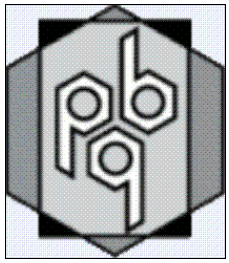
JONATAN SALLES DA SILVA



BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO À BASE DE PEROXIDASE EM MATRIZ DE BASTÃO DE GRAFITE COMERCIAL: ESTUDOS PRELIMINARES

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS

ESCOLA DE **Q**UÍMICA
UNIVERSIDADE **F**EDERAL DO **R**IO DE **J**ANEIRO

Fevereiro, 2010

BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO À BASE DE PEROXIDASE EM MATRIZ DE BASTÃO DE GRAFITE COMERCIAL: ESTUDOS PRELIMINARES

Jonatan Salles da Silva

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado por:

_____

Belkis Valdman, D.Sc.
(orientador – presidente da banca)

_____

Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.
(orientador)

_____

Eliana Mossé Alhadeff, D.Sc.

_____

Ninoska Bojorge Ramírez, D.Sc.

_____

Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Fevereiro de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Biossensor amperométrico à base de peroxidase em matriz de bastão de grafite comercial: estudos preliminares / Jonatan Salles da Silva. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2010.

xix, p. 82; il.

(dissertação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2010.

Orientador(es): Andréa Medeiros Salgado e Belkis Valdman.

1. Horseradish peroxidase 2. fenol 3. bastão de grafite. 4. Dissertação. (Mestrado – UFRJ/EQ). 5. Andréa Medeiros Salgado e Belkis Valdman.

I. Título.

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

I Coríntios 13.2

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, meu pai de amor, criador e sustentador de todas as coisas e ao mesmo tempo amigo fiel de todas as horas.

Aos meus queridos pais Domingos e Madalena por todo o incentivo e amor sempre presentes.

À minha querida vó Daria pelas orações e carinhos demonstrados.

À TOYOBO, por ter cedido gentilmente a amostra de Horseradish peroxidase.

À orientadora Profa. Andréa Medeiros Salgado pelo apoio, orientação, paciência, cordialidade e confiança demonstrados em todo o tempo. Meu profundo agradecimento.

À orientadora Profa. Belkis Valdman, pelo incentivo, acompanhamento e orientações valiosas no planejamento e conclusão do trabalho. Obrigado por tudo.

À profa. Ninoska Bojorge Ramírez, pelo profundo conhecimento passado ao longo dos anos e acessibilidade demonstrada. Foi muito proveitoso trabalhar com a senhora.

À minha querida Georgiana pelo amor e diálogos dedicados ao longo dos anos.

À amiga e colega de trabalho Cristiane Ribeiro pelo apoio no momento mais difícil. Muito obrigado.

Aos meus companheiros de laboratório: Lívia Maria, Álvaro Boareto, Leonardo Ivar e João Paulo. Foi muito bom conviver com vocês neste período.

Ao amigo Marco Veiga pelas trocas de idéias e pelo companheirismo demonstrado.

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessário para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO À BASE DE PEROXIDASE EM MATRIZ DE BASTÃO DE GRAFITE COMERCIAL: ESTUDOS PRELIMINARES

Jonatan Salles da Silva

Fevereiro, 2010

Orientadores: Prof. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

Prof. Belkis Valdman, D.Sc.

Fenol e seus derivados são usados em muitas áreas e frequentemente são encontrados em águas industriais, como por exemplo refinarias de óleos, plásticos, tintas e indústria farmacêutica. Enquanto vários compostos fenólicos, especialmente clorofenol, são altamente tóxicos para o homem e organismos aquáticos, estruturas fenólicas são usadas em preparações farmacêuticas. Por estas razões, muitos deles têm sido incluídos em legislações ambientais. A regulação ambiental brasileira, descreve no capítulo II da resolução CONAMA 357/05 o limite máximo de fenóis totais em cada tipo de corpo d'água natural. Com isso, a detecção seletiva e sensitiva de compostos fenólicos é muito importante pois sua concentração deve ser cuidadosamente controlada. Muitos métodos para a detecção de fenol são descritos na literatura, tais como cromatografia líquida com detecção por UV, detecção eletroquímica direta ou biossensores. Biossensores apresentam vantagens importantes em detrimento dos outros métodos como automação e miniaturização de técnicas analíticas biológicas, desenvolvimento de equipamentos de quantificação on-line e remoto, método de baixo custo e rápido tempo de resposta. O presente trabalho desenvolveu estudos preliminares sobre a construção de eletrodos de grafite para a determinação de fenol. A mina de grafite usada neste trabalho, apresentou 88 x 2.0 mm e dureza HB. Testes iniciais avaliaram a influência da área efetiva sobre o eletrodo de grafite. As reduções do comprimento do eletrodo de grafite por meio de cortes sucessivos também foram testados além da resposta voltamétrica gerada pelo polimento do eletrodo de grafite. Após estes testes, o eletrodo foi imobilizado com a peroxidase e comparadas as respostas antes e depois do processo de imobilização. O comportamento do eletrodo em diferentes soluções de peróxido, fenol, tampão fosfato e os

efeitos da concentração de fenol, concluíram os experimentos. Os resultados obtidos com a área efetiva da mina de grafite e o posicionamento da garra, não mostraram diferenças significativas entre as respostas. As reduções do eletrodo de grafite influenciaram diretamente na resposta eletroquímica com a formação dos picos catódicos e anódicos. Em relação ao processo de polimento, as análises mostraram sinais de corrente mais altos para o eletrodo polido (na ordem de 20 μA). Sinais não significantes foram encontrados para soluções de peróxido, fosfato e fenol quando comparados com solução de ferrocianeto de potássio 16 mM. Além disso, diferentes concentrações de fenol revelaram uma faixa linear de leitura dos picos obtidos na faixa de 100-800 μmol/L.

Abstract of a Dissertation presented to Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science.

PEROXIDASE-BASED AMPEROMETRIC BIOSENSOR IN MATRIX OF COMMERCIAL GRAPHITE LEAD: PRELIMINARY STUDIES

Jonatan Salles da Silva
Fevereiro, 2010

Supervisors: Prof. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.
Prof. Belkis Valdman, D.Sc.

Phenol and its derivative compounds are used in many areas and commonly found in industrial waste from for example oil refinery, paint, plastic, and pharmaceutical industry. While several phenols compounds, especially chlorophenol, are highly toxic for humans e aquatic organisms, phenolic structures are used to pharmaceuticals preparations. For these reasons, many of them have been included in environmental legislation. The brazilian's environmental regulation, describes in the second chapter of the CONAMA's resolution 357/05, the maximum limit of phenols for each kind of natural water fontain. Hence, the selective and sensitive detection of phenols compounds is very important because its concentration must be carefully controlled. Many methods for phenol detection are described in the literature, such as liquid chromatography with UV detection, direct electrochemical detection, or biosensors. Biosensors present important advantages when compared with others methods like automation and miniaturization of biological analytical techniques, development of on-line and remote measurement equipment, inexpensive method and quick response time. The present work developed preliminary studies about of a graphite electrode construction for phenol determination. Graphite lead rods used in this work, presented 88 x 2.0 mm and HB hardness. Initial tests evaluated the influence of the effective area on the graphite electrode. The reductions of the graphite electrode's length, through sucessive breakings, likewise were tested besides the voltammetric response generated by graphite electrode polishment. After these tests, the electrode was immobilized with peroxidase and compared the responses before and after the immobilisation process. The electrode behavior at different phosfate buffer, peroxide, phenol solutions and the effects of phenol concentrations, concluded the experiments. The results obtained with the effective graphite lead area and the eletric connector positioning showed no significant difference among the

responses. The reductions of the grafite electrode influenced directly the electrochemical response with formation of cathodic and anodic peaks. In relation to polishing process, analysis showed higher current signal for polished electrode (in order to 20 μA). No significant signals were found for peroxide, phosfate and phenol solutions when compared with potassium ferrocyanide 16 mM solution. In addition, differents phenol concentrations revealed a linear range from 100-800 μmol/L.

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** **1**

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS 1

2 **OBJETIVOS** **4**

2.1 OBJETIVO GERAL 4

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 4

3 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** **5**

3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS 5

3.2 ENZIMAS 6

3.2.1 **Peroxidases** **7**

3.2.1.1 *Peroxidase de raiz forte* 8

3.2.1.2 *Ciclo catalítico das peroxidases* 9

3.3 BIOSSENSORES 10

3.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS 12

3.4.1 **Adsorção** **13**

3.4.2 **Microencapsulação** **14**

3.4.3 **Oclusão em gel** **14**

3.4.4 **Ligação covalente cruzada** **15**

3.4.5 **Ligação covalente** **15**

3.5 VOLTAMETRIA CÍCLICA 16

3.6 BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS 20

3.6.1 **Materiais utilizados na construção de biossensores amperométricos** **21**

3.6.1.1 *Eletrodo de pasta de grafite* 22

3.6.1.2 *Eletrodo de pasta de carbono modificados com sílica* 22

3.6.1.3 *Eletrodo de bastão de grafite* 23

3.6.1.3.1 Características físicas 24

3.6.1.3.2 Características eletroquímicas 25

3.6.2 **Biossensor amperométrico para fenol** **26**

3.7 PEROXIDASE IMOBILIZADA EM ELETRODO 28

3.7.1 **Transferência de elétrons direta** **29**

3.7.2 **Transferência de elétrons mediada** **30**

4 **MATERIAL E MÉTODOS** **32**
4.1 EQUIPAMENTOS 32
4.2 CONSTRUÇÃO DO ELETRODO DE TRABALHO 32
4.3 PROCEDIMENTO DE TRATAMENTO E PREPARO DA SOLUÇÃO DE HRP 33
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS 34
4.4.1 **Determinação da atividade enzimática** **34**
4.4.2 **Quantificação de proteínas** **35**
4.4.3 **Análise por voltametria cíclica** **36**
4.5 PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO 37
4.6 ENSAIOS REALIZADOS PARA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO ELETRODO DE GRAFITE 37
4.6.1 **Efeito da área superficial do eletrodo de grafite comercial HB 2.0 mm TREE® e posicionamento da garra condutora no eletrodo quando usada solução de ferrocianeto de potássio 16 mM** **38**
4.6.2 **Efeito da redução do comprimento do eletrodo de grafite comercial HB 2.0 mm TREE® em ferrocianeto de potássio 16 mM** **38**
4.6.3 **Influência das soluções tampão, peróxido de hidrogênio e fenol na leitura do bastão de grafite** **39**
4.6.4 **Influência da concentração de fenol** **39**
5 **RESULTADOS E DISCUSSÃO** **40**
5.1 ESTUDOS INICIAIS 40
5.1.1 **Efeito do posicionamento da garra no bastão de grafite e efeito da área superficial do eletrodo** **40**
5.1.2 **Efeito da redução do comprimento e polimento do eletrodo de bastão de grafite** **41**
5.1.3 **Influência da solução tampão, fenol e peróxido na leitura do eletrodo de bastão de grafite** **43**
5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DA IMOBILIZAÇÃO 45
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS 47
5.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL 47

6 **CONCLUSÕES** **52**
7 **SUGESTÕES** **53**
8 **REFERÊNCIAS** **54**
ANEXO A - ***Armoracia rusticana*** 65
ANEXO B – LIMPEZA DO BASTÃO DE GRAFITE 66
ANEXO C - COMPARAÇÃO ENTRE BASTÃO LIMPO E NÃO LIMPO 67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de alguns derivados fenólicos. 5

Figura 2. Sítio catalítico de uma peroxidase – grupo Protoporfirínico 8

Figura 3. Representação 3D da peroxidase HRP 9

Figura 4. Ciclo catalítico da enzima peroxidase (HRP) 10

Figura 5. Representação das principais imobilizações, elementos biológicos utilizados, transdutores, materiais suportes e configurações 16

Figura 6. Representação de voltametria cíclica típica, com os seus principais parâmetros 18

Figura 7. Voltametria cíclica de eventos reversível, quase reversível e irreversível 20

Figura 8. Escala proposta por Brookman para a classificação de minas de grafite quanto à dureza 23

Figura 9. Representação do mecanismo direto de transferência de elétrons 30

Figura 10. Representação do mecanismo mediado de transferência de elétrons 31

Figura 11. Esquema do eletrodo de grafite sólido comercial 33

Figura 12. Célula eletroquímica de três eletrodos 36

Figura 13. Efeito do posicionamento da garra e área superficial do bastão 40

Figura 14. Efeito da redução do comprimento do bastão de grafite 41

Figura 15. Efeito do polimento do eletrodo de bastão grafite 42

Figura 16. Influência das soluções tampão fosfato, peróxido de hidrogênio e fenol 44

Figura 17. Comparação de voltamogramas 45

Figura 18. Imobilização de HRP em dois eletrodos de grafite HB 2.0 mm comercial de mesma procedência 47

Figura 19. Efeito da concentração de fenol em dois eletrodos de carbono diferentes 49

Figura 20. Regressão linear das curvas corrente x concentração de fenol 50

Figura 21. Efeito da concentração de fenol sob a condição do ciclo de -0,050 V à +0,050 V e 50 mV/s 51

Figura 22. Regressão linear das curvas corrente x concentração de fenol 51

1 **INTRODUÇÃO**

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O amplo uso e geração de fenol e seus derivados na indústria é uma realidade. Os clorofenóis, por exemplo, são gerados por diversas fontes, entre elas a indústria de papel, onde durante o processo de branqueamento com cloro, estes compostos são formados como resultado da reação com ligninas presentes na polpa. São intermediários de síntese de herbicidas, e como preservantes de madeira como o pentaclorofenol. Os derivados do fenol butil-hidroxi-anisol (BHA) e butil-hidroxi-tolueno (BHT) têm vasto uso na indústria de alimentos.

Quanto às características do fenol, a sua elevada solubilidade em água, aliada à sua alta reatividade, torna o lançamento destes compostos em corpos d'água receptores um sério problema ambiental (BIELICKA-DASZKIEWICZ et al, 2004). Embora sendo biodegradável tanto por via aeróbia como anaeróbia, o fenol é tóxico para a maioria dos microrganismos, principalmente não aclimatados, em concentração de apenas 10 mg/L, podendo ser inibidor do crescimento mesmo para as espécies que o utilizam como substrato, causando problemas em estações de tratamento de efluentes.

A resolução CONAMA nº 357, publicada em 18 de março de 2005, define como padrão de lançamento para efluentes industriais o teor de 0,5 mg/L de fenóis totais, valor considerado baixo frente às concentrações geradas pelas indústrias (PASSOS et al, 2009). Os poucos exemplos supracitados, dentro de um grande universo de uso dos derivados fenólicos, representam as implicações ambientais e biológicas associadas ao fenol, intimamente relacionadas com sua concentração no ambiente. Esta realidade gera um maior rigor nos descartes e no armazenamento de efluentes e mobiliza estudos e pesquisas na determinação do fenol e seus derivados.

Dentro deste contexto, uma metodologia de análise capaz de fornecer seletividade, baixo custo e facilidade na construção, seja miniaturizável, de resposta rápida, potencial de automação e que possa ser usada na construção de equipamentos simples e portáteis, surge como um alvo potencial de linhas de estudo (ROSATTO et al, 2001). Os biossensores

atendem aos requisitos citados, uma vez que podem ser definidos como sensores que combinam a alta seletividade de um elemento biológico sensível ao analito de interesse, ligado a um transdutor que converte o sinal biológico em sinal elétrico proporcional à concentração do analito (OLIVEIRA et al, 2006).

Os eletrodos normalmente utilizados nas análises devem apresentar características eletroquímicas apropriadas e também serem adequados para o método de imobilização a ser utilizado. Entre os materiais convencionais podemos citar ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono e pasta carbono. (PEREIRA et al, 2002).

A possibilidade de utilizar os eletrodos de grafite sólido e de pasta de carbono modificados com HRP para a determinação de fenóis e compostos relacionados, foi demonstrada por Ruzgas e colaboradores (1995, p. 245). Os autores observaram que o fenol e seus derivados oxidados pela peroxidase na presença de peróxido podem ser eletroquimicamente reduzidos em eletrodos de grafite sólido e em pasta de carbono.

Peroxidases de diferentes origens para a construção dos eletrodos foram utilizadas para a detecção de compostos fenólicos: peroxidase de raiz forte (HRP), peroxidase de Arthromyces ramosus (ARP), peroxidase de soja (SBP), cloroperoxidase de fungo Caldariomyces (Ch1P), lactoperoxidase de leite de vaca (LP) e peroxidase de tabaco, Nicotiana sylvestris (TOP). Estes biossensores mostraram resposta em fluxo para vários compostos fenólicos, entretanto o perfil de seletividade varia significativamente entre as peroxidases de diferentes origens biológicas (LINDGREN et al, 1997).

A literatura descreve muitas aplicações para eletrodos de carbono sólido: determinação de ácidos tituláveis em vinagre, na determinação de ozônio, dopamina, cafeína, trepibutona, ácido úrico, em determinações simultâneas de nitrito, dopamina e serotonina, em cromatografia líquida para determinação de fenóis, na detecção de DNA do vírus da hepatite B, entre outras (KOTANI et al, 2003; AOKI et al, 1990; GAO et al, 2005; MIYAZAKI et al, 1999; ARIKSOYSAL et al, 2005).

Apesar da quantidade de trabalhos usando bastão de grafite sólido, poucos estudos relacionaram as características físicas do bastão com as suas propriedades eletroquímicas. A influência da dureza da mina de grafite sobre a resposta voltamétrica do bastão de carbono foi estudada por Tavares e Barbeira (2008, p. 827). Nestes estudos, foi observado que o aumento

da reprodutibilidade está associado com o aumento da dureza e a reversibilidade da voltametria cíclica relacionada com a rugosidade e dureza do bastão. Os estudos conduzidos por Wang e Kawde (2001, p. 832) na detecção da hibridização de DNA usaram os bastões de grafite com a classificação de dureza de B, F, HB, 4H e 6H para a transdução do evento de hibridização. Nestes estudos, diferenças consideráveis entre o sinal alvo e a resposta de fundo foram observadas com os melhores resultados encontrados para a dureza de 6H. Bond e colaboradores (1997, p. 67), desenvolveram um eletrodo de bastão de grafite reutilizável para análises voltamétricas com as durezas das minas HB, H e 3H da Pentel®. Embora os eletrodos apresentassem alta reprodutibilidade e sensibilidade, nenhuma informação sobre a influência da dureza na resposta foi mostrada.

Diante das carências de informações eletroquímicas em relação às características da mina de grafite, este trabalho buscou desenvolver um biossensor amperométrico para fenol utilizando como suporte um bastão de grafite adquirido no comércio com classificação de dureza HB e diâmetro de 2.0 mm.

2 **OBJETIVOS**

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral desenvolver um biossensor amperométrico para a detecção de fenol, utilizando um eletrodo de grafite construído a partir de mina de grafite 2.0 mm HB adquirida no comércio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

As etapas descritas abaixo foram desenvolvidas com a finalidade de se alcançar o objetivo geral desse trabalho, a saber:

a) Medida da atividade enzimática;
b) Quantificação de proteínas;
c) Testes de influência da área superficial do eletrodo de grafite e do posicionamento da garra condutora no eletrodo;
d) Testes de influência do comprimento do eletrodo de grafite e polimento da extremidade do eletrodo;
e) Testes de influência das soluções de fenol, peróxido e tampão;
f) Resposta da variação da concentração de fenol.

3 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

O ácido fênico, álcool fenílico ou fenol, como é normalmente conhecido, está entre os compostos de maior emprego na indústria. Dentre os principais usos do fenol podemos citar a fabricação de resinas fenólicas na indústria plástica, na indústria metalúrgica como agente de limpeza de ferro e aço, como solvente seletivo para refinação de óleos lubrificantes, reativo de sínteses orgânicas (ácido salicílico, fenolftaleína, ácido pícrico, anidridos orgânicos, benzeno, cloro-fenol, cicloexanol e diversas drogas farmacológicas). A figura 1 ilustra alguns dos derivados fenólicos.

