection units in column liquid-chromatography for the determination of phenolic-compounds. *J. Chromatogr.,* v. 675, p. 65-78, 1994.

9 VILCHEZ, J. L.; DEL OLMO, M.; DIEZ, C.; MOLINA, A.; ORBE, I. Resolution of phenol, o-cresol, m-cresol and p-cresol mixtures by excitation fluorescence using partial least-squares (PLS) multivariate calibration. *Anal. Chim. Acta,* v. 335, n. 1-2, p. 23-33, 1996.

10 KOTTE, H.; GRÜNDIG, B.; VORLOP, K. D.; STREHLITZ, B.; STOTTMEISTER, V. Methylphenazonium-modified enzyme sensor-based on polymer thick-films for subnanomolar detection of phenols. *Anal. Chem.,* v. 67, p. 65-70, 1995.

11 MULCHANDANI, A.; BASSI, A. S. Principles and applications of biosensors for bioprocess monitoring and control. *Crit. Rev. Biotechnol.,* v. 15, p. 105-124, 1995.

12 RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. *Quim. Nova,* v. 25, p. 316-320, 2002.

13 BURESTEDT, E.; NARVAEZ, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L.; EMNÉUS, J.; DOMÍNGUES, E.; MARKOVARGA, G. Rate-limiting steps of tyrosinase-modified electrodes for the detection of catechol. *Anal. Chem.,* v. 68, p. 1605-1611, 1996.

14 GORTON, L.; JÖNSSONPETERSSON, G.; CSÖREGI, E.; JOHANSSON, K.; DOMÍNGUEZ, E.; MARKOVARGA, G. Amperometric biosensors based on an apparent direct electron-transfer between electrodes and immobilized peroxidases - plenary lecture. *Analyst,* v. 117, p. 1235-1241, 1235.

15 KINOSHITA, K. *Carbon*: electrochemical and physicochemical properties. New York: Wiley, 1988.

16 RAZUMAS, V. J.; JASAITIS, J. J.; KULYS, J. J. Electrocatalytic oxidation of catechol phosphate by immobilized alkaline-phosphatase. *Bioelectrochem. Bioenerg.,* v. 10, p. 427-439, 1983.

17 WANG, J. Modified electrodes for electrochemical sensors. *Electroanalysis,* v. 3, p. 255-259, 1991.

18 GORTON, L. Carbon-paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells. *Electroanalysis,* v. 7, p. 23-45, 1995.

19 DUNFORD, H. B. Horseradish peroxidase: structure and kinetics properties. In: EVERSE, J.; EVERSE, K. E.; GRISHAN, M. B. (Ed.). *Peroxidases in chemistry and biology.* Boca Raton: CRC Press, 1991.

20 RUZGAS, T.; CSÖREGI, E.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; MARKOVARGA, G. Peroxidase-modified electrodes: fundamentals and application. *Anal. Chim. Acta,* v. 330, p. 123-138, 1996.

21 LINDGREN, A.; EMNÉUS, J.; RUZGAS, T.; GORTON, L.; MARKOVARGA, G. Amperometric detection of phenols using peroxidase-modified graphite electrodes. *Anal. Chim. Acta*, v. 347, p. 51-62, 1997.

22 COX, J. A.; TESS, M. E.; CUMMINGS, T. E. Electroanalytical methods based on modified electrodes: a review of recent advances. *Rev. Anal. Chem.*, v. 15, p. 173-223, 1996.

23 FERRET, S.; PAYNTER, S.; RUSSELL, D. A.; SAPSFORD, K. E.; RICHARDSON, D. J. Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces. *Trends Anal. Chem.,* v. 19, p. 530-540, 2000.

24 LINFORD, R. G. *Electrochemical science and technology of polymers.* London: Elsevier, 1987.

25 MALINAUSKAS, A. Electrocatalysis at conducting polymers. *Synth. Met.,* v. 107, p. 75-83, 1999.

26 GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosens. Bioelectron.,* v. 17, p. 345-359, 2002.

27 ROSATTO, S. S.; KUBOTA, L. T.; OLIVEIRA NETO, G. Biosensor for phenol based on the direct electron transfer blocking of peroxidase. *Anal. Chim. Acta*, v. 390, p. 65-72, 1999.

28 FERREIRA, A. A. P.; COLLI, W.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Immunosensor for the diagnosis of Chagas' disease. *Biosens. Bioelectron.,* v. 21, p. 175-181, 2005.

29 FERREIRA, A. A. P.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M.; OLIVEIRA, D. R.; COSTA, P. I.; GUELL, A. G.; SANZ, F.; BENEDETTI, A. V.; YAMANAKA, H. Investigation of the interaction between Tc-85 protein and antibody anti-T.cruzi by AFM and amperometric measurements. *Electrochim. Acta,* v. 51, p. 5046-5052, 2006.

30 RICCARDI, C. S.; DALMOUCHE, K.; SANTILLI C. V.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. DNA immobilization of streptavidin in sol-gel films: application on the diagnosis of hepatitis C virus. *Talanta*, v. 70, p. 637-43, 2006.

31 RICCARDI, C. dos S. *Estudo sobre imunossensor para atrazina*. 2001. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

32. OSUGI, M. E. *Oxidação fotoeletrocatalítica e determinação eletroquímica de corante metaloftalocianina.* 2004. 83 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo