UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ALFREDO JACKSON TELLES BOSCO

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DO BIOCOMBUSTÍVEL ETANOL

> RIO DE JANEIRO 2015

Alfredo Jackson Telles Bosco

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DO BIOCOMBUSTÍVEL ETANOL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadoras: Prof^a Eliana Mossé Alhadeff - D.Sc. Prof^a Lídia Yokoyama - D.Sc.

> RIO DE JANEIRO 2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alfredo Jackson Telles Bosco

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DO BIOCOMBUSTÍVEL ETANOL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em

(Eliana Mossé Alhadeff, D.Sc., EQ/UFRJ)

(Lídia Yokoyama, D.Sc., EQ/UFRJ)

(Andrea Medeiros Salgado, D.Sc., EQ/UFRJ)

(Lívia Maria da Costa Silva, D.Sc., UFF)

(Ninoska Isabel Bojorge-Ramirez, D.Sc., UFF)

Dedico este trabalho à Deus, minha fonte de sabedoria, força e inspiração. Aos meus sobrinhos que tanto amo, Pedro, Duda e Mel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me permitir realizar mais um sonho dentre tantos que tenho realizado ultimamente;

À minha tia Márcia e aos meus irmãos Dé e Déia pelo apoio, carinho e por compreenderem minha ausência em diversos momentos;

À Tati por ceder seu lar fazendo possível a realização deste sonho, por permitir que eu fizesse parte de sua família e pela agradável companhia;

À professora Eliana Alhadeff pelos ensinamentos e orientações dispensados no desenvolvimento deste trabalho;

À NIBR pelo apoio, interação, ensinamentos técnicos e ajuda fornecida durante todo o mestrado;

À minha amiga Francisca pela grande parceria, tempo, dedicação e paciência dispensada no decorrer desse trabalho, principalmente na fase de elaboração dessa dissertação;

Aos professores e amigos Fernando Gomes e Verônica Calado pela disponibilidade, prestatividade e atenção nas inúmeras vezes em que me receberam em seus laboratórios;

Ao André, à Dafne e à Paula por estarem sempre dispostos a me socorrer nos momentos críticos dos experimentos, cedendo seus equipamentos e compartilhando seus conhecimentos;

Ao Victor Mello pelo auxílio técnico durante em alguns experimentos;

À equipe do Laboratório de Sistemas Biológicos Imobilizados, Priscila, Suzana e Caio, pelos bons momentos nos últimos meses da pesquisa;

Ao CENPES pelo apoio financeiro;

À Toyobo