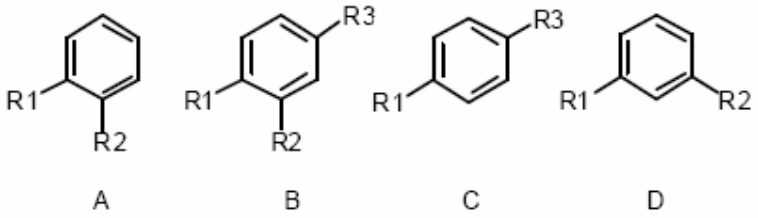


Figura 1. Representação de alguns derivados fenólicos. **A.** R1=R2= OH (catecol); **B.** R1= Cl, R2= CH_3, R3= OH (4-cloro-3-metilfenol); **C.** R1= OH, R3 = CH_3 (p-cresol); D. R1=R2= OH (resorcinol).

A recuperação de óleos lubrificantes, assunto muito discutido do ponto de vista ambiental, também inclui o fenol como um elemento de monitoramento do processo. Na etapa de desidratação do óleo lubrificante, que é a primeira etapa de recuperação, a água gerada pelo processo é conduzida para as Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) com uma carga elevada de fenóis e polifenóis. Quantificar de forma eficiente e *in situ* o fenol nas amostras de água oriundas da ETE, têm sido uma das buscas das pesquisas analíticas.

O fenol e seus derivados são preocupantes para o meio ambiente, pelos seus efeitos tóxicos e cumulativos. Muitos destes compostos possuem efeitos tóxicos em animais e plantas, pois penetram facilmente pela pele e membranas celulares, ocasionando diretamente efeitos genéticos deletérios, mutações, comprometimento hepático, além de afetarem as velocidades das reações biocatalisadas nos processos de respiração e fotossíntese (RUSSELL et al, 1999 e ORTEGA et al, 1994). Mesmo em pequenas concentrações (<1 ppm), os

compostos fenólicos afetam o gosto e o odor de águas potáveis e peixes (ORTEGA et al, 1994). Os nitro-fenóis e os cloro-fenóis são os agentes mais tóxicos. Os potenciais impactos ambientais do fenol são contornados pelos critérios estabelecidos pelos órgãos reguladores nacionais e internacionais.

A diretiva 80/778 EEC da comunidade Econômica Européia, por exemplo, determinou como concentração máxima permitida, para todos os tipos de fenóis em meio aquoso, o valor de 0,5 μg/L e 0,1 μg/L para fenóis individuais. No contexto brasileiro, a legislação federal estabelece um limite máximo diferenciado de fenóis totais em cada tipo de corpo d'água natural, limite este estabelecido pelo capítulo II da resolução CONAMA 357/05. Em relação às águas doces, a legislação permite uma concentração limite máxima de fenóis totais de 0,003mg/L, para corpos d'água de classe I e II, e 0,01mg/L, para aqueles de classe III. Em relação aos corpos de águas não-doces, o limite máximo de fenóis totais aceito é de 60μg/L (classes I e II de águas salinas) e 0,003mg/L (classes I e II para as águas salobras). Além disso, em relação ao descarte de efluentes em corpos hídricos, essa resolução impõe uma concentração máxima de 0,5mg/L de fenóis (CONAMA, 2005).

Atualmente, análises de fenol e compostos fenólicos têm sido conduzidos por meio de métodos espectrofotométricos e cromatográficos (cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa com ionização em chama ou acoplada com espectrometria de massa). A dificuldade em se trabalhar "*on site*", necessidade de mão-de-obra experiente, o custo, a rapidez, necessidade de preparo da amostra (como pré-concentrações, extrações e diluições) podendo ocasionar perda da mostra, são algumas das limitações dos métodos citados acima.

3.2 ENZIMAS

A maioria das enzimas são proteínas de elevado peso molecular com propriedades catalíticas específicas, presentes em todos os seres vivos. Possuem uma estrutura tridimensional complexa de uma ou várias cadeias polipeptídicas. As enzimas também podem ser constituídas por componentes não-peptídicos, como resíduos de carboidratos. As enzimas, como outros catalisadores, aceleram as reações promovendo o alcance do equilíbrio sem alterá-las, por meio da diminuição da energia de ativação. Além da sua função catalítica, as enzimas são caracterizadas por sua alta especificidade. A classificação de enzimas envolve uma divisão em seis grupos principais de acordo com o tipo de reações que elas catalisam: 1-óxido-redutases, 2-transferases, 3-hidrolases, 4-liases, 5-isomerases, 6-ligases

(GUILBAULT, 1976). As óxido-redutases, grupo de interesse neste trabalho, são subdivididas conforme o grupo prostético: flavina, quinona, heme ou cobre.

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

A reação de transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo precisa ser otimizada para a eficiente construção de biossensores amperométricos. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos na tentativa de obter uma transferência direta e eficiente entre o co-fator da enzima redox e o eletrodo em um baixo sobrepotencial , mas muitas vezes esta transferência é impedida por barreiras cinéticas e estéricas (HELLER, 1992).

3.2.1 **Peroxidases**

As Peroxidases representam uma classe de enzimas que catalisam a oxidação de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos na presença de peróxido de hidrogênio ou peróxidos orgânicos de cadeia pequena. As peroxidases de plantas (E.C. 1.11.1.7) têm atraído, consideravelmente, o interesse de pesquisadores, pelo envolvimento dessas enzimas em diversas reações biológicas, como: reações de oxidação, processos de diferenciação celular, crescimento, controle de funções metabólicas e resistência a patógenos (GORTON et al, 1992). As peroxidases também estão envolvidas na polimerização de fenil propanóides, que iniciam a síntese de lignina, flavonóides e outros compostos fenólicos, alguns com atividade antioxidante, como os flavonóides, podem prevenir o envelhecimento celular (HULANICKI et al, 1991). Muitas peroxidases são hemeproteínas, ou seja, apresentam um grupo prostético heme no seu sítio ativo. O grupo protoporfirínico está representado na figura 2.

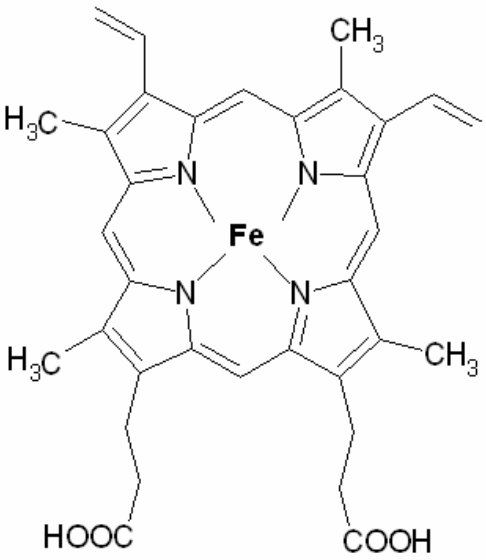


Figura 2. Sítio catalítico de uma peroxidase – grupo protoporfirínico.

3.2.1.1 *Peroxidase de raiz forte*

A peroxidase de raiz forte, ou raiz de rábano silvestre ("horseradish root" - HRP), extraída da *Amoracia rusticana*, é a mais usada em química analítica por ser estável por longos períodos de tempo à temperatura ambiente e em um amplo intervalo de pH, além de ser relativamente barata e disponível comercialmente em diferentes graus de pureza. No anexo A pode-se observar a parte aérea da *A. rusticana* na figura 1, e a raiz da mesma na figura 2.

A HRP é uma glicohemeproteína e consiste de 308 resíduos de aminoácidos, dois Ca^{2+}, e uma porção ferriprotoporfirina IX (heme), não covalentemente ligada à cadeia polipeptídica que forma o sítio ativo da enzima. O íon férrico central da referida protoporfirina está coordenado a um resíduo de histidina. O conteúdo de carboidrato é aproximadamente 18% da massa molar total , 42-45Kd da HRP (RUZGAS et al, 1996). A figura 3 ilustra a representação tridimensional da HRP.

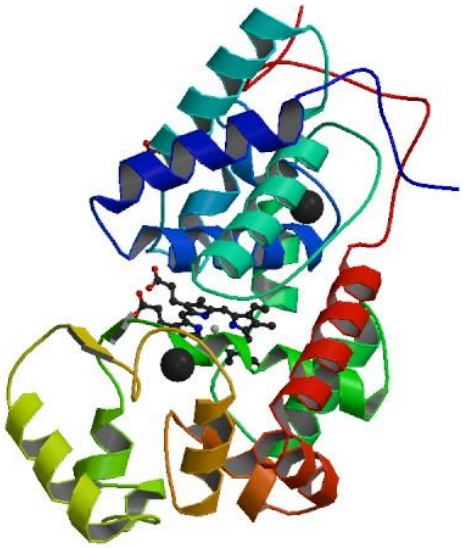


Figura 3. Representação 3D da peroxidase HRP. Na região central da molécula é possível observar a estrutura protoporfirínica e nas porções inferiores e superiores os dois cátions Ca^{2+} - esferas escuras (RCSB).

3.2.1.2 *Ciclo catalítico das peroxidases*

A primeira etapa que ocorre no ciclo catalítico das peroxidases é a clivagem do peróxido de hidrogênio (agente oxidante) catalisada pela HRP. Um dos oxigênios do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) deixa a molécula em forma de água enquanto o outro fica retido no grupo heme da enzima, o qual contém Fe^{3+} que é oxidado pelo peróxido de hidrogênio ao composto I. Na presença de doadores fortes de elétrons o composto I é convertido em composto II . O composto II em mais uma etapa monoeletrônica com a participação do doador de elétrons, é convertido na forma nativa da enzima (NAVES, 2008). O excesso de H_2O_2 pode inibir o ciclo catalítico normal, pela formação de um composto de

forma inativa irreversível da enzima (ADAMS, 1997). O ciclo catalítico da enzima está representado na figura 4.

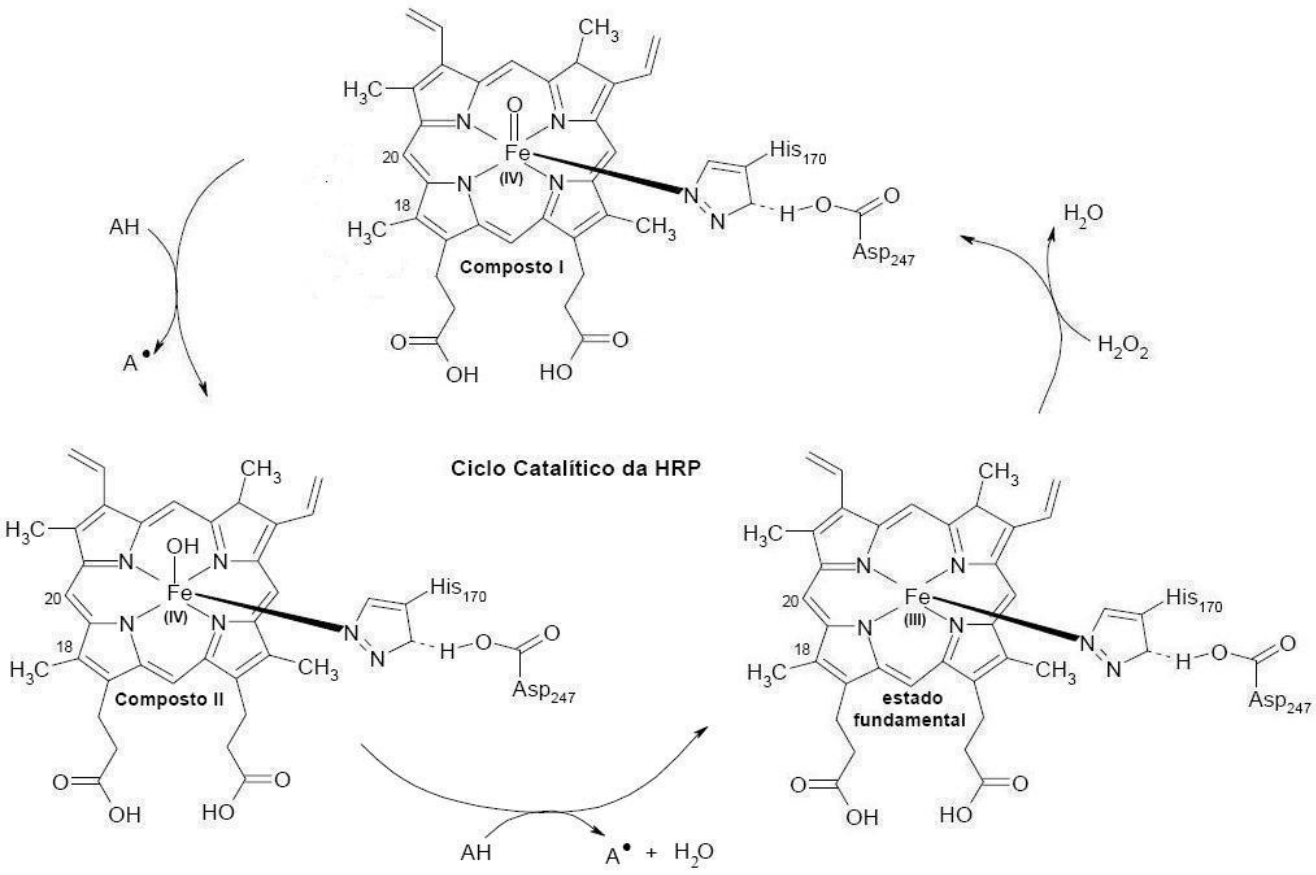


Figura 4. Ciclo catalítico da enzima peroxidase (HRP). No ciclo, observa-se a formação dos compostos I e II da oxidação da enzima, e retorno desta para seu estado fundamental (NAVES, 2008).

3.3 BIOSSENSORES

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo integrado receptor-transdutor que é capaz de gerar uma informação analítica seletiva quantitativa ou semi-quantitativa, usando um elemento biológico de reconhecimento. Um biossensor converte um evento biológico em um sinal detectável pela ação de um transdutor e um receptor. No receptor,

ocorre um evento físico-químico que produz uma energia que é transformada pelo transdutor em uma forma de energia quantificável. Um transdutor é um dispositivo capaz de transformar a energia contendo a informação química da amostra em um sinal analítico útil (CHAUBEY et al, 2002; FARRÉ et al, 2009).

Uma característica dos biossensores que os diferencia dos sensores químicos é a especificidade da análise. Segundo a IUPAC: "Um biossensor é um dispositivo que é capaz de fornecer informação analítica "específica", quantitativa ou semi-quantitativa usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) o qual está em contato espacial direto com um elemento de transdução" (THEVENOT et al, 1996). Um biossensor, assim, é formado de duas partes: o componente biológico e o transdutor. O componente biológico faz o reconhecimento da substância procurada por meio de uma reação química gerando um sinal que pode resultar de uma variação na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança de estado de oxidação, etc. O transdutor converte este sinal em uma resposta quantificável do tipo corrente, potencial, variação de temperatura, etc.

A especificidade de uma enzima, associada ao baixo custo, à alta sensibilidade e à seletividade de um detector eletroquímico, explicam as vantagens da detecção usando biossensores enzimáticos.

Dentre os três tipos de biossensores eletroquímicos, os condutométricos são usualmente não específicos e tem uma pobre razão sinal/ruído (DUFFY et al, 1988), por isso os princípios potenciométricos e principalmente o amperométrico têm sido os mais utilizados. O sensor amperométrico é mais rápido, mais sensível e preciso que o potenciométrico, pois não é necessário esperar que o equilíbrio termodinâmico seja obtido e a resposta é linear em uma faixa relativamente ampla de concentração do analito (CHAUBEY et al, 2002).

O componente biológico proporciona a seletividade do biossensor, que nada mais é do que a habilidade para discriminar um entre diferentes substratos. Esta é uma das características mais importantes de um biossensor.

3.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Na construção de um biossensor a imobilização do componente biológico é uma etapa crítica. O objetivo é conseguir um contato íntimo entre a enzima e o eletrodo, mantendo sua atividade, além de livre difusão de substratos e produtos para dentro e para fora da camada biocatalítica. As características enzimáticas de interesse, do ponto de vista analítico, são: possibilidade de reutilização com diminuição no custo de análise, uma maior estabilidade e menor interferência de compostos indesejáveis (GUILBAULT, 1976). Entretanto, o material suporte pode ter um efeito crítico sobre a estabilidade e a eficiência da imobilização da enzima. Os materiais suporte devem ser insolúveis em água, ter uma alta capacidade para ligar à enzima, ser quimicamente inerte e mecanicamente estável.

As enzimas podem ser imobilizadas sobre o transdutor ou matrizes suportes por métodos físicos e químicos. Os métodos físicos, como a oclusão e a adsorção, podem ser aplicados a muitas enzimas e as características estruturais e funcionais sofrem poucas alterações. Os métodos químicos como a ligação covalente e cruzada, por outro lado, proporcionam ao biossensor uma melhor estabilidade na operação (SCOUTEN et al, 1995).

Outros parâmetros além da enzima podem influenciar na estabilidade operacional. A estabilidade do suporte, o procedimento de imobilização e o tipo de amostra são parâmetros reconhecidamente importantes neste processo. As características de cada enzima também serão fundamentais para a escolha do procedimento de imobilização. O tipo de ligação, o material suporte, e o método de imobilização podem ter efeitos determinantes sobre a constante de ligação do substrato e velocidade máxima da reação, e também sobre o pH ótimo e sensibilidade frente à variação da força iônica.

Limitações dos métodos individuais de imobilização são solucionadas ou minimizadas por meio de combinações das técnicas de imobilização. No caso de biossensores a base de peroxidase, a enzima pode ser adsorvida sobre grafite em pó, submetido a um pré-tratamento térmico, antes da adição do aglutinante. Nesta situação ocorre adsorção e oclusão na pasta de carbono. Pelas etapas citadas, não é possível garantir a estabilidade do biossensor, uma vez que a oclusão ocorreu em uma mistura e não em uma matriz polimérica, o que seria mais recomendável. A estabilidade pode ser melhorada misturando a grafite em pó com carbodiimida, que facilita a formação de ligações covalentes aos grupos hidroxilas ou

carboxilas sobre a superfície da grafite, podendo ainda adicionar glutaraldeído para formação de ligação cruzada (OLIVEIRA NETO et al, 1988).

Serão mostrados detalhes de alguns métodos utilizados na imobilização de enzimas.

3.4.1 **Adsorção**

O método é baseado em colocar a solução da enzima em contato com uma superfície adsorvente, permitir adsorver e depois lavar para remover a enzima não adsorvida. Trata-se do procedimento mais simples de imobilização. As enzimas podem ser adsorvidas diretamente sobre o material de eletrodo ou sobre suportes orgânicos ou inorgânicos tais como: alumina, carvão, argila, celulose, sílica, gel, vidro e colágeno (ELKAOUTIT et al, 2008). A adsorção de enzimas pode ser atribuída a um mecanismo de troca iônica, a uma simples adsorção física usualmente fraca, ocorrendo via formação de ligações de Van Der Waals, como as ligações de hidrogênio, ou adsorção química envolvendo ligações covalentes (ALFAYA et al., 2002). A adsorção de uma enzima sobre um material insolúvel em água depende de algumas variáveis experimentais tais como: pH, natureza do solvente, força iônica, concentração de enzima e adsorvente, e temperatura. É extremamente importante conhecer e controlar esses fatores para conseguir imobilizar a enzima e mantê-la adsorvida com atividade.

A simples adsorção da enzima a uma superfície de eletrodo leva a uma baixa estabilidade operacional do biossensor, geralmente. Entretanto, tem sido demonstrado que a ligação cruzada com glutaraldeído aumenta a estabilidade do eletrodo enzimático (POLÁSEK et al, 1991). Outra possibilidade é adicionar uma barreira tal como uma membrana ou filme para prevenir a perda da enzima adsorvida quando o biossensor é colocado em uma solução aquosa.

3.4.2 **Microencapsulação**

Neste método uma membrana inerte é usada para prender a enzima sobre o transdutor. Desta forma, a solução original contendo a enzima é inteiramente imobilizada, criando células artificiais que tem uma membrana similar às células naturais para controlar o tamanho das moléculas que podem difundir para dentro e para fora da membrana (CUNNINGGHAM et al., 1998; ALFAYA et al., 2002). Os principais tipos de membranas usadas são: acetato de celulose, policarbonato, colágeno, Teflon® e Nafion®. A microencapsulação foi o método usado na construção dos primeiros biossensores (KLEI et al, 1985).

3.4.3 **Oclusão em gel**

O processo de oclusão consiste em misturar uma enzima em solução com um monômero que é então polimerizado em gel, fixando a enzima. Estas podem ser ocluídas em poliacrilamida, alginato de cálcio, Agar, agarose. Problemas estão relacionados à esta técnica: falta de rigidez, tamanho de poros irregular do gel e limitações difusionais para substratos e produtos (CASS et al., 1998).

Filmes poliméricos preparados eletroquimicamente, também são técnicas para reter fisicamente enzimas sobre a superfície do eletrodo. Estes filmes são obtidos por meio de polimerização eletroquímica de compostos orgânicos aromáticos tais como pirrol, tiofeno, fenilenodiimina, fenol, etc. A imobilização em tais membranas é realizada por deposição de um filme polimérico sobre a superfície do eletrodo sobre a qual a enzima tenha sido previamente imobilizada por adsorção ou ligação cruzada , ou por oclusão da enzima como um contra-íon a partir de uma solução de enzima e monômero (ROSATTO, 2000; ALFAYA et al., 2002).

3.4.4 **Ligação covalente cruzada**

O método consiste na formação de partículas macroscópicas (ou rede poliméricas) em decorrência da formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzima e/ou moléculas do suporte com reagentes funcionais (FILHO et al, 1992). Esse método mantém a enzima num ambiente semelhante ao qual ela se encontra na natureza, e devido a isto, possui maior estabilidade frente aos efeitos de pH, força iônica, solventes e temperatura. Reagentes bi ou multifuncionais (glutaraldeído, 2-isocianato-4-isotiocianato tolueno, hexametil-diisocianato, etc) são usados neste método tanto para a imobilização como para a estabilização de enzimas imobilizadas por adsorção ou oclusão (CASS et al., 1998; ALFAYA et al., 2002). A ligação covalente cruzada também possui incovenientes como limitações difusionais, provocada pela falta de rigidez e danos à enzima. A complexidade de reações possíveis de ocorrer pode ser o fator principal para um problema freqüente na imobilização com glutaraldeído, por exemplo, que é a difícil reprodutibilidade. Apesar desses riscos, é um método relativamente simples e muito utilizado para estabilizar enzimas adsorvidas e em combinação com outros métodos (OLIVEIRA NETO et al, 1988).

3.4.5 **Ligação covalente**

Este método envolve a formação de ligação covalente entre grupos funcionais da enzima e o suporte (ALFAYA et al., 2002). É importante que os aminoácidos essenciais para a atividade catalítica da enzima não sejam envolvidos na ligação covalente ao suporte. Como esta situação é difícil de se obter, a perda da atividade enzimática pode ocorrer. Este problema pode ser prevenido se a enzima for imobilizada na presença do seu substrato como forma de proteção do sítio ativo da enzima. Antes da ligação covalente da enzima ao suporte, este deve ser ativado. Depois de ativado, o suporte pode então reagir com grupos particulares da enzima. Um exemplo desta técnica é a ligação covalente de uma enzima a um suporte via uma carbodiimida. O grupo carboxílico sobre o suporte reage com a molécula de

carbodiimida, este então acopla com o grupo amina sobre o biomaterial para formar uma ligação amida entre o suporte e a enzima (CHIBATA, 1978).

Saber qual o método adequado de imobilização é muito importante uma vez que este procedimento influi em muitas das características desejáveis para os biossensores. Segue na figura 5 a representação das principais técnicas de imobilização, componentes na construção do biosensor e sua configuração. As setas direcionam os parâmetros utilizados neste trabalho.

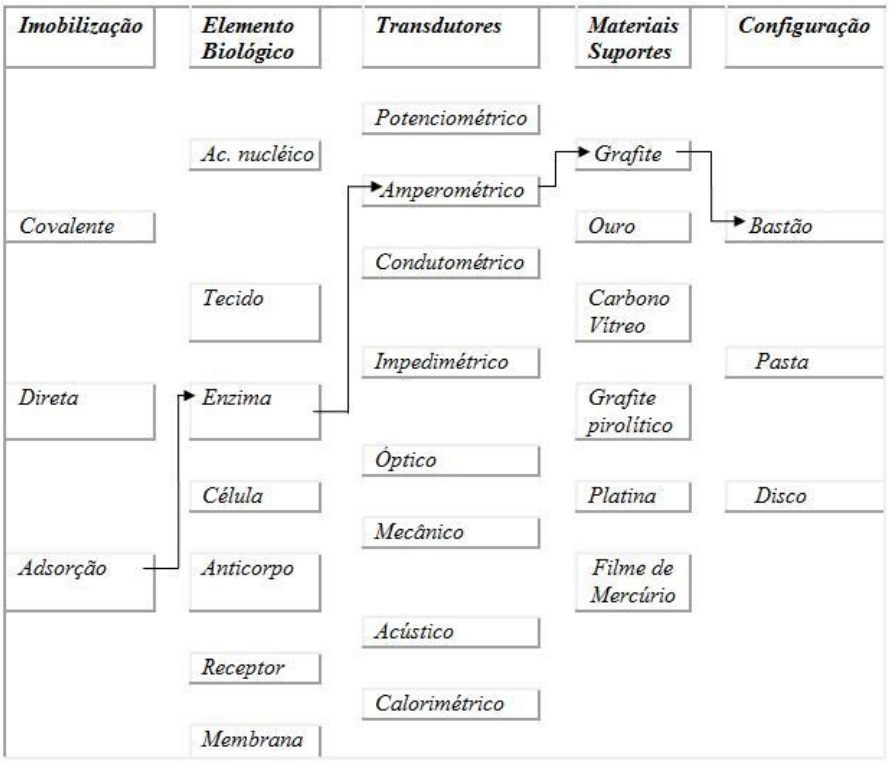


Figura 5. Representação das principais imobilizações, elementos biológicos utilizados, transdutores, materiais suportes e configurações.

3.5 VOLTAMETRIA CÍCLICA

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, feitas durante a eletrólise dessa espécie em uma cela eletroquímica convencional

composta por um sistema de três eletrodos: um eletrodo de trabalho, um de referência e um auxiliar ou contra-eletrodo (BOLLO et al, 2007). O eletrodo de trabalho é onde ocorre a reação de interesse e pode ser composto de diferentes materiais, tais como carbono, ouro, prata, cobre, platina, níquel, paládio, etc. O eletrodo de referência permite o monitoramento do potencial do eletrodo de trabalho e é usualmente utilizado o eletrodo saturado de calomelano (SCE) e o Ag/AgCl. O eletrodo auxiliar atua no controle da corrente necessária para sustentar a eletrólise que ocorre no eletrodo de trabalho. Nesta situação, a corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, evitando que ocorram distúrbios (como eletrólise, por exemplo) no eletrodo de referência. Neste dispositivo, o eletrodo de referência realizará o seu papel sem interferências, que é o de manter o seu potencial constante durante as medidas. Por isto pode-se usar além do eletrodo de trabalho e do auxiliar, um eletrodo de referência de dimensões pequenas, o que facilita o uso de recipientes voltamétricos de tamanho reduzido.

A voltametria cíclica mostra-se particularmente eficiente quando se deseja conhecer a eletroatividade de compostos (especialmente moléculas biológicas), investigar reações químicas acopladas, análise de íons e estudar superfícies de eletrodos (BRUSCIOTTI et al, 2007; MAESTRE et al, 1994). A técnica também fornece informações a respeito da reversibilidade de um sistema. A reversibilidade eletroquímica está associada à troca rápida de elétrons entre as espécies redox e o eletrodo (WANG, 2000).

No perfil voltamétrico corrente-potencial, os processos de oxidação e de redução ocorrendo no eletrodo de trabalho são representados por correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}). Os altos sinais apresentados pelos picos de corrente podem representar uma maior sensibilidade e reprodutibilidade da célula eletroquímica. Outros parâmetros importantes considerados em voltametria cíclica são os potenciais de pico anódico (E_{pa}), catódico (E_{pc}), a velocidade de varredura do potencial (ν), potencial de meia onda ($E_{1/2}$), potencial de inversão (E_{λ}). Uma curva característica de voltametria cíclica (voltamograma) com seus principais parâmetros pode ser observada na figura 6.

A dependência do potencial e da corrente com a variação da velocidade de varredura, com a concentração da substância eletroativa e a partir da adição de eletrófilos, nucleófilos ou prótons, permite obter informações importantes como reversibilidade e irreversibilidade do processo de transferência eletrônica, a presença de reações químicas acopladas, adsorção e fenômenos catalíticos, além de se poder caracterizar o fenômeno que controla a corrente de pico (SUTHERLAND, 1996).

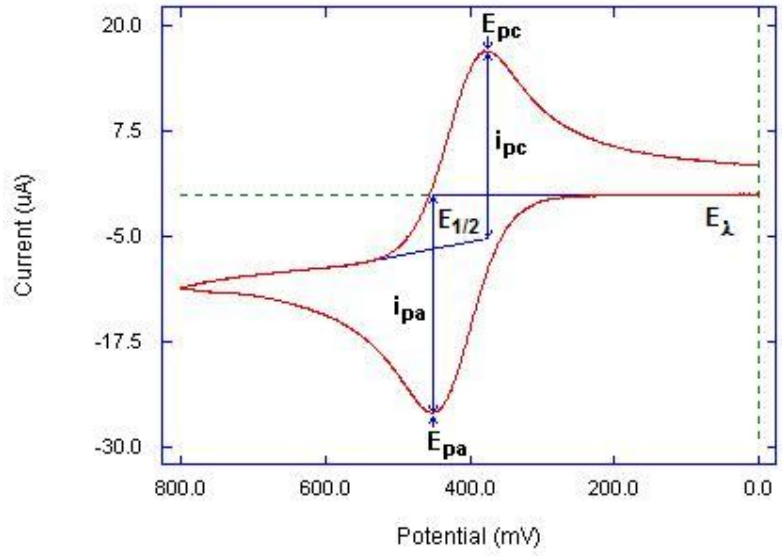


Figura 6. Representação de voltametria cíclica típica, com os seus principais parâmetros (PGSTAT 12, AUTOLAB®).

Equações matemáticas que correlacionam os componentes do voltamograma (E_{pc}, E_{pa}, I_{pa}, I_{pc}) podem descrever a voltametria cíclica de espécies não adsorvidas. As respostas podem ser classificadas como reversíveis, irreversíveis ou quase-reversíveis (DIAO et al, 1996).

O pico de corrente para processos reversíveis à 25°C, é dado pela equação de Randles-Sevcik:

$$I_p = (2.69 \times 10^5)\, n^{3/2}\, ACD^{1/2}\, v^{1/2}$$

Onde n é o número de elétrons, A é a área do eletrodo (em cm^2), C é a concentração (em mol/cm^3), D é o coeficiente de difusão (em cm^2/s), e v é a velocidade de varredura (em V/s). De acordo com a equação, a corrente é diretamente proporcional a concentração e aumenta com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

Teoricamente, em um processo reversível, o potencial formal de redução ou oxidação ($E^{o'}$) é centrado entre os potenciais E_{pc} e E_{pa}, sendo definido como potencial $E_{1/2}$ como descrito pela equação EQ.1:

$$E^{o'} = E_{1/2} = \frac{E_{pc} + E_{pa}}{2} \quad \text{(EQ.1)}$$

Ainda para processos reversíveis, três outras importantes características podem ser destacadas:

a) a separação entre os picos E_{pc} e E_{pa} . Em um sistema reversível a separação dos potenciais é dada pela expressão EQ.2:

$$\Delta E_p = \frac{E_{pc} - E_{pa}}{n} \cong \frac{0{,}059}{n} \quad \text{(EQ.2)}$$

Onde n é o número de elétrons transferidos.

Dessa forma, para um processo em que há transferência de um elétron, como por exemplo na oxidação do ferroceno, ΔE_p deverá ser aproximadamente 59 mV;

b) a relação entre I_{pc} e I_{pa} deve ser, aproximadamente, igual a 1, conforme a equação EQ.3;

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} \cong 1 \quad \text{(EQ.3)}$$

c) a correlação entre I_p e a velocidade de varredura do potencial. A corrente de pico deve ser diretamente proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura do potencial. O gráfico I_p *vs.* $\nu^{1/2}$ deve ser linear, de acordo com a equação de Randles-Sevcik.

Para um processo irreversível, não se observa simetria entre os potenciais E_{pc} e E_{pa} e em geral, os processos de oxi-redução são acompanhados da decomposição das espécies

eletrogeradas. Experimentalmente, a diferença de potencial (ΔEp) é muito maior que 59 mV e a relação I_{pa} / I_{pc} não respeita a unidade.

É comum um sistema ser reversível em baixas velocidades de varredura e irreversível ao se aumentar a velocidade. Nestes casos, o processo é denominado quase-reversível, e apresenta as seguintes características:

a) ΔE_p maior que 59 mV, aumentando gradativamente com o aumento da velocidade de varredura.
b) a corrente I_p aumenta com a raiz quadrada da velocidade, mas não de forma proporcional.
c) Ep_c desloca-se negativamente com o aumento da velocidade de varredura.

A figura 7 ilustra os diferentes processos de voltametria cíclica comentados nesta seção (FISHER, 1996).

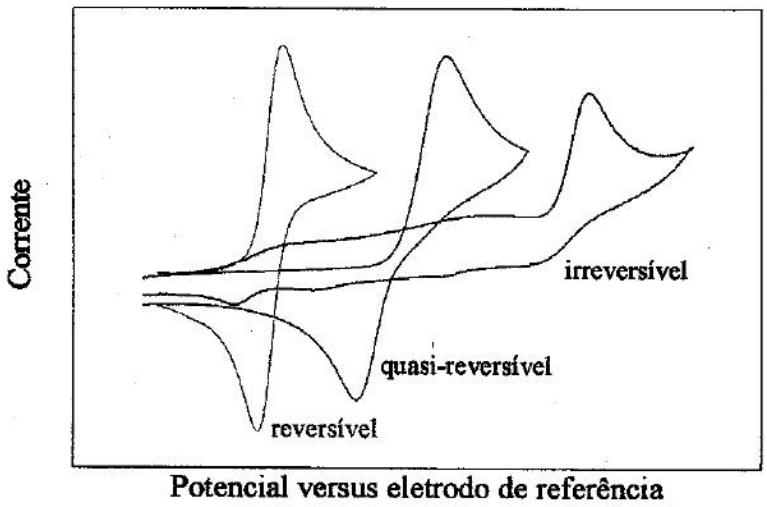


Figura 7. Voltametria cíclica de eventos reversível, quase reversível e irreversível (FISHER, 1996).

3.6 BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS

A detecção de glicose usando a enzima glicose oxidase acoplada a um eletrodo para oxigênio de Clark foi o primeiro biossensor amperométrico, desenvolvido por Updike e Hicks

em 1967 (HABERMÜLLER et al, 2000). Desde então, enzimas têm sido usadas em conjunto com diferentes materiais de eletrodo para produzir biossensores amperométricos. Tanto a formação do produto quanto o consumo de reagente podem ser usados como uma medida da concentração do substrato (analito). O acoplamento eletrônico entre as enzimas e o eletrodo nos biossensores pode ser realizado através de diferentes mecanismos: (i) pela eletroatividade do substrato ou produto enzimático - biossensores de primeira geração; (ii) pelo auxílio de mediadores, livres em solução ou imobilizados juntamente com a enzima - biossensores de segunda geração - e, finalmente, (iii) pela transferência eletrônica direta entre a superfície do eletrodo e o centro ativo da enzima - biossensores de terceira geração. (FREIRE et al, 2003; LI et al, 1997).

Os biossensores baseados em transferência de elétrons direta, *biossensores de terceira geração* (FRASCONI et al, 2009), apresentam como principal vantagem a ausência de mediadores, o que proporciona uma seletividade superior pela possibilidade de operação em um potencial mais próximo do potencial redox da própria enzima, e estando assim menos sujeitos a reações interferentes e também pela ausência de outros reagentes na seqüência da reação. Entretanto, um aspecto que deve ser considerado em relação aos biossensores de terceira geração é que a transferência de elétrons depende da distância entre o centro redox e o eletrodo. Esta representa um fator crítico quando se trata de enzimas redox que geralmente são proteínas de alta massa molar na ordem de 50.000 g/mol, e tem um sítio ativo situado no interior da estrutura da proteína.

3.6.1 **Materiais utilizados na construção de biossensores amperométricos**

Na construção de biossensores amperométricos, materiais como o ouro, platina, grafite sólido, carbono vítreo, pasta de carbono, etc. podem ser usados. Características atrativas do carbono tais como versatilidade, baixo custo, corrente residual e resistência elétrica baixas, e uma ampla faixa de potencial anódico, são determinantes para a definição deste material como objeto de estudo (GILMARTIN et al, 1995). A morfologia diversificada do carbono é observada nas várias formas apropriadas para aplicações eletroquímicas, como compósitos, fibras de carbono, pasta de carbono e filmes de carbono.

3.6.1.1 *Eletrodo de Pasta de grafite*

Pasta de grafite é uma mistura de grafite em pó e um líquido orgânico que é imiscível em contato com soluções aquosas. A superfície dos eletrodos de pasta de grafite é muito complexa com muitas possibilidades de interações. O líquido orgânico, aglutinante, serve para manter uma forma firme do eletrodo, preencher as cavidades entre as partículas de grafite e "isolar" a grafite do contato com soluções aquosas (MIYAZAKI et al, 1999). Os eletrodos preparados à base de pasta de grafite oferecem baixa corrente de fundo, baixo ruído e facilidade de renovação da superfície. Além disso, é possível realizar modificações no "bulk" do material de eletrodo, como a co-imobilização de enzimas, co-fatores, mediadores e estabilizadores. A falta de estabilidade estrutural do "bulk", especialmente quando ele é empregado por um longo período de tempo ou na presença de solventes orgânicos na solução, e a falta de reprodutibilidade, são pontos que desfavorecem a escolha da pasta de grafite como modelo de estudo.

3.6.1.2 *Eletrodo de pasta de carbono modificados com sílica*

A sílica gel apresenta um grande potencial de aplicação eletroquímica (SHANGGUAN et al, 2009). Algumas propriedades deste material tais como capacidade de adsorção, química ácido-base, estabilidade térmica, podem ser vantajosamente exploradas, por exemplo, no acúmulo de espécies eletroativas antes da sua detecção eletroquímica. Além disso, a sílica pode ser enxertada com uma variedade de grupos funcionais levando a um considerável enriquecimento de suas propriedades de superfície. A alta área superficial de sílicas sintéticas, quando combinada à sua química de superfície, torna esse material útil como suportes para vários catalisadores.

3.6.1.3 *Eletrodo de bastão de grafite*

Eletrodos de bastão de grafite, eletrodo de grafite de lápis (*pencil graphite electrode – PGE*) ou grafite de carbono forçado (*graphite reinforcement carbon – GRC*), eletrodo de grafite de carbono (*carbon graphite electrode – CGE*), são estruturas rígidas à base de carbono e aditivos com amplo emprego nas pesquisas voltamétricas. Os eletrodos são construídos com dispersão de grafite natural em misturas de ligantes orgânicos e óleo e posterior tratamento térmico. Ao invés de argila, as minas contém uma macromolécula natural orgânica, tal como a celulose. Durante a queima da mina em atmosfera livre de oxigênio (carbonização), a celulose é transformada em carbono. O resultado não cerâmico é uma ligação resistente e elástica.

Desde que os bastões de grafite se tornaram viáveis para o emprego como minas de lapiseira – *mechanical pencil* – na década de 70, os finos poros têm sido preenchidos com óleo mineral por razões da escrita. O óleo, entretanto, é útil na redução da corrente de base quando o bastão GRC é utilizado em determinações voltamétricas em meio aquoso (MIYAZAKI et al, 1999). Os primeiros estudos utilizando mina de grafite, conduzidos por Aoki e colaboradores (1989, p. 323) avaliaram a resposta voltamétrica em soluções de ácido sulfúrico, cloreto de potássio e hidróxido de sódio para os pares $[Ru(NH_3)_6]^{2+/3+}$ e $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$. A literatura descreve muitas aplicações dos eletrodos PGE: para a determinação de ácidos tituláveis em vinagre, determinação de ozônio, nos estudos de hibridização do DNA, determinação de dopamina, cafeína, ácido úrico, dentre outros (WANG et al, 2001; VESTERGAARD et al, 2005) .

Com relação a imobilização enzimática, a adsorção desta no corpo do grafite é explicada pelas interações eletrostáticas existentes. Estas interações poderiam estar envolvidas com a adsorção preferencial da HRP em domínios hidrofílicos, arestas planas, ricas na funcionalidade C-O, existentes na superfície do grafite (POPESCU et al, 1995).

3.6.1.3.1 Características físicas

A dureza do bastão grafite é graduada em 20 níveis, que vai de 9H, o mais rígido, à 9B, o mais frágil (PETROSKI, 1990). Na figura 8 está esquematizada a classificação do grafite sólido.

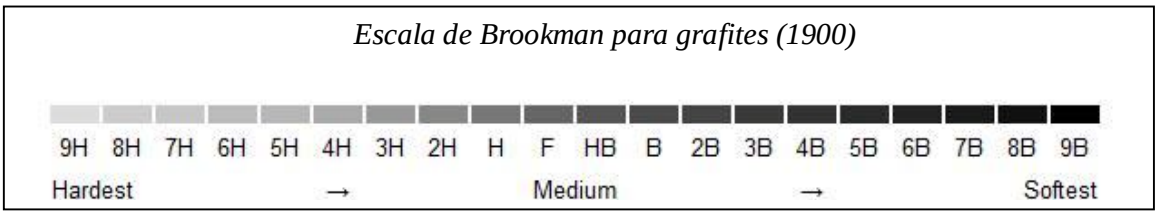


Figura 8. Escala proposta por Brookman para a classificação de minas de grafite quanto à dureza (PETROSKI, 1990).

O PGE não é tão frágil como o grafite pirolítico ou pasta de carbono e não é tão rígido como o carbono vítreo. A dureza e a intensidade de cor da mina, aspectos amplamente reconhecidos para este tipo de material, podem ser modificados pela alteração da temperatura do forno e das proporções de grafite e argila. Além disso, estudos mostram que eletrodos construídos com minas de grafite, apresentam maior nível de porosidade que o eletrodos de carbono vítreo (TAVARES et al, 2008; ERDEM et al, 2006). Nos eletrodos sólidos convencionais a modificação ocorre na superfície do eletrodo. Do ponto de vista da imobilização, a presença de grupos fenil oxidados na superfície da mina de grafite seriam importantes na atração eletrostática com o componente a ser imobilizado (JOHNSON et al, 2002). Outra característica marcante no PGE é a redução no tempo total de análise pelo *by-passing* das etapas de limpeza e pré-tratamento do eletrodo de trabalho, o que é essencial nos eletrodos de carbono vítreo. Várias dimensões, e origens de fabricações de bastão de grafite têm sido utilizados atualmente (OZSOZ et al, 2003; STOICA et al, 2006; ESKIOCAK et al, 2007; ARIKSOYSAL et al, 2008; ZAHIR et al, 1997; BOND et al, 1997; KARA et al, 2007; LINDGREN et al, 2000; HEJAZI et al, 2008; DOGAN-TOPAL et al, 2009; OZCAN et al, 2007; OZCAN et al, 2009; MAJIDI et al, 2009; MIRMOMTAZ et al, 2009; LEVENT et al, 2009; ZAKHARCHUK et al, 1995; MALINAUSKAS et al, 2000; MUNTEANU et al, 2005; LY et al, 2004; RAMANAVICIUS et al, 2006; POURNAGHI-AZAR et al, 2009;

MCLACHLAN et al, 1991). A tabela 1 ilustra alguns modelos e características usados em eletroquímica.

Tabela 1. Modelos de bastão de grafite usados nas pesquisas eletroquímicas.

Modelos	*Referências*	*Dureza*	*Imersão (mm)*	*Diâmetro (mm)*
Noki pencil 2000, Tombo ou Pentel HB	8	HB	0.37/8/10/12	0.5
Bastão espectroscópico type RW001, Ringsdorff Werke GmbH	3	-	-	3.05
Bastão espectroscópico type RW003 Ringsdorff Werke GmbH	1	-	-	3.0
Pilot	1	HB	-	0.5
PL-920 e PL-912	1	2B	-	0.7
Mechanical pencil leads Pentel Co. Ltd.	1	2H	-	0.5
Hi-polymer Super C505 Pentel Co. Ltd.	1	6H, HB, F, B e 4H	-	0.5
Pentel modelo P205 Pentel Co. Ltd.	1	6H	-	0.5
Contè Evolution Graphite CONTE	1	-	-	2.4
Modelo T0.5, Rotring Tombo	1	-	10	0.5
Modelo R505210N	1	H	-	2.0
Modelo Tikky II Tombo	1	-	13	-
Mars Lumographs 100 Staedtler	1	2B	-	-

Uma característica limitante no uso de materiais à base de carbono é a natureza absortiva do grafite. No caso de derivados do fenol como o 2,4-dimetilfenol, ocorre inclusive uma adsorção irreversível. Esta questão absortiva implica diretamente numa pobre estabilidade mecânica dos materiais carbonáceos (PUIG et al, 1996).

3.6.1.3.2 Características eletroquímicas

Do ponto de vista eletroquímico, os bastões de grafite são conhecidos por possuírem uma alta condutividade elétrica, baixa corrente de fundo, alto valor de corrente no pico, sensibilidade e reprodutibilidade aumentada e com ΔE_p próximo do valor teórico para sistemas reversíveis (DEMETRIADES et al, 2004 e TAVARES et al, 2008). Tavares e

colaboradores (2008) mostraram que a dureza relacionada com a quantidade de grafite e rugosidade afeta a resposta voltamétrica. Grafites rígidos apresentaram maior pico de corrente, provendo maior sensibilidade e reprodutibilidade. Além disso, o polimento do bastão de grafite –redução da rugosidade – contribuiu para a redução do ΔE_p em comparação com o bastão sem polimento. Estudos mostram também que quanto maior a composição de grafite no bastão, menor o valor da resistência ôhmica (CALIXTO et al, 2008).

3.6.2 **Biossensor amperométrico para fenol**

Uma oxidação eletroquímica direta pode ser usada na determinação amperométrica de fenóis. Entretanto, o alto sobrepotencial envolvido na análise torna o sistema de detecção acessível a reações interferentes, além de haver um aumento na corrente de fundo e nível de ruído. Reações paralelas com a formação de produtos poliméricos que passivam a superfície do eletrodo, também são conseqüências do alto potencial aplicado (ROSATTO, 2000).

O uso de biossensores amperométricos minimiza esta dificuldade na determinação de fenóis, uma vez que estes operam com um baixo potencial aplicado (CALVO et al, 1997). Mede-se a corrente gerada pela reação biocatalisada de oxidação ou redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo, que de um modo geral, ocorrem em potenciais ao redor de 0 mV *vs* ECS (Eletrodo de Calomelano Saturado). Neste potencial, a contribuição de espécies interferentes é reduzida. A tabela 2 ilustra alguns potenciais envolvidos na determinação amperométrica de fenol.

Tabela 2. Potenciais relevantes na análise do fenol.

Eventos	*Espécies*	*E/V vs ECS*
Oxidação direta de compostos fenólicos e substâncias interferentes	4-clorofenol	0,4 / 0,5
	Fenol	0,2 / 0,3
	hidroquinona	0 / 0,1
Intervalo ótimo de potencial	----------	0 / -0,2
Redução de O_2	----------	-0,2 / -0,5

Os materiais a base de carbono têm sido os mais utilizados, dentre os materiais de eletrodo que podem ser usados para a construção de biossensores amperométricos devido ao seu custo reduzido, fácil disponibilidade para aquisição e características eletroquímicas favoráveis. Alguns exemplos são o carbono vítreo, grafite pirolítico, pasta de carbono e compósitos (RAZUMAS et al, 1984).

As enzimas redox tirosinase, lacase e peroxidase são as mais utilizadas para a construção de biossensores amperométricos para fenóis. As moléculas de enzima na superfície do eletrodo são oxidadas pelo oxigênio (no caso da tirosinase e lacase) ou peróxido de hidrogênio (no caso da peroxidase), sendo em seguida reduzidas por compostos fenólicos. Durante esta última reação, os fenóis são basicamente convertidos em quinonas e/ou radicais livres, e esses produtos, usualmente eletroativos, podem ser reduzidos na superfície do eletrodo em potenciais próximos de 0 V VS ECS. A corrente de redução medida é proporcional à concentração do composto fenólico na solução.

O método de detecção dos fenóis baseado na redução dos produtos gerados pelas reações enzimáticas apresenta vantagens tais como: proteção do eletrodo contra o acúmulo de produtos poliméricos secundários sobre sua superfície (passivação), que usualmente são observados durante oxidação eletroquímica direta de fenóis; simplicidade de construção e manuseio; amplificação da resposta como uma conseqüência da redução de quinonas e/ou radicais fenoxi ao composto fenólico inicial, e o desempenho dos eletrodos se enquadra no intervalo de potenciais ótimo para medidas eletroquímicas. A detecção do consumo de O_2 ou H_2O_2 é outra possibilidade de se monitorar a concentração dos compostos fenólicos (ROSATTO et al, 2001).

Duas diferentes configurações principais de biossensores amperométricos têm sido utilizadas para a determinação de compostos fenólicos:

a) eletrodo de grafite sólido com a superfície modificada, onde a enzima é fisicamente adsorvida, covalentemente imobilizada ou retida com o auxílio de uma membrana;

b) eletrodo compósito com o material do eletrodo modificado, onde as partículas de grafite são modificadas com enzimas, por procedimentos semelhantes ao do eletrodo de grafite sólido, e em seguida misturada com óleos, resinas epóxi ou partículas de teflon. Entretanto, a maior parte das investigações sobre os mecanismos dos

biossensores enzimáticos foi realizada usando eletrodos de grafite sólido, devido a uma maior sensibilidade.

A resposta relativa dos eletrodos de grafite modificados, com diferentes enzimas, para vários compostos fenólicos foi apresentada por Rosatto (2000) onde se observa que os eletrodos modificados com tirosinase usualmente apresentam melhores resultados para a detecção de catecol, embora também possam ser empregados para a análise de monofenóis e outros difenóis. A co-imobilização de lacase e tirosinase aumenta a resposta relativa de alguns compostos quando comparada com estas enzimas separadas. Os eletrodos modificados com peroxidase possibilitam a determinação de um número maior de compostos fenólicos.

3.7 PEROXIDASE IMOBILIZADA EM ELETRODO

Quando a peroxidase é imobilizada sobre uma superfície de eletrodo, a forma oxidada da enzima, que é a formada na reação com peróxido, pode ser reduzida à sua forma ativa por uma transferência de elétrons diretamente do material de eletrodo ou por meio de mediadores redox. A peroxidase oxidada pode ser reduzida por elétrons fornecidos pelo eletrodo, segundo a reação da equação EQ.4.

$$HRP\text{-}I + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow HRP(Fe^{3+}) + H_2O \quad \text{(EQ.4)}$$

Este processo é conhecido como transferência de elétrons direta (TED).

Quando um doador de elétrons (AH) participa da reação de redução da enzima e posteriormente atua como aceptor de elétrons provenientes do eletrodo (EQ.5), a transferência de elétrons envolvida é a mediada (TEM). A presença do AH em um sistema peroxidase-eletrodo implica na ocorrência simultânea dos processos direto e mediado.

$$2\,{}^{\bullet}A + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow 2\,AH \quad \text{(EQ.5)}$$

A transferência mediada é usualmente mais eficiente quando comparada com a transferência direta de elétrons. A corrente de redução gerada pela TEM e TED é relacionada com a concentração de peróxido de hidrogênio. Vale destacar que uma alta concentração de peróxido no meio pode levar à formação de peroxidase inativa (NICELL et al, 1997; KONASH et al, 2005). A adição sucessiva de peróxido promove o aumento na resposta do pico catódico e redução na resposta do pico anódico (KONASH et al, 2005).

Os eletrodos modificados com peroxidase têm sido amplamente explorados e desenvolvidos para a determinação de peróxidos. Esta determinação envolve a combinação com oxidases que fornecem o peróxido de hidrogênio como produto de reação. Outros importantes analitos, tais como aminas aromáticas e compostos fenólicos, podem ser monitorados com esses biossensores sob condições especiais.

3.7.1 **Transferência de elétrons direta**

A redução eletroquímica direta da HRP foi primeiro observada por Varfolomeev e colaboradores (1996, p. 863) em eletrodos de carbono negro em potenciais menores que +1,20 V *vs.* eletrodo de hidrogênio. A imobilização de HRP em eletrodo de carbono reteve 50% da atividade inicial. A dependência linear da corrente, no eletrodo imobilizado com a HRP, com a concentração de peróxido ocorreu na faixa de 0,5 – 800 μM (YAROPOLOV et al, 2005; GHINDILIS et al, 1997). As enzimas redox contém em sua maioria grupos heme e metalocentros. Heme é uma molécula que forma vários estados reduzidos e oxidados e suas propriedades catalíticas mudam expressivamente quando em meio protéicos, o que é muito favorável para aplicações bioeletrolíticas de heme-enzimas e heme-proteínas. Entretanto, a presença de polipeptídeos em torno do sítio ativo heme, aumenta a distância para a transferência de elétrons. O posicionamento dos sítios ativos nas enzimas (no centro da proteína, ou não) também podem influenciar na eficiência da transferência de elétrons. O mecanismo direto de transferência de elétrons do eletrodo, que traz a enzima para sua forma ativa, está representado esquematicamente na figura 9.

Eletrodos a base de carbono são frequentemente usados para a construção de eletrodos modificados com peroxidase por fornecerem correntes mais altas (LU et al, 2005). A redução bioeletrocatalítica de H_2O_2 é mais eficiente em eletrodos com funcionalidades de superfície

ricas em oxigênio como, por exemplo, grafite pré-oxidada eletroquimicamente, grafite submetido a tratamento térmico e carbono ativado.

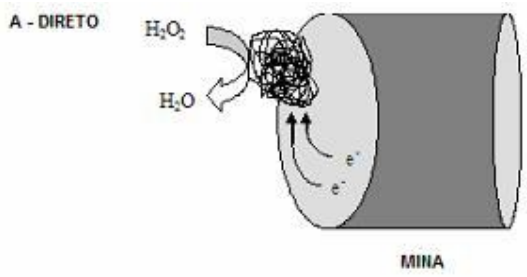


Figura 9. Representação do mecanismo direto de transferência de elétrons.

Os grupos fenólicos e quinonas presentes na superfície da grafite parecem facilitar a transferência de elétrons entre esse material e as peroxidases.

A corrente produzida pela transferência de elétrons direta entre a enzima e o eletrodo é limitante para a sensibilidade dos biossensores à base de peroxidase para a detecção de fenol. Com isso, busca-se uma diminuição na transferência direta para aumentar a sensibilidade do biossensor (MUNTEANU et al, 1998).

3.7.2 **Transferência de elétrons mediada**

A mediação da transferência de elétrons resolve a lenta transferência de elétrons que ocorre no processo direto. Os mediadores, que são pequenas moléculas redox com uma alta velocidade de transferência de elétrons, distribuem os elétrons da superfície do eletrodo para os compostos HRP-I e HRP-II (RUZGAS et al, 1995). O mecanismo mediado de transferência de elétrons do eletrodo que traz a enzima para sua forma ativa está representado esquematicamente na figura 10.

O mediador escolhido tem que reagir rapidamente com a peroxidase oxidada para alcançar o objetivo esperado. Mediadores de um ou dois elétrons podem ser usados. Os

mediadores de um elétron usados para a redução bioeletrolítica de peróxidos com eletrodos modificados por peroxidase são ferrocenos, hexacianoferrato (II), entre outros.

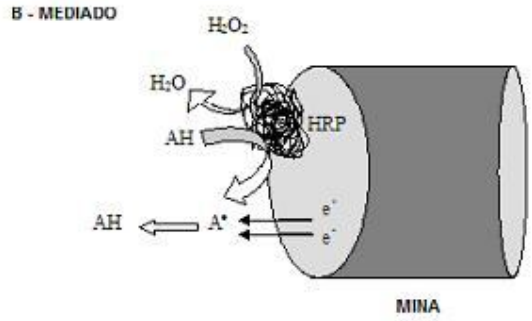


Figura 10. Representação do mecanismo mediado de transferência de elétrons.

Nestes casos, os prótons necessários para reação da peroxidase são consumidos da solução similarmente como ocorre com a transferência de elétrons direta. Os mediadores de dois elétrons não requerem prótons adicionais para o ciclo de reação da peroxidase. Para a HRP pode-se usar como mediadores de elétrons: fenóis, aminas aromáticas, ácido ascórbico, hexacianoferrato(II), iodeto, entre outros.

A determinação de compostos fenólicos por análises em fluxo (FIA) com eletrodos modificados com HRP, tem demonstrado que uma fonte contínua de H_2O_2 resulta em uma corrente de estado-estacionário devido à redução eletroquímica direta da peroxidase. Quando um composto fenólico é injetado, um pequeno pico aparece sobre o topo da corrente de "fundo", caracterizando a redução mediada da peroxidase. Esse resultado sugere que uma fração de moléculas de HRP está adsorvida ou ligada de uma forma que gera uma transferência de elétrons direta efetiva, enquanto que outras moléculas HRP estão mais distantes ou orientadas de modo que as tornem disponíveis apenas para a transferência de elétrons mediada (MUNTEANU et al, 1998; LINDGREN et al, 1997; RUZGAS et al, 1995 e ROSATTO et al, 1999).

4 **MATERIAL E MÉTODOS**

4.1 EQUIPAMENTOS

Nos estudos conduzidos neste trabalho, foram utilizados os seguintes equipamentos: agitador modelo AP-56 (Phoenix®); balança analítica modelo AG 200 (GEHAKA®); espectrofotômetro digital modelo Q-108DRM (QUIMIS®); placa de aquecimento modelo 752A (Fisatom); potenciômetro modelo Q-400M (QUIMIS®); potenciostato MQPG-01® interface MQI12/8PG (Microquímica automação LTDA), e potenciostato PGSTAT 12 programa GPES manager (AUTOLAB®).

4.2 CONSTRUÇÃO DO ELETRODO DE TRABALHO

A escolha de uma mina de grafite como componente base de um eletrodo de carbono e foco desta dissertação, foi a possibilidade de reunir características vantajosas no que se refere ao alto nível de reprodutibilidade, baixo custo, fácil preparação e fácil disponibilidade no comércio comum. Com relação às características métricas do bastão, como por exemplo o diâmetro, foi necessária a definição da medida de trabalho, face ao elevado número de possibilidades existentes no mercado. A escolha do diâmetro de 2.0 mm levou em consideração ter um material de trabalho menos frágil e que pudesse resistir bem aos procedimentos de construção do eletrodo. O diâmetro escolhido permanece dentro da faixa de diâmetros de bastão de grafite pesquisados em outros trabalhos científicos.

No início de cada processo de preparação do eletrodo de grafite, foi realizada a inspeção visual do bastão de grafite HB da marca TREE ® (2.0mm ∅, h = 88.0 mm) adquirido do comércio comum, com o objetivo de identificar quaisquer imperfeições existentes no mesmo, tais como diferenças de tamanho, falhas nas bordas e superfícies irregulares ou rugosas. A inspeção visual buscou, assim, minimizar os erros experimentais associados ao bastão. Outra característica identificada nos bastões de grafite adquiridos no comércio foi a intensa quantidade residual de grafite. Para evitar possíveis interferências nas leituras, ou falta de reprodutibilidade nas medições, este material foi removido por meio de fricção

simples com papel de baixa densidade. Fica clara a existência de uma cedência mínima de grafite, entretanto, com a limpeza do bastão este processo foi drasticamente reduzido. As pequenas falhas retas, depressões e rugosidades existentes na extremidade plana do bastão de grafite, foram retiradas pelo polimento com lixa de 600 mesh. O aspecto do bastão de grafite, antes e depois do processamento, bem como o resíduo deixado no material de limpeza, podem ser observados no anexo B e C, respectivamente. O bastão limpo apresenta um brilho característico que pode ser observado no anexo C.

Após a limpeza do bastão, o mesmo foi inserido em um cilindro de Teflon® e exposto 5 mm da extremidade da mina. Na construção do cilindro de Teflon®, o diâmetro deste correspondeu ao do bastão de grafite, de forma que não houvesse folga entre os dois. Além de evitar o contato de direto com o material eletródico, o cilindro de Teflon foi necessário para conferir uma maior resistência ao eletrodo. Com estes procedimentos citados, a montagem do eletrodo de trabalho foi então finalizada. A representação esquemática do eletrodo de trabalho montado com as suas partes são ilustradas na figura 11.

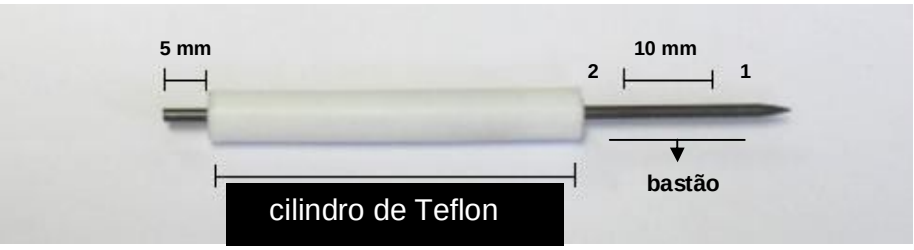


Figura 11. Esquema do eletrodo de grafite sólido comercial.

4.3 PROCEDIMENTO DE TRATAMENTO E PREPARO DA SOLUÇÃO DE HRP

A enzima Horseradish peroxidase, HRP (E.C.1.11.7), utilizada nos experimentos foi doada gentilmente pela TOYOBO®. Inicialmente foi pesado 100 mg de massa da enzima não purificada. Posteriormente, a massa pesada foi suspensa em tampão fosfato pH 7,0, e filtrada em papel de filtro. O filtrado foi colocado no tubo de celulose ou membrana de diálise SPECTRUM® , que possuía espessura de 25 mm e 16 mm de diâmetro e faixa de peso

molecular de 12000 – 14000 kDalton para a remoção de impurezas de peso molecular inferior à 12.000 Daltons. A membrana de diálise foi hidratada antes de ser aberta, com água MilliQ. Após a adição do filtrado na membrana, as extremidades desta foram fechadas com pinças SPECTRUM MICROGON (WELAND) e colocada em béquer de 2 litros imersa em água MilliQ na geladeira por 24 horas. A água de repouso foi trocada de 4 a 6 vezes. A água MilliQ foi renovada periodicamente para facilitar a difusão das impurezas do interior para o exterior da membrana de diálise. Passadas as 24 horas, a solução de enzima foi coletada da membrana, e transferida para um recipiente âmbar. As amostras foram mantidas à -20 °C. As amostras da enzima só foram descongeladas por ocasião da medição da atividade enzimática em tampão fosfato pH= 7,0 (ALHADEFF, 2005).

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

As metodologias analíticas utilizadas neste trabalho tiveram como objetivos confirmar a funcionalidade da enzima, demonstrar a imobilização da enzima no eletrodo de grafite e estudar o comportamento eletroquímico do eletrodo de grafite isoladamente, imobilizado com a enzima HRP e sob a variação da concentração de fenol. Para tanto, foi utilizada a medição da atividade enzimática pelo método de Nicell e Wright (1997, p. 303), como forma de mostrar a integridade da enzima e a quantificação de proteínas pelo método de Lowry modificado (PETERSON, 1977), para confirmar a presença da enzima na superfície do eletrodo de bastão de grafite e a voltametria cíclica para o estudo da eletroquímica do eletrodo.

4.4.1 **Determinação da atividade enzimática**

A determinação da atividade foi por meio do método colorimétrico proposto por Nicell e Wright (1997, p. 303). O procedimento consistiu em adicionar na cubeta de leitura 100 μL de fenol 0,2 M (VETEC®), 1500 μL de tampão fosfato 0,2 M (pH= 7,0), 100μL de 4-aminoantipirina 0,048 M (SIGMA®), 200 μL de peróxido de hidrogênio 20 mM (VETEC®) e 100 μL da enzima peroxidase. A mistura foi levada para análise em espectrofotômetro, onde as leituras foram feitas no comprimento de onda de 510 nm, a cada segundo por um período de 60 segundos. As soluções de fenol e peróxido foram preparadas no momento do ensaio.

A unidade de atividade (U) é definida como o número de μmol de peróxido de hidrogênio utilizado em 1 minuto, nas condições descritas anteriormente. A atividade foi calculada segundo a seguinte fórmula descrita na equação EQ.6:

$$A = \frac{\Delta ABS/min \ x \ V_t}{7210 \ x \ V_a} \ x \ 10^6 \ x \ f_d \quad \text{(EQ. 6)}$$

Onde, $\Delta ABS/min$ é o coeficiente angular da regressão linear da cinética enzimática; V_t é o volume total empregado; V_a é o volume da amostra e f_d o fator de diluição da solução enzimática.

4.4.2 **Quantificação de proteínas**

O procedimento de imobilização foi precedido pela retirada de uma alíquota da enzima para o teste de quantificação de proteínas. Este medida foi baseado no método de Lowry modificado (PETERSON, 1977), com o uso das soluções de Lowry (carbonato de sódio anidro P.A. 99,5% VETEC®; sulfato de cobre P.A., 99% heptahidratado, MERCK® e tartarato de sódio e potássio, J.T.Baker Chemical) e reagente de Folin 1,0 N (Folin & Ciocalteu 2 N, SIGMA CHEMICAL®). Foram adicionados 40 μL da solução enzimática em um tubo de ensaio e posteriormente água MilliQ completando 800μL com a solução enzimática. A adição seguinte foi de 800 μL da solução de Lowry e posterior tempo de incubação de 10 minutos ao abrigo da luz e banho de 30°C. Após este período, foram acrescidos 400 μL do reagente de Folin 1,0 N ao tubo de ensaio e colocado em incubação por 30 minutos, nas mesmas condições do procedimento anterior. Terminada a incubação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm. Para a determinação da concentração da amostra, foi construída uma curva de calibração a partir de solução diluída de albumina de soro bovino, CAS: 9048-46-8 SIGMA-ALDRICH, 1mg/mL. A curva de calibração foi plotada com as leituras e a correlação linear foi determinada para a definição da concentração da amostra. Após o período de imobilização, foi retirada novamente uma alíquota da enzima utilizada no procedimento, para a quantificação de proteínas pós-imobilização.

4.4.3 **Análise por voltametria cíclica**

As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula de vidro típica com três eletrodos usando o bastão de grafite como eletrodo de trabalho, espiral de platina como eletrodo auxiliar e eletrodo de Ag /AgCl como eletrodo de referência. Do ponto de vista de facilidade operacional, foi padronizado o volume de 6 mL de solução eletrolítica para todos os experimentos realizados. As medidas de voltametria cíclica foram realizadas em intervalo de potencial de 0 a +0,8 V *vs* Ag/AgCl (KCl 3,0 mol/L) com velocidade de varredura de 100 mV/s, +0,8 à -0,8 V e velocidade de varredura de 100 mV/s nos estudos de imobilização e concentração de fenol e uma última condição, para a concentração de fenol, foi realizada no intervalo de +0,05 a -0,05 V *vs* Ag/AgCl (KCl 3,0 mol/L) com velocidade de varredura de 50 mV/s. A figura 12 ilustra a disposição dos eletrodos na célula. As leituras voltamétricas foram conduzidas no potenciostato modelo MQPG-01®, interfaceado com um computador para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados.

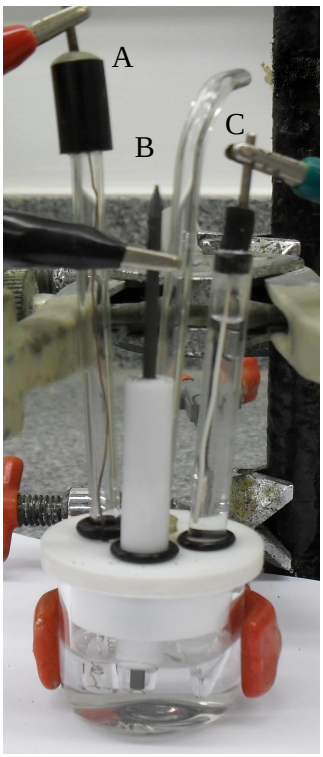


Figura 12. Célula eletroquímica de três eletrodos. (A) contra-eletrodo de platina; (B) eletrodo de trabalho, bastão de grafite sólido comercial ; (C) eletrodo de referência Ag/AgCl.

4.5 PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO

Antes de proceder a imobilização, o bastão foi inserido na solução de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5)/H_2O_2 20 mM, na proporção 15:2 e aplicada a voltametria cíclica no intervalo de potencial de 0 à +0,8 V e velocidade de varredura de 100 mV/s. A curva gerada foi chamada de pré-imobilização. Alíquotas da solução enzimática antes do uso na imobilização foram retiradas para a medição da atividade e para a quantificação de proteínas. A imobilização foi conduzida inserindo 10.0 mm do bastão de grafite em solução enzimática, o que representa uma área superficial de 65,9 mm^2. O conjunto bastão/enzima foi mantido a 4°C, por 8 horas. Após este período de incubação, o grafite foi retirado da solução enzimática, rinsado delicadamente e conservado em tampão fosfato 0,2 M pH= 7,0 (LINDGREN et al, 1997). Após estes procedimentos, foram realizadas as leituras pós-imobilização de voltametria cíclica nas mesmas condições descritas acima.

4.6 ENSAIOS REALIZADOS PARA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO ELETRODO DE GRAFITE

Os primeiros testes realizados avaliaram a resposta do eletrodo de grafite em condições de mudanças físicas e de disposição do mesmo. Quanto à disposição, foi testada a variação da área superficial do bastão de grafite em contato com a solução teste, no caso, a solução de ferrocianeto de potássio 16 mM, e a variação do posicionamento da garra condutora no eletrodo de grafite. Com relação às mudanças físicas, foram realizadas reduções sucessivas do comprimento do eletrodo e testes com polimento e ausência de polimento da extremidade do eletrodo após as reduções. Estes testes buscaram avaliar o impacto destas mudanças sobre a resposta voltamétrica de rotina, uma vez que tratam-se de situações passíveis de ocorrência. Nos experimentos que se seguiram, o eletrodo de grafite foi testado em soluções únicas de peróxido, tampão e fenol, com o objetivo de estudar a influência destas soluções nas leituras futuras de fenol. A conclusão dos experimentos foi com o teste do

eletrodo de grafite em diferentes concentrações de fenol, mantida uma proporção fixa deste com a solução de peróxido.

4.6.1 **Efeito da área superficial do eletrodo de grafite comercial HB 2.0 MM TREE® e posicionamento da garra condutora no eletrodo quando usada solução de ferrocianeto de potássio 16 Mm**

A influência da superfície de contato do bastão em solução eletrolítica foi testada por meio da imersão do bastão em uma solução de ferrocianeto de potássio trihidratado 16 mM (VETEC®). As áreas de 15,7 mm^2 e 66 mm^2 do bastão imerso corresponderam a 2 mm e 10 mm de imersão na solução eletrolítica, respectivamente. Definida a porção cônica do bastão como a mais afastada da solução redox, foram selecionados dois pontos distantes 10 mm como diferenciais para o posicionamento da garra. A posição 1 da garra foi definida como a posição mais afastada da solução e a posição 2 da garra foi a mais próxima da mesma. Todas as leituras foram conduzidas em solução de ferrocianeto de potássio 16 mM, intervalo de potencial de 0 à +0,8 V e 100 mV/s de velocidade de varredura.

4.6.2 **Efeito da redução do comprimento do eletrodo de grafite comercial HB 2.0 MM TREE® em ferrocianeto de potássio 16 mM**

Para avaliar a influência do parâmetro comprimento do bastão de grafite, o mesmo foi cortado e polido sucessivamente e testado em solução eletrolítica de ferrocianeto de potássio 16 mM. Foi inicialmente realizada uma sequência de 3 cortes de 1,0 mm do bastão, e corte final de 7 mm. Após cada corte do bastão de grafite a seção transversal da ponta do mesmo foi polida com lixa de rugosidade de 600 mesh até obter uma superfície homogênea, sem rugosidades visualmente. As condições voltamétricas foram as mesmas do experimento anterior.

4.6.3 **Influência das soluções tampão, peróxido de hidrogênio e fenol na leitura do bastão de grafite**

O bastão de grafite foi testado nas soluções tampão fosfato 0,01 M (pH =7,0), peróxido de hidrogênio 20 mM e fenol 0,2 M. O volume de 6000 μL da célula eletroquímica era completado em sua totalidade com a solução estudada, e o mesmo bastão foi usado nos três testes. Os experimentos investigaram possíveis sinais que pudessem influenciar no uso combinado das três soluções nos experimentos de imobilização. Para tanto, também foi conduzido um último teste em solução de ferrocianeto de potássio 16 mM, com forma de comparação das respostas eletroquímicas. As condições voltamétricas empregadas foram as mesmas do experimento anterior.

4.6.4 **Influência da concentração de fenol**

Para as análises voltamétricas com fenol, foi utilizada uma proporção H_2O_2/fenol de 0,5 em concentração molar (ROSATTO, 2000). As soluções de partida para a composição da solução voltamétrica foram H_2O_2 20 mM e fenol 0,2 M. Os testes foram realizados em eletrodos de grafite com peroxidase imobilizada e concentrações de 50, 100, 200, 400, 800, 1600 μM de fenol. Foram testadas duas condições voltamétricas no estudo da concentração de fenol:

a) intervalo de potencial de +0,8 à -0,8 V e velocidade de varredura de 100 mV/s;

b) intervalo de +0,05 a -0,05 V *vs* Ag/AgCl (KCl 3,0 mol/L) e velocidade de varredura de 50 mV/s.

5 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

5.1 ESTUDOS INICIAIS

5.1.1 **Efeito do posicionamento da garra no eletrodo de bastão de grafite e efeito da área superficial do eletrodo.**

O estudo do posicionamento da garra no bastão de grafite e do efeito da área superficial do bastão de grafite foi conduzido combinando os dois parâmetros estudados, totalizando quatro curvas voltamétricas, como pode ser observado na figura 13. As leituras utilizaram o bastão de grafite como eletrodo de trabalho e solução de ferrocianeto de potássio 16 mM, como solução eletrolítica.

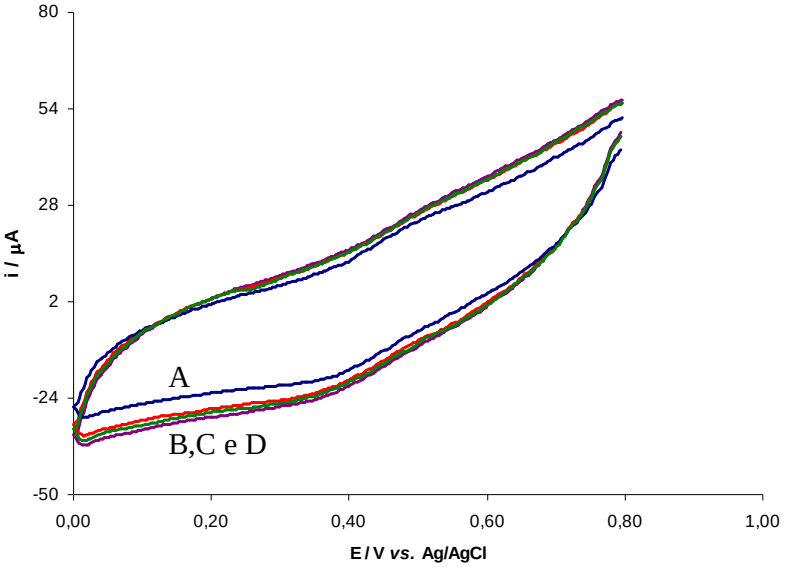


Figura 13. Efeito do posicionamento da garra e área superficial do bastão. (■) garra na posição 1 e bastão submerso – curva A; (■) garra na posição 1 e bastão na superfície - curva B ; (■) garra na posição 2 e bastão na superfície – curva C; (■) garra na posição 2 e bastão submerso -curva D.

Nas curvas A, B, C e D pode-se observar claramente a ausência dos picos catódicos e anódicos característicos das reações redox. Entretanto, as variações na intensidade de corrente podem explicar as influências estudadas. De acordo com os resultados encontrados, observa-se que as curvas B, C e D estão praticamente sobrepostas não indicando diferença significativa entre os dados coletados. Na curva A, entretanto, observamos uma variação de 3,30 µA e 5,40 µA no valor de corrente para os potenciais de 0,17 V e 0,60 V,

respectivamente, quando comparada com as curvas B, C e D. Estas últimas apresentaram entre si a diferença de 0,80 μA no potencial de 0,17 V. No potencial de 0,60 V, as diferenças entre as curvas B, C e D não foram detectáveis. O efeito da imersão foi descartado a partir do momento em que foi fixada a posição 2 da garra e não houve diferença significativa entre as leituras (curvas C e D). A variação encontrada na curva A, pode ser explicada pela maior dispersão da carga ao longo de toda a extensão do grafite, além da maior área superficial disponível para o fluxo elétrico, o que reduziria o valor de corrente nas posições anódicas e catódicas da curva. O mesmo bastão de grafite foi utilizado em todos os testes realizados, os ensaios foram repetidos e as informações foram confirmadas a fim de evitar qualquer variação nos resultados.

5.1.2 **Efeito da redução do comprimento e polimento do eletrodo de bastão de grafite**

As reduções sucessivas no comprimento do bastão buscaram detalhar eletroquimicamente o comportamento da mina de grafite em solução de ferrocianeto de potássio 16 mM.

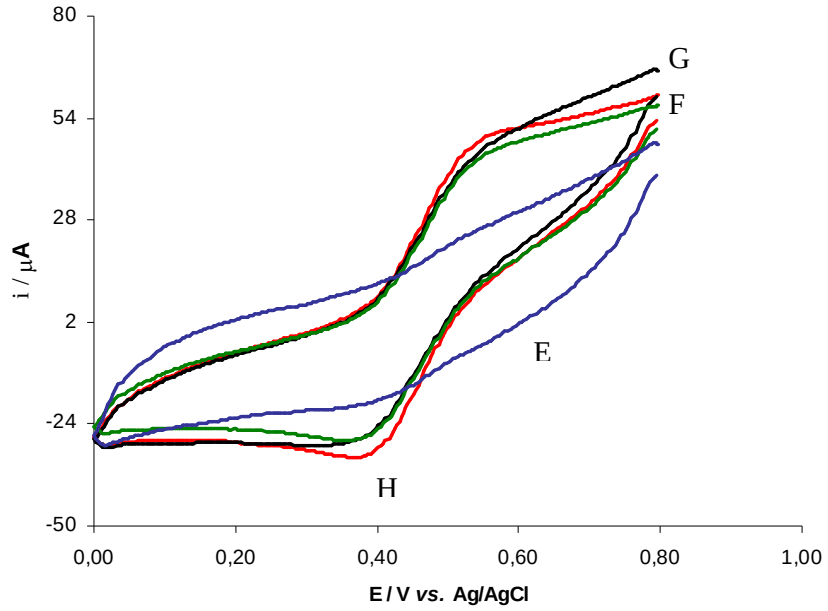


Figura 14. Efeito da redução do comprimento do bastão de grafite. (■) leitura inicial do bastão sem corte – curva E; (■) bastão com redução de 1,0 mm - curva F ; (■) bastão com redução de 2,0 mm – curva G; (■)bastão com redução de 3,0 mm – curva H, em solução de ferrocianeto de potássio 16 mM.

De acordo com os resultados encontrados no experimento anterior de posicionamento de garra e posição do bastão, foi fixada a posição da garra e a imersão do bastão na solução eletrolítica nos experimentos seguintes. O bastão de grafite utilizado na avaliação do efeito do comprimento, foi o mesmo usado no experimento anterior. A leitura inicial do bastão de grafite sem corte, curva E da figura 14, revelou uma curva de baixa intensidade de corrente, sem apresentar picos catódicos e anódicos. Após os sucessivos cortes do bastão, observa-se um aumento significativo na intensidade de corrente e é possível evidenciar também a formação de picos catódicos e anódicos – curvas F, G e H. A curva H, com 3,0 mm de redução, apresentou os maiores sinais de corrente com os seguintes valores de pico: E_{pa}= 0,55 V; I_{pa}= 31,70 μA; E_{pc} = 0,38 V; I_{pc} = -20,50 μA. Estes dados indicam um aumento na sensibilidade apresentada por este eletrodo nas condições experimentais propostas.

Após os três cortes sucessivos e seus respectivos polimentos da extremidade, foi realizado o corte de 7,0 mm, totalizando 10,0 mm de redução da mina. Nesta etapa, o grafite foi analisado em solução de ferrocianeto de potássio 16 mM sem polimento prévio – curva M (E_{pa}= 0,57 V; I_{pa}= 18,0 μA; E_{pc} = 0,37 V; I_{pc} = -7,59 μA; ΔE_p = 0,20 V) da figura 15. Finalizada a leitura, o bastão foi polido e submetido à uma nova leitura – curva Y (E_{pa}= 0,57 V; I_{pa}= 43,18 μA; E_{pc} = 0,37 V; I_{pc} = -30,70 μA; ΔE_p = 0,20 V). Na curva M é marcada a baixa variação de corrente entre os eventos oxidativos e redutores, embora possa ser observada a presença de picos anódicos e catódicos.

A resposta da superfície rugosa e opaca do bastão não polido está diretamente relacionada com os resultados obtidos para esta condição, uma vez que o comprimento do bastão não foi alterado para o grafite polido. Segundo Tavares e colaboradores (2008, p. 829), o processo de polimento e limpeza reduziram o valor de ΔE_p do eletrodo GRC comparado com a leitura direta de um bastão Faber-Castell®. Os valores calculados de ΔE_p para as curvas mostram um afastamento do valor teórico de 0,059 V, sugerindo uma transferência de elétrons quase reversível. As relações I_{pa} / I_{pc} , para as superfícies polidas e não polidas são 1,40 e 2,37, respectivamente, mostrando uma aproximação da unidade para a superfície polida e consequente maior reversibilidade para o bastão. Como forma de dimensionar a diferença entre as duas respostas, as diferenças entre os I_{pa} das curvas Y e M e entre os I_{pc} das mesmas curvas, são de 25,18 μA e -23,11 μA, respectivamente.

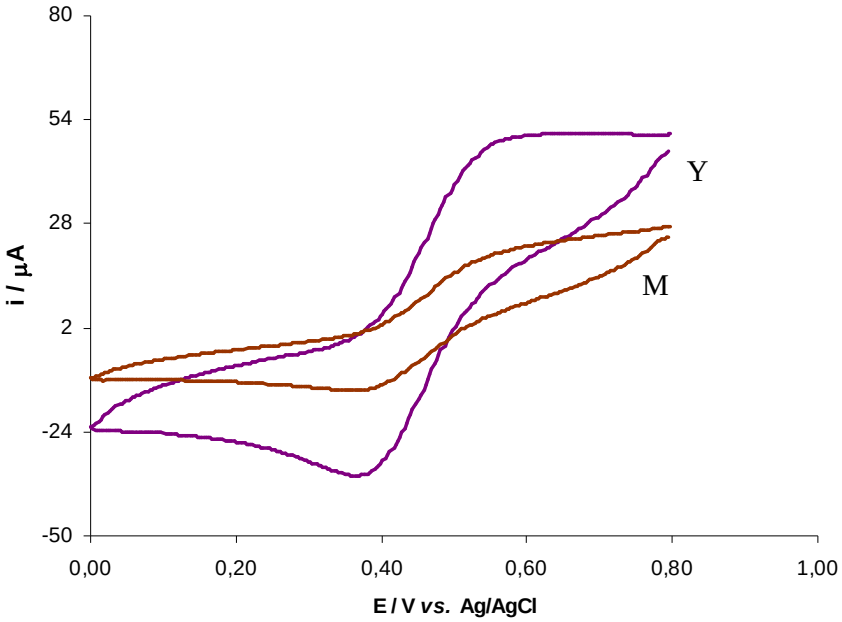


Figura 15. Efeito do polimento do eletrodo de bastão grafite. (■) bastão com redução de 10,0 mm, sem polimento – curva M; (■) bastão com redução de 10,0 mm, com polimento - curva Y.

5.1.3 **Influência da solução tampão, fenol e peróxido na leitura do eletrodo de bastão de grafite**

Foram testadas as soluções de tampão fosfato 0,01 M (pH =7,0), peróxido de hidrogênio 20 mM e fenol 0,2 M. Na figura 16 (X, Y e Z) pode-se observar as curvas correspondentes às soluções analisadas separadamente. A leitura do eletrodo de grafite também foi conduzida em solução de ferrocianeto de potássio 16 mM como forma de comparação dos efeitos eletroquímicos das soluções. Pelas curvas apresentadas na figura 17, observa-se a quase ausência de resposta de corrente sob o potencial aplicado (0 V à +0,8 V) para as soluções de peróxido de hidrogênio 20 mM, fenol 0,2 M e tampão fosfato 0,01 M (pH =7,0) quando comparadas com a resposta da solução de ferrocianeto de potássio 16 mM. Nesta série de experimentos, a curva referente à solução de ferrocianeto de potássio apresentou os seguintes valores no pico: E_{pa}= 0,58 V; I_{pa}= 73,33 µA; E_{pc} = 0,36 V; I_{pc} = -43,61 µA; ΔE_p = 0,22 V e relação I_{pa} / I_{pc} = 1,68. Os valores de pico de corrente encontrados nestes experimentos foram diferentes dos encontrados no experimento 5.1.2 na ordem de 30,0 e 13,0 µA, para os picos anódicos e catódicos, respectivamente.

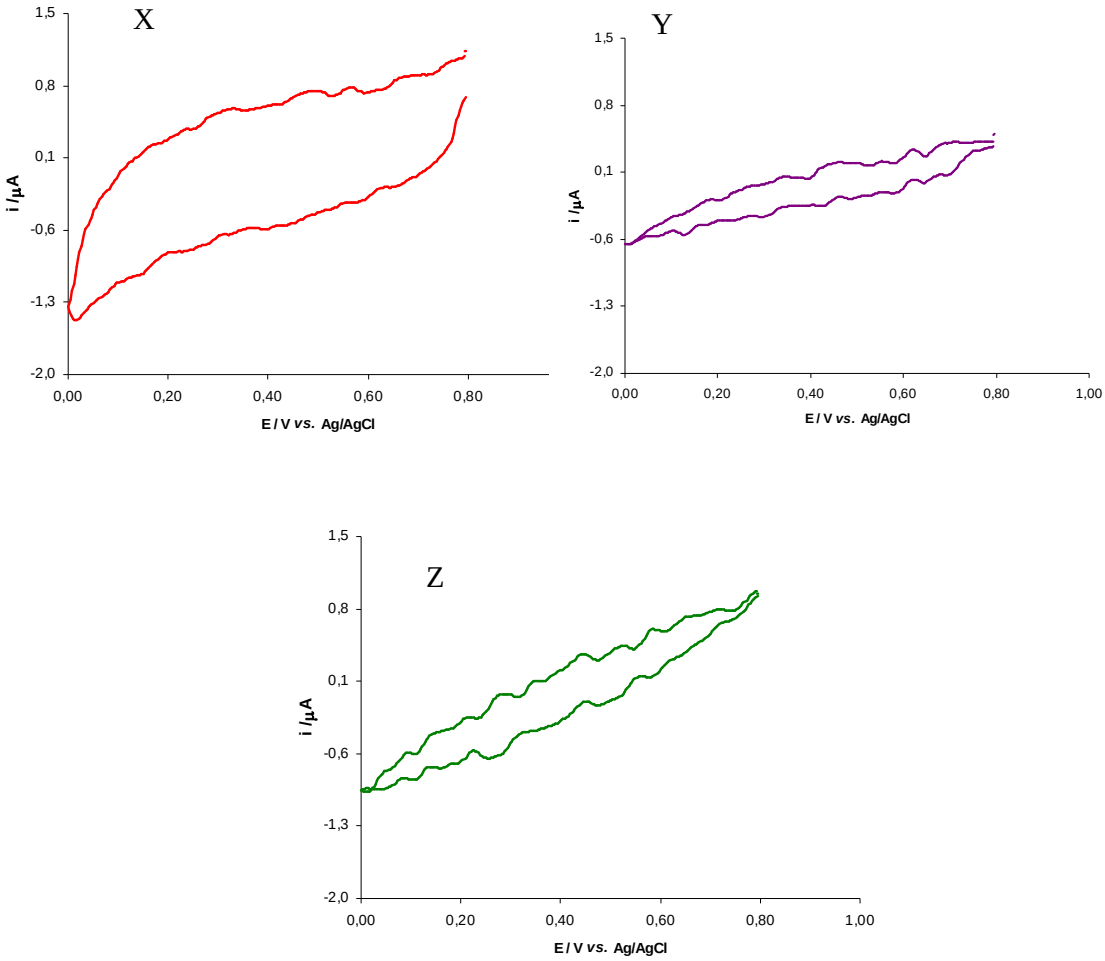


Figura 16. Influência das soluções tampão fosfato, peróxido de hidrogênio e fenol. (X) voltamograma do eletrodo de bastão grafite em tampão fosfato 0,01 M (pH =7,0); (Y) peróxido de hidrogênio 20 mM; (Z) fenol 0,2 M.

Estes dados podem indicar as diferenças de composição entre bastões de grafite, uma vez que os experimentos dos itens 5.1.2 e 5.1.3 foram realizados com bastões de grafite diferentes.

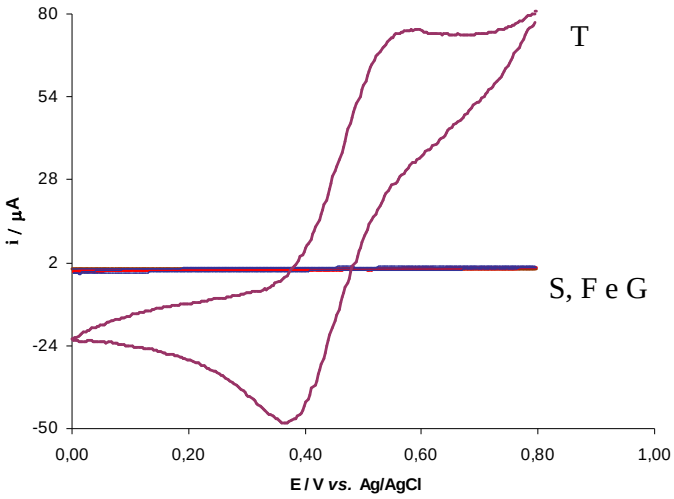


Figura 17. Comparação de voltamogramas. (T) em solução de ferrocianeto de potássio 16 Mm; (S) em tampão fosfato 0,01 M (pH =7,0); (F) em peróxido de hidrogênio 20 mM; (G) em fenol 0,2 M.

5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DA IMOBILIZAÇÃO

Como forma de evidenciar a adsorção da enzima peroxidase no eletrodo de grafite, os testes iniciais do eletrodo e a medição da atividade enzimática foram cruciais para entender as modificações causadas pela presença da enzima e a funcionalidade da mesma. As leituras da atividade mostraram uma variação de 0,783 à 1,220 U/mL com desvio padrão de 0,1569 para um total de 20 amostras testadas. A solução usada nas leituras voltamétricas de imobilização, composta por tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5) e H_2O_2 20 mM, promove a reação de oxi-redução que envolve a enzima peroxidase e o peróxido de hidrogênio. Neste caso, a transferência de elétrons envolvida é a direta, onde a enzima HRP na sua forma oxidada recebe o afluxo de elétrons proveniente do eletrodo de carbono, restaurando assim a sua forma ativa. A composição desconhecida do bastão de grafite comercial usado na construção do eletrodo de grafite, motivou a realização de testes de imobilização em diferentes eletrodos como forma de diferenciação entre os diferentes bastões de grafite de um mesmo fabricante.

Na figura 18 pode-se observar os testes aplicados em dois eletrodos com bastões de grafite diferentes. Em cada eletrodo se observa uma diferença clara na intensidade de corrente entre a leitura anterior (pré-imobilização) e posterior (pós-imobilização) ao processo de imobilização. As diferenças entre as curvas de pré-imobilização e pós-imobilização

ficaram na faixa de 15-25 μA de corrente, para os diferentes eletrodos testados. Os conjuntos de curvas Q (primeiro eletrodo) e R (segundo eletrodo) comparados, revelam também variações nas respostas, o que pode ser associado diretamente à diferença de composição do bastão de grafite, pela não obrigatoriedade de um elevado grau de pureza e homogeneidade na preparação industrial da mina. Shellev e colaboradores (2005) mostram a alteração da corrente eletrocatalítica em eletrodos imobilizados com laccase. Nota-se neste caso, também a ausência de picos.

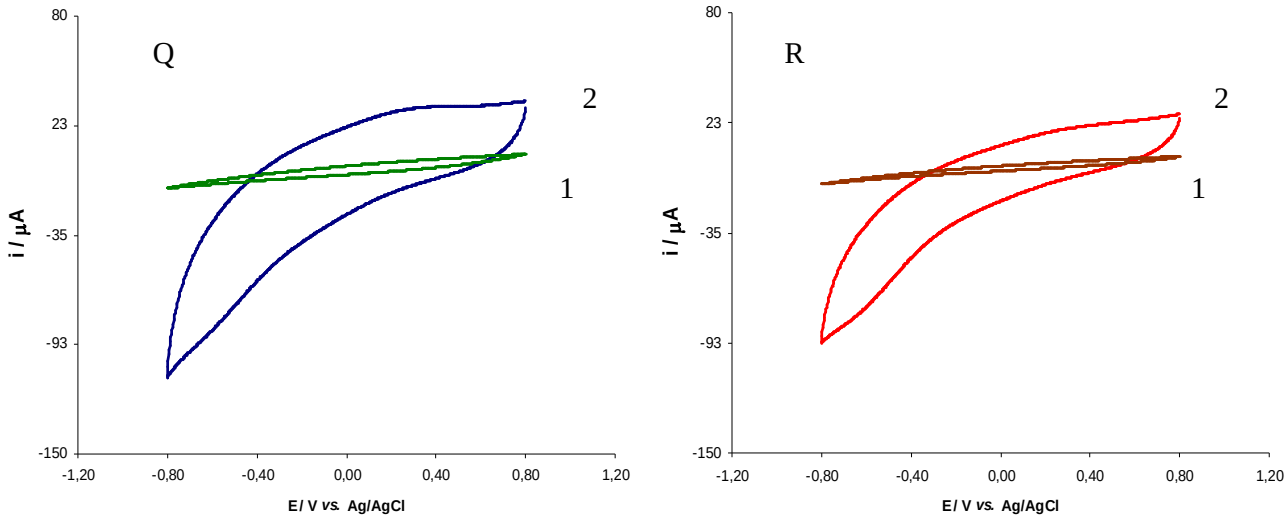


Figura 18. Imobilização de HRP em dois eletrodos de grafite HB 2.0 mm comercial de mesma procedência. As medições voltamétricas antes (1) e depois (2) da imobilização foram conduzidas para o primeiro (Q) e segundo (R) eletrodos em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5) e H_2O_2 20 mM.

A ausência de picos catódicos e anódicos nos exemplos apresentados podem representar um maior bloqueio na transferência de elétrons entre o eletrodo e a enzima, no par redox Fe^{II} / Fe^{III} presente no grupo heme da HRP ou na difusão de moléculas mediadoras até a superfície do eletrodo (ZHANG et al, 2004; JIA et al, 2002). Nos casos em que existe a formação de picos, a diferença de potencial de pico, ΔE_p, pode também ser um parâmetro de compreensão do processo de transferência de elétrons uma vez que quanto maior o variação de potencial de pico, menor será a transferência (RUAN et al, 1998). Trabalhos têm sido desenvolvidos na busca de membranas funcionais, também conhecidos como filmes poliméricos, tal como a combinação de Nafion e cisteína, que possibilitem uma maior condução elétrica entre o eletrodo e a enzima e consequente maior sensibilidade para o biossensor (HONG et al, 2007; PEREIRA et al, 2002; LIU et al, 2006).

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantidade média encontrada da enzima HRP antes da imobilização foi de 0,0641 mg/mL, enquanto que a pós-imobilização foi de 0,0577 mg/mL. Estes resultados deram uma variação mássica de 0,0064 mg/mL da enzima, o que representa um percentual de retenção enzimática de 10% no eletrodo. De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, poucos foram os trabalhos que relacionaram a quantificação de proteínas nestes experimentos. Rosatto (2000, p. 59) no desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol, fixa em 1mg/mL a quantidade enzimática e varia o volume enzimático em 100, 200 e 300 μL. Oliveira e Vieira (2006, p. 936), estudaram o efeito da concentração da enzima, expressando em unidades de peroxidase / mg de proteína. As diferentes metodologias de quantificação e condução dos experimentos dos trabalhos citados dificultaram um estudo comparativo com os resultados obtidos nesta dissertação. Com relação à quantificação de proteínas inicial e a atividade enzimática, Alhadeff (2005) obteve o valor médio de 0,452 mg/mL para a quantificação de proteínas e valor na ordem de 160 U/mL para a atividade enzimática. Estes valores foram superiores na ordem de 7 e 200 vezes os valores obtidos para a quantificação de proteínas e atividade enimática nesta dissertação, respectivamente.

5.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL

Após os resultados obtidos com a solução de peróxido em tampão, uma nova condição foi estabelecida. A adição da solução de fenol ao meio voltamétrico trouxe uma nova condição eletrônica para os experimentos, a transferência mediada de elétrons. As concentrações de 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 μM de fenol testadas em dois eletrodos de grafite diferentes denominados J e L, geraram respostas amperométricas que podem ser observadas na figura 19. A relação molar de peróxido/fenol foi mantida em 0,5 uma vez que a alta concentração de peróxido pode tornar a enzima inativa, e a proporção utilizada foi considerada ótima para este tipo eletródico (ADEDIRAN et al, 1989; ROSATTO et al, 2000). Os valores crescentes na concentração do fenol, promoveram um aumento de sinal de corrente como pode ser observado em (a) e (b), e uma estabilização nos pontos seguintes (c e d), todos eles na porção final da região anódica das curvas. Comparativamente, as variações de corrente foram mais uniformes na região anódica do que na região catódica, sendo esta a razão para a escolha da primeira.

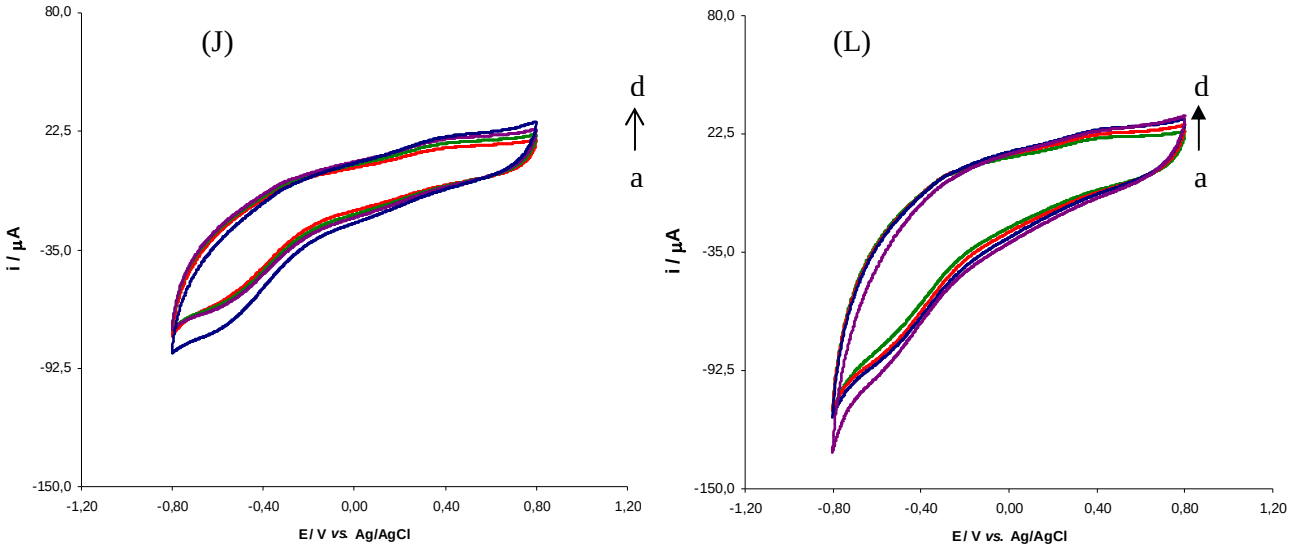


Figura 19. Efeito da concentração de fenol em dois eletrodos de carbono diferentes. (**J**) 50 µmol/L (■/ a); 100 µmol/L – (■/ b); 200µmol/L – (■/ c); 400µmol/L – (■/d); (**L**) 200 µmol/L - (■/a); 400 µmol/L – (■/b); 800µmol/L – (■/c); 1600µmol/L – (■/d). Completou o meio a solução de peróxido na proporção de 0,5 (peróxido/fenol), e tampão fosfato 0,1 M (pH=6,5) para o volume total do meio voltamétrico de 6000 µL.

Fixado o potencial de 0,77 V, no caso do eletrodo J, foi construída uma nova curva que relacionou a variação de corrente com a concentração de fenol a partir das leituras de corrente em função do potencial em diferentes concentrações de fenol. Para o eletrodo L, foi fixado o potencial de 0,64 V e construída uma nova curva seguindo o mesmo procedimento realizado para o eletrodo J. Na figura 20 podem ser observadas as novas curvas para o eletrodo J e L originadas das curvas da figura 19. Em relação ao eletrodo J, a resposta apresentou linearidade nas concentrações de 100, 200 e 400 µmol/L com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9960. A concentração de 50 µmol/L está representada graficamente por um ponto por estar fora do comportamento linear. Em relação ao eletrodo L, a resposta apresentou linearidade nas concentrações de 200, 400 e 800 µmol/L com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9915. A concentração de 1600 µmol/L está representada graficamente por um ponto por estar fora do comportamento linear. Os resultados encontrados para os dois eletrodos mostram a boa resposta para a solução investigada. Chen e colaboradores (2009, p. 3042) mostraram um caso de curva voltamétrica com baixa resposta de corrente para peróxido, o que significa também dizer uma baixa atividade catalítica para a redução de peróxido. A

ausência de picos bem definidos na figura 19, indica um maior bloqueio da transferência direta de elétrons entre o eletrodo e a enzima (MENDES et al, 2008). Além disso, a característica de lenta transferência de elétrons no processo direto (RUZGAS et al, 1995) reforçam a idéia de uma prevalência do processo mediado, o que é desejável pela participação do fenol no processo, o que não ocorre no processo direto.

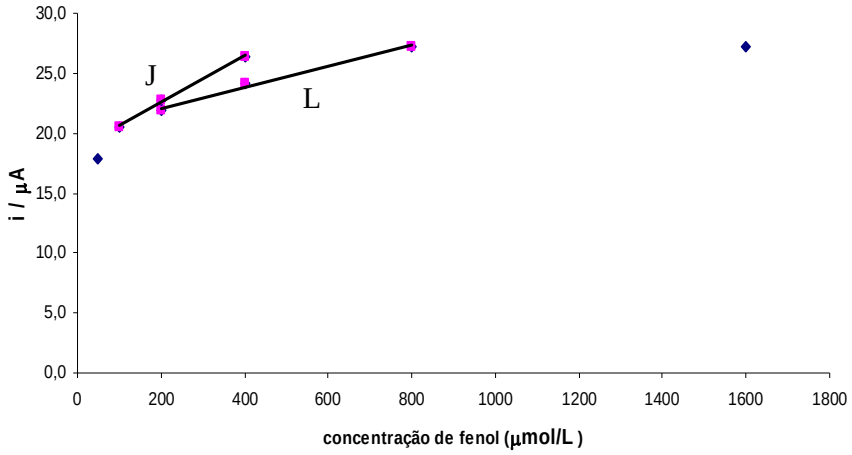


Figura 20. Regressão linear das curvas corrente x concentração de fenol derivadas dos voltamogramas dos eletrodos J e L da figura 19.

Vale destacar que, mesmo diante destes fatos, não é possível fazer uma correlação direta da concentração de fenol com o sinal de corrente obtido. O fato de nem todas as moléculas enzimáticas estarem envolvidas em um só processo de transferência (LINDGREN et al, 1997), reforça a idéia que a resposta eletroquímica, no caso estudado, terá sempre uma componente correspondente ao processo mediado e outra correspondente ao processo direto de transferência de elétrons.

Segundo ROSSATO e colaboradores (2000), o potencial aplicado tem um grande efeito sobre a resposta do biossensor, de forma que foi observada uma desativação irreversível de HRP adsorvida em potenciais mais negativos. Mesmo com a resposta do biossensor aumentando quando o potencial aplicado desloca para valores mais negativos, potenciais próximos de 0 V, podem manter a integridade enzimática Dessa forma, foi mudado o ciclo de potencial aplicado de -0,8V à +0,8V para -0,05 V e +0,05 V. Nesta nova condição, a velocidade de varredura padronizada em 100 mV/s, provocou erros nas leituras realizadas.

Com isso, foi reduzida à metade a velocidade de varredura aplicada, o que corrigiu os efeitos deletérios. As curvas são mostradas na figura 21.

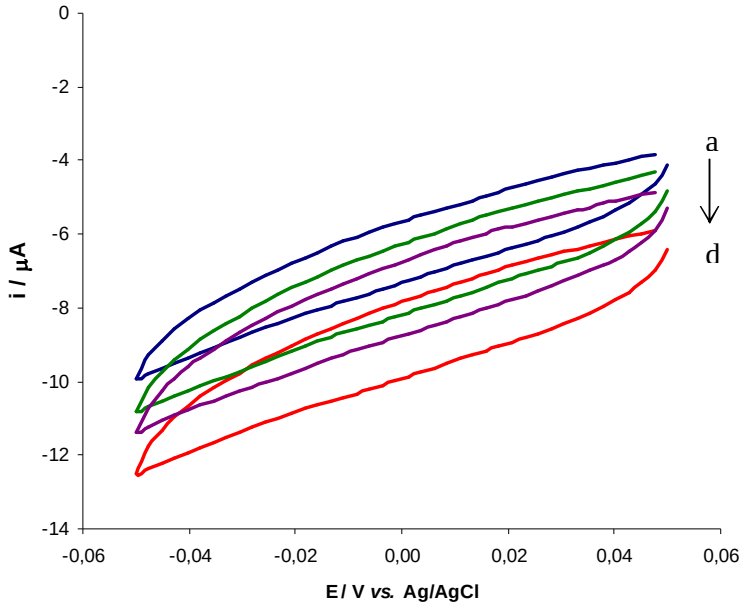


Figura 21. Efeito da concentração de fenol sob a condição do ciclo de -0,050 V à +0,050 V e 50 mV/s. (**I**) 50 µmol/L - (a); 100 µmol/L – (b); 200µmol/L – (c); 400µmol/L – (d); Completou o meio a solução de peróxido na proporção de 0,5 (peróxido/fenol), e tampão fosfato 0,1 M (pH=6,5) para o volume total do meio voltamétrico de 6000 µL.

Os voltamogramas gerados foram analisados, possibilitando construir uma curva que correlacionou a intensidade de corrente com a concentração de fenol, com resposta linear a partir de 100 µmol/L e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9998, como mostrado na figura 22. A concentração de 50 µmol/L está representada graficamente por um ponto por estar fora do comportamento linear.

Estudos desenvolvidos por Ruzgas e colaboradores (1995, p. 252) com biossensores amperométricos para fenol, revelam uma faixa de linear de 10-20 µM de fenol em solução. No caso do trabalho desenvolvido por Rosatto e colaboradores (1999, p. 65) com eletrodos modificados no composto sílica-titânio, a resposta linear obtida foi na faixa de 10-50 µM de fenol em solução.

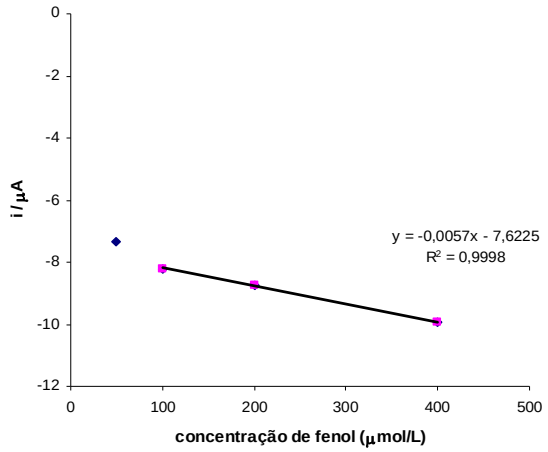


Figura 22. Regressão linear das curvas corrente x concentração de fenol derivadas dos voltamogramas da figura 21.

A diferença encontrada entre as respostas lineares deste trabalho e os resultados encontrados na literatura, indicam a necessidade de pesquisas voltadas para o trabalho com eletrodos modificados, de forma a obter maiores sensibilidade e seletividade na resposta eletroquímica. Os resultados obtidos na modificação do ciclo de potencial e velocidade de varredura mostraram uma diferenciação na leitura de corrente, uma vez que a intensidade de corrente reduz com o aumento da concentração de fenol, diferente das respostas obtidas na primeira condição. Diante destas questões, novos experimentos deverão ser realizados para a elucidação dos eventos eletroquímicos no biossensor.

6 **CONCLUSÕES**

Eletrodos de bastão grafite são reconhecidos por apresentarem alta sensibilidade, boa relação resposta/ruído e facilidade de construção do eletrodo. Estudar as características físicas e elétricas do material suporte dos estudos, torna-se essencial para o domínio da metodologia de análise. De acordo com os resultados encontrados, pode-se chegar as seguintes conclusões:

1 Os testes de posicionamento da garra e profundidade do bastão de grafite na solução eletrolítica, não mostraram diferenças significativas quando da mudança de posição, entretanto alerta-se para o somatório de influências.

2 A redução do comprimento do bastão de grafite influenciou diretamente na resposta eletroquímica em solução de ferrocianeto de potássio 16 mM, inclusive com a formação de picos catódicos e anódicos.

3 O nível de rugosidade ou de polimento da superfície do bastão de grafite foi determinante na intensidade de corrente, sem necessariamente haver comprometimento dos picos catódicos e anódicos.

4 As soluções de peróxido, fenol e tampão apresentam sinais de corrente inexpressivos, quando comparados com a solução de ferrocianeto de potássio 16 mM, o que garante uma não interferência durante as leituras de imobilização.

5 Expressiva diferenciação entre os eletrodos imobilizados e os não imobilizados por meio da voltametria cíclica, com aumento de intensidade de corrente para o primeiro, apesar da ausência de picos catódicos e anódicos, indicativos de uma transferência de elétrons direta eficiente.

6 Resposta linear para o intervalo de 100-800 μmol/L de fenol para o total de leituras de concentração realizadas, podendo ser ampliada esta faixa até 50 μmol/L como valor de mínimo e não mais que 1600 μmol/L como valor de máximo.

7 Modificação dos parâmetros velocidade de varredura e variação no ciclo de potencial, como forma de preservação da enzima no caso da mudança no ciclo de potencial, e adequação ao curto ciclo de potencial no caso da mudança da velocidade de varredura, com consequente melhora nos resultados e na regressão linear da reta.

7 **SUGESTÕES**

Testar outros derivados fenólicos e comparar as respostas encontradas com os resultados desta dissertação.

Analisar outras variedades de bastões de grafite disponíveis no mercado e trabalhar comparativamente com o grafite estudado de 2.0 mm (com relação ao diâmetro e dureza).

Realizar a validação do método, por meio dos testes de linearidade, sensibilidade, acuracidade, robustez, dentre outros.

Testar o eletrodo de grafite com amostras reais e estudar os possíveis interferentes na análise.

Estudar a estabilidade do eletrodo de grafite imobilizado com a peroxidase.

Testar as concentrações de fenol por análises em fluxo (FIA) com uma fonte contínua de peróxido, de forma a identificar a corrente de fundo gerada pela redução eletroquímica direta da peroxidase, e o pico formado pela adição de fenol como redução mediada.

Testar o recobrimento do eletrodo de grafite com filmes poliméricos à base de polivinilpiridina ou Nafion, devido à característica de aumentar a velocidade de transferência de elétrons e assim melhorar a resposta eletroquímica.

8 **REFERÊNCIAS**

ADAMS, J. B. **Regeneration and the kinetics of peroxidase inactivation**. *Food Chemistry*, v. 60, n. 2, p. 201-206, 1997.

ALFAYA, A. A.; KUBOTA, L. T. **A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores**. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002.

ALHADEFF, E.M. **Projeto e Aplicação de Sistemas de Biossensores Integrados para Detecção de Etanol**. *Tese de doutorado*. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

ARIKSOYSAL, D. O.; KARADENIZ, H.; ERDEM, A.; SENGONUL, A.; SAYINER, A. A.; OZSOZ, M. **Label-free electrochemical hybridization genosensor for the detection of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance**. *Analytical Chemistry*, v. 77, p. 4908-4917, 2005.

ARIKSOYSAL, D.; TEZCANLI, B.; KOSOVA, B.; OZSOZ, M. **Design of Electrochemical Biosensor Systems for the Detection of Specific DNA Sequences in PCR-Amplified Nucleic Acids Related to the Catechol-O-methyltransferase Val108/158Met Polymorphism Based on Intrinsic Guanine Signal.** *Analytical Chemistry*, v. 80, n. 3, p. 588–596, 2008.

AOKI, K.; KOBAYASHI, A.; KATO, N. **Amperometric determination of ozone in water at disposable graphite reinforcement carbon electrodes.** *Electroanalysis*. v. 2, n. 1, p. 31-34, 1990.

AOKI, K.; OKAMOTO, T.; KANEKO, H.; NOZAKI, K.; NEGISHI, A. **Applicability of graphite reinforcement carbon used as the lead of a mechanical pencil to voltammetric electrodes**. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 263, n. 2, p. 323-331, 1989.

BIELICKA-DASZKIEWICZ, K.; DEBICKA, M.; VOELKEL, A. **Comparison of three derivatization ways in the separation of phenol and hydroquinone from water samples**. *Journal of Chromatography A*, v.1052, p. 233-236, 2004.

BOLLO, S.; FINGER, S.; STURM, J. C.; NÚÑEZ-VERGARA, J. A.; SQUELLA, J. A. **Cyclic voltammetry and scanning electrochemical microscopy studies of the**

heterogeneous electron transfer reaction of some nitrosoaromatic compounds *Electrochimica Acta*, v. 52, n. 15, p. 4892-4898, 2007.

BOND, A. M.; MAHON, P. J.; SCHIEWE, J.; VICENTE-BECKETT, V. **An inexpensive and renewable pencil electrode for use in field-based stripping voltammetry** *Analytica Chimica Acta*, v. 345, n. 1-3, p. 67-74, 1997.

BRUSCIOTTI, F.; DUBY, P. **Cyclic voltammetry study of arsenic in acidic solutions**. *Electrochimica Acta*, v. 52, n. 24, p. 6644-6649, 2007.

CALVO, E. J.; DANILOWICZ, C. **Amperometric Enzyme Electrodes**. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 8, n. 6, p. 563-574, 1997.

CASS, T.; LIGLER, F. S. **Immobilized biomolecules in analysis: a practical approach**, *Oxford University*. Press: Nova Iorque, 1998.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. **Mediated biosensors**. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 17, n. 6-7, p. 441-456, 2002.

CHEN, S.; YUAN, R.; CHAI, Y.; YIN, B.; LI, W.; MIN, L. **Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase on core–shell organosilica@chitosan nanospheres and multiwall carbon nanotubes composite** *Electrochimica Acta*, v. 54, n. 11, p. 3039-3046, 2009.

CHIBATA, I. **Immobilized enzymes research and development**, *John Wiley and Sons*, Nova Iorque, p. 32, 1978.

CUNNINGGHAM, A. J. **Introduction to bioanalytical sensors**, *John Wiley and Sons*, Nova Iorque, 1998.

DAVE'S GARDEN. **Imagens de plantas**. Disponível em: <http://davesgarden.com/guides/pf/showimage/89983>. Acesso: 12/01/2010.

DEMETRIADES, D.; ECONOMOU, A.; VOULGAROPOULOS, A. **A study of pencil-lead bismuth-film electrodes for the determination of trace metals by anodic stripping voltammetry**. *Analytica Chimica Acta*, v. 519, p. 167–172, 2004.

DIAO, G.; ZHANG, Z. **Theory and application of cyclic voltammetry at a hemispherical microelectrode for a quasi-reversible reaction**. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 410, n. 2, p. 155-162, 1996.

DOGAN-TOPAL, B.; USLU, B.; OZKAN, S. A. **Voltammetric studies on the HIV-1 inhibitory drug Efavirenz: The interaction between dsDNA and drug using electrochemical DNA biosensor and adsorptive stripping voltammetric determination on disposable pencil graphite electrode**. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 8, p. 2358-2364, 2009.

DUFFY, P.; SAAD, I.; WALLACH, J. M. **New development of conductometric measurements in analytical biochemistry**. *Analytica Chimica Acta*. v.2, n. 267, 1988.

ERDEM, A.; PAPAKONSTANTINOU, P.; MURHY, H. **Direct DNA Hybridization at Disposable Graphite Electrodes Modified with Carbon Nanotubes.** *Analytical Chemistry*, v. 78, n.18, p. 6656–6659, 2006.

ESKIOCAK, U.; ARIKSOYSAL, D.; OZSOZ, M.; OKTEM, H. **Label-Free Detection of Telomerase Activity Using Guanine Electrochemical Oxidation Signal**
Analytical Chemistry, v. 79, n. 22, p. 8807–8811, 2007.

ELKAOUTIT, M.; RODRIGUEZ, I. N.; DOMINGUEZ, M.; ARTIGA, M.; MILLA, D.; CISNEROS, H. **A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on Horseradish Peroxidase (HRP) enzyme immobilized in a Nafion–Sonogel–Carbon composite.** *Electrochimica Acta*, v. 53, n. 24, p. 7131-7137, 2008.

FARRÉ, M.; KANTIANI, L.; PÉREZ, S.; BARCELÓ, D. **Sensors and biosensors in support of EU Directives**. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, n. 2, p. 170-185, 2009.
FILHO, O. F.; CAPELATO, M. D. **Biossensores**. *Química Nova*, v. 15, p. 28, 1992.

FISHER, A. C. **Electrode Dynamics**. *Oxford Chemistry Primers*, p. 96, 1996.

FRASCONI, M.; FAVERO, G.; TORTOLINI, C.; MAZZEI, F. **Bioelectrochemical Characterization of Horseradish and Soybean Peroxidases.** *Electroanalysis*, v. 21, n. 21, p. 2378-2386, 2009.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. **Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos**. *Quimica Nova*, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.

GAO, W.; SONG, J.; WU, N. **Voltammetric behavior and square-wave voltammetric determination of trepibutone at a pencil graphite electrode**. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 576, p. 1–7, 2005.

GHINDILIS, A. L.; ATANASOV, P.; WILKINS, E. **Enzyme-catalyzed direct electron transfer: fundamentals and analytical applications**. *Electroanalysis*, v. 9, n. 9, p. 661-674, 1997.

GILMARTIN, M. A.; HART, J. P**. Sensing with chemically and biologically modified carbon electrodes**. *Analyst*, v. 120, p. 1029, 1995.

GUILBAULT, G. G. **Handbook of enzymatic methods of analysis**. *Marcel Dekker*, New York, 1976, 4° edição.

HABERMÜLLER, K.; MOSBACH, M.; SCHUHMANN, W. **Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors**. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 366, p. 560–568, 2000.

HEJAZI, M. S.; POURNAGHI-AZAR, M. H.; ALIPOUR, E.; KARIMI, F. **Construction, electrochemically biosensing and discrimination of recombinant plasmid (pEThIL-2) on the basis of interleukine-2 DNA insert**. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 23, n. 11, p. 1588-1594, 2008.

HELLER, A. **Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes**. *The Journal of Physical Chemistry*. v. 96, p. 3579, 1992.

HONG, J.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; AKBAR, A.; GHOURCHIAN, H.; RAD, A. M.; REZAEI-ZARCHI, S. **Direct electron transfer of horseradish peroxidase on Nafion-cysteine modified gold electrode**. *Electrochimica Acta*, v. 52, p. 6261–6267, 2007.

HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. **Chemical sensors: definitions and classification**. *Pure and Applied Chemistry*, v. 63, p. 1247, 1991.

JIA, J.; WANG, B.; WU, A.; CHENG, G.; LI, Z.; DONG, S. **A Method to Construct a Third-Generation Horseradish Peroxidase Biosensor: Self-Assembling Gold Nanoparticles to Three-Dimensional Sol−Gel Network**. *Analytical Chemistry*, v. 74, n. 9, p. 2217–2223, 2002.

JOHNSON, D.L.; MAXWELL, C.J.; LOSIC, D.; SHAPTER, J.G.; MARTIN, L.L. **The influence of promoter and of electrode material on the cyclic voltammetry of *Pisum sativum* plastocyanin**. *Bioelectrochemistry*, v. 58, n. 2, p. 137-147, 2002.

KARA, P.; CAVDAR, S.; MERIC, B.; ERENSOY, S.; OZSOZ, M. **Electrochemical probe DNA design in PCR amplicon sequence for the optimum detection of microbiological diseases**. *Bioelectrochemistry*, v. 71, n. 2, p. 204-210, 2007.

KARA, P.; MERIC, B.; ZEYTINOGLU, A.; OZSOZ, M. **Electrochemical DNA biosensor for the detection and discrimination of herpes simplex Type I and Type II viruses from PCR amplified real samples**. *Analytica Chimica Acta*, v. 518, p. 69–76, 2004.

KARA, P.; ERDEM, A.; GIROUSI, S.; OZSOZ, M. **Electrochemical detection of enzyme labeled DNA based on disposable pencil graphite electrode**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 38, p. 191–195, 2005.

KLEI, H. E.; SUNDSTROM, D. W.; SHIM, D. **Immobilization of enzymes by microencapsulation**. Woodward. *Immobilized cells and enzymes: a practical approach*, p. 49, 1985.

KONASH, A.; MAGNER, E. **Electrochemically Mediated Reduction of Horseradish Peroxidase by 1,1´-Ferrocenedimethanol in Organic Solvents.** Analytical Chemistry, v. 77, n. 6, p. 1647–1654, 2005.

KOTANI, A.; MIYAGUCHI, Y.; HARADA, D.; KUSU, F. **A disposable voltammetric cell for determining the titratable acidity in vinegar**. *Analytical Sciences*, v. 19, p. 1473- 1476, 2003.

LEVENT, A.; YARDIM, Y.; SENTURK, Z. **Voltammetric behavior of nicotine at pencil graphite electrode and its enhancement determination in the presence of anionic surfactant**. *Electrochimica Acta*, v. 55, n. 1, p. 190-195, 2009.

LINDGREN, A.; EMNÉUS, J.; RUZGAS, T.; GORTON, L.; MARKO-VARGA, G. **Amperometric detection of phenols using peroxidase-modified graphite electrodes**. *Analytica Chimica Acta*, v. 347, p. 51-62, 1997.

LINDGREN, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L.; CSOREGI, E.; ARDILA, G. B.; SAKHAROV, I. Y.; GAZARYAN, I. G. **Biosensors based on novel peroxidases with improved properties in direct and mediated electron transfer**. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 15, n. 9-10, p. 491-497, 2000.

LI, J.; DONG, S. **The electrochemical study of oxidation-reduction properties of horseradish peroxidase**. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 431, n. 1, p. 19-22, 1997.

LIU, Y.; YUAN, R.; CHAI, Y.; TANG, D.; DAI, J.; ZHONG, X. **Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on gold colloid/cysteine/nafion-modified platinum disk electrode**. *Sensors and Actuators B*, v. 115, p. 109–115, 2006.

LOCAL FOODS. **Horseradish.** disponível em: http://localfoods.about.com/od/horseradish/tp/abouthorseradish.htm. Acesso: 12/01/2010

LU, Q.; CHENA, X.; WUA, Y.; HU, S. **Studies on direct electron transfer and biocatalytic properties of heme proteins in lecithin film**. *Biophysical Chemistry*, v. 117, n. 55 – 63, 2005.

LY, S.Y.; JUNG, Y. S.; KIM, M. H.; HAN, I. K.; JUNG, W. W.; SOOK, H. **Determination of Caffeine Using a Simple graphite pencil electrode with Square-Wave Anodic Stripping Voltammetry**. *Microchimica Acta*, v. 146, n. 3-4, 2004.

MAESTRE, M. S.; RODRÍGUEZ-AMARO, R.; MUÑOZ, E.; RUIZ, J. J.; CAMACHO, L. **Use of cyclic voltammetry for studying two-dimensional phase transitions: Behaviour at low scan rates**. *Journal of Electroanalytical Chemistry*,v. 373, n. 1-2, p. 31-37, 1994.

MAJIDI, M. R.; ASADPOUR-ZEYNALI, K.; HAFEZI, B. **Reaction and nucleation mechanisms of copper electrodeposition on disposable pencil graphite electrode**. *Electrochimica Acta*, v. 54, n. 3, p. 1119-1126, 2009.

MALINAUSKAS, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. **Electrochemical study of the redox dyes Nile Blue and Toluidine Blue adsorbed on graphite and zirconium phosphate modified graphite**. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 484, n. 1, p. 55-63, 2000.

MCLACHLAN, K. L.; CRUMBLISS, A. L. **The effect of an applied potential on the activity of carbonic anhydrase immobilized on graphite rods.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 37, n. 5, p. 491-496, 1991.

MENDES, R.K; CARVALHAL, R.F; KUBOTA, L.T. **Effects of different self-assembled monolayers on enzyme immobilization procedures in peroxidase-based biosensor development.** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 612, n. 2, p. 164-172, 2008.

MIRMOMTAZ, E.; ENSAFI, A.; ZAD, S. **Determination of amiloride using a ds-DNA-modified pencil graphite electrode based on guanine and adenine signals** *Electrochimica Acta*, v. 54, n. 3, p. 1141-1146, 2009.

MIYAZAKI, K.; MATSUMOTO, G.; YAMADA, M.; YASUI, S.; KANEKO, H. **Simultaneous voltammetric measurement of nitrite ion, dopamine, serotonin with ascorbic acid on the GRC electrode**. *Electrochimica Acta*, v. 44, n. 21-22, p. 3809-3820, 1999.

MUNTEANU, F. D.; LINDGREN, A.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; RUZGAS, T.; CSÖREGI, E. C.; CIUCU, A.; VAN HUYSTEE, R. B.; GAZARYAN, I. G.; LAGRIMINI, L.M. **Bioelectrochemical Monitoring of Phenols and Aromatic Amines in Flow Injection Using Novel Plant Peroxidases**. *Analytical Chemistry*, v. 70, p. 2596-2600, 1998.

MUNTEANU, F.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTINEZ, A. T.; CAVACO-PAULO, A. **Kinetics of direct and substrate-mediated electron transfer of versatile peroxidase-modified graphite electrodes**. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 580, n. 1, p. 35-40, 2005.

NAVES, A. F. **Estudo da adsorção de horseradish peroxidase (HRP) sobre superfícies planas e de sua atividade catalítica**. *Tese de doutorado*. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

NICELL, J. A.; WRIGHT, H. **A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, p. 302-310, 1997.

TAVARES, P. H.; BARBEIRA, P. J**. Influence of pencil lead hardness on voltammetric response of graphite reinforcement carbon electrodes**. *Journal of Applied Electrochemistry*, v. 38, p. 827–832, 2008.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. **Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana**. *Química Nova*, v. 29, n. 5, p. 932-939, 2006.

OLIVEIRA NETO, G.; YAMANAKA, H**. Enzimas e materiais biológicos imobilizados: biossensores**. *Química Nova*, v. 11, p. 432, 1988.

ORTEGA, F.; DOMINGUÉZ, E.; BURESTEDT, E.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; MARKO-VARGA, G. **Phenol oxidase-based biosensors as selective detection units in clumn liquid chromatography for the determination of phenolic compounds**. *Journal of Chromatography A*, v. 675, p. 65, 1994.

OZCAN, A.; SAHIN, Y.; OZSOZ, M.; TURAN, S. **Electrochemical Oxidation of ds-DNA on Polypyrrole Nanofiber Modified Pencil Graphite Electrode**. *Electroanalysis*, v. 19, n. 21, p. 2208-2216, 2007.

OZCAN, A.; SAHIN, Y. **Selective and Sensitive Voltammetric Determination of Dopamine in Blood by Electrochemically Treated Pencil Graphite Electrodes**. *Electroanalysis*, v. 21, n. 21, p. 2363-2370, 2009.

OZCAN, L.; SAHIN, Y. **Determination of paracetamol based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode**. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 127, n. 2, p. 362-369, 2007.

OZSOZ, M.; ERDEM, A.; KERMAN, K.; OZKAN, D.; TUGRUL, B.; TOPCUOGLU, N.; EKREN, H.; TAYLAN, M. **Electrochemical Genosensor Based on Colloidal Gold Nanoparticles for the Detection of Factor V Leiden Mutation Using Disposable Pencil Graphite Electrodes.** *Analytical Chemistry*, v. 75, n. 9, p. 2181-2187, 2003.

PASSOS, C. T.; BURKERT, J. F. M; KALIL, S. J.; BURKET, C. A. V. **Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de Aspergillus sp. Isolada de um solo contaminado do sul do Brasil**. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 950-954, 2009.

PERDICAKIS, M.; AUBRIET, H.; WALCARIUS, A. **Use of a Commercially Available Wood-Free Resin Pencil as Convenient Electrode for the "Voltammetry of Microparticles" Technique**. *Electroanalysis*, v. 16, n. 24, p. 2042-2050, 2004.

PEREIRA, A. C.; KUBOTA, L. T. **Otimização da preparação de eletrodo de pasta de carbono contendo riboflavina imobilizada em suporte inorgânico**. *Química Nova, v.* 27, n. 5, p. 725-729, 2004.

PEREIRA, A.C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. **Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas**. *Química Nova*, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002.

PETERSON, G.L. A **simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable**. *Analytical Biochemistry*, v. 83, n. 36, p. 356, 1977.

PETROSKI, H. **The Pencil: A History of Design and Circumstance**. New York: *Alfred A. Knopf*. p. 171, 1990.

POLÁSEK, M.; GORTON, L.; APPELVIST, R.; MARKO-VARGA, G.; JOHANSSON, G. **Amperometric glucose sensor based on glucose-dehidrogenase immobilized on a graphite electrode modified with an n,n-bis(benzophenoxazinyl) derivative of benzene-1,4-dicarboxamida**. *Analytica Chimica Acta*. v. 246, p. 283, 1991.

POPESCU, I.; ZETTERBERG, G.; GORTON,L. **Influence of graphite powder, additives and enzyme immobilization procedures on a mediatorless HRP modified carbon paste electrode for amperometric flow-injection detection of H_2O_2.** *Biosensors & Bioelectronics,* v. 10, p. 443-461, 1995.

POURNAGHI-AZAR, M. H.; AHOUR, F.; HEJAZI, M. S. **Differential Pulse Voltammetric Detection of Hepatitis C Virus 1a Oligonucleotide Chain by a Label-Free Electrochemical DNA Hybridization Biosensor Using Consensus Sequence of Hepatitis C Virus 1a Probe on the Pencil Graphite Electrode.** *Electroanalysis,* v. 21, n. 16, p. 1822-1828, 2009

PUIG, D.; BARCELÒ, D. **Determination of phenolic compounds in water and waste water**. *Trends in Analytical Chemistry,* v. 15, n. 8, p. 362-375, 1996.

RAMANAVICIUS, A.; KAUSAITE, A.; RAMANAVICIENE, A. **Potentiometric study of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase immobilized on the carbon rod electrode**. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 113, n. 1, p. 435-444, 2006.

RASUMAS, V. J.; JASAITIS, J. J.; KULYS, J**. Electrocatalysis on enzyme – modified carbon materials**. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 12, p. 297, 1984.

ROSATTO, S. S.; KUBOTA, L. T.; NETO, G. O. **Biosensor for phenol based on the direct electron transfer blocking of peroxidase immobilising on sílica-titanium**. *Analytica Chimica Acta,* v. 390, p. 65-72, 1999.

ROSATTO, S.S. **Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e sílica modificada**. *Tese de doutorado*. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. **Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental**. *Química Nova,* v. 24, n. 1, p.77-86, 2001.

RUAN, C.; YANG, F.; LEI, C.; DENG, J. **Thionine Covalently Tethered to Multilayer Horseradish Peroxidase in a Self-Assembled Monolayer as an Electron-Transfer Mediator**. *Analytical Chemistry*, v. 70, p. 1721–1725, 1998**.**

RUZGAS, T.; CSÖREGI, E. C.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; MARKO-VARGA, G. **Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application**. *Analytica Chimica Acta*, v. 330, p. 123-138, 1996.

RUZGAS, T.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; MARKO-VARGA, G. **The development of a peroxidase biosensor for monitoring phenol and related aromatic compounds**. *Analytica Chimica Acta*, v. 311, p. 245-253, 1995.

RUZGAS, T.; GORTON, L.; EMNÉUS, J.; MARKO-VARGA, G. **Kinetic models of horseradish peroxidase action on a graphite electrode**. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 391, p. 41-49, 1995.

RUSSELL, I.M.; BURTON, S. G. **Development and demonstration of an immobilized polyfenol oxidase bioprobe for the detection of phenolic pollutants in water**. *Analytica Chimica Acta*, v. 389, p. 161, 1999.

SCOUTEN, W. H.; LUONG, J. H. T.; BROWN, R. S. **Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design**. *Tibtech*, v. 13, p. 178, 1995.

SHANGGUAN, X.; ZHENG, J.; SHENG, Q. **Direct Electron Transfer of Horseradish Peroxidase in Gellan Gum-Hydrophilic Ionic Liquid Gel Film.** *Electroanalysis*, v. 21, n. 13, p. 1469-1474, 2009.

SHLEEV, S.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; KHALUNINA, A.; MOROZOVA, O.; YAROPOLOV, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. **Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes**. *Bioelectrochemistry*, v. 67, p. 115 – 124, 2005.

STOICA, L.; LUDWIG, R.; HALTRICH, D.; GORTON, L. **Third-Generation Biosensor for Lactose Based on Newly Discovered Cellobiose Dehydrogenase**. *Analytical Chemistry*, v. 78, n. 2, p. 393–398, 2006.

SUTHERLAND, R.L. **Handbook of nonlinear optics**. Nova Iorque: Ed. Marcel Dekker, 1996.

THEVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. **Electrochemical biosensors: proposed definitions and classification – synopsis of the report**. *Sensors and Actuators B*, v. 30, p.81, 1996.

VARFOLOMEEV, S. D.; KUROCHKIN, I. N. **Direct electron transfer effect biosensors.** *Biosensors & Bioelectronics*, v. 11, n. 9, p. 863-871, 1996.

VESTERGAARD, M.; KERMAN, K.; TAMIYA, E. **An electrochemical approach for detecting copper-chelating properties of flavonoids using disposable pencil graphite electrodes: Possible implications in copper-mediated illnesses**. *Analytica Chimica Acta*, v. 538, p. 273–281, 2005.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. 2. ed. Wiley-Vch. 2000.

WANG, J.; KAWDE, A. **Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization**. *Analytica Chimica Acta*, v. 431, p. 219–224, 2001.

ZAHIR, M. H.; GHANI, S. **Fabrication of directly polymerized 4-vinylpyridine onto a pencil 2B graphite paste electrode for glucose monitoring**. *Analytica Chimica Acta*, v. 354, n. 1-3, p. 351-358, 1997.

ZAKHARCHUK, N. F.; MEYER, B.; HENNING, H.; SCHOLZ, F.; JAWORKSI, A.; STOJEK, Z. **A comparative study of Prussian-Blue-modified graphite paste electrodes and solid graphite electrodes with mechanically immobilized Prussian Blue** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 398, n. 1-2, p. 23-35, 1995.

ZHANG, Y.; HE, P.; HU, N. **Horseradish peroxidase immobilized in TiO2 nanoparticle films on pyrolytic graphite electrodes: direct electrochemistry and bioelectrocatalysis**. *Electrochimica Acta*, v. 49, p. 1981–1988, 2004.

ANEXO A – *Armoracia rusticana*

Imagem 1 – Parte aérea

Imagem 2 – Raiz

ANEXO B – LIMPEZA DO BASTÃO DE GRAFITE

Imagem 1 – Primeira Limpeza

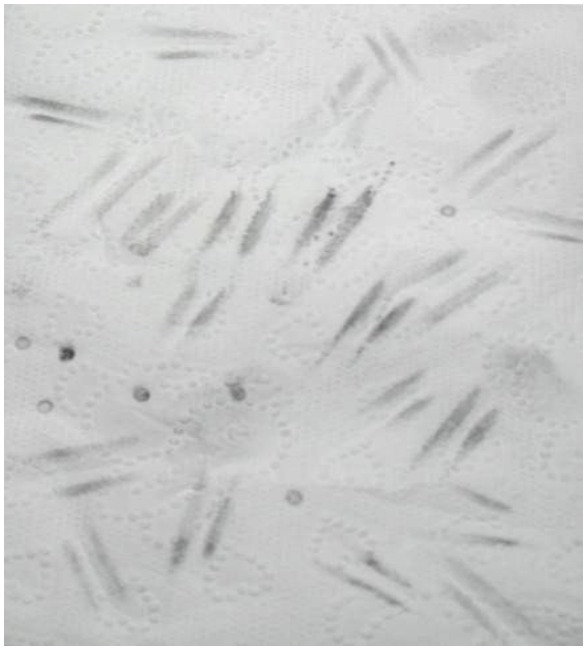


Imagem 2 – Segunda Limpeza

ANEXO C – COMPARAÇÃO ENTRE BASTÃO LIMPO E NÃO LIMPO

Bastão não limpo (esquerda); Bastão limpo (direita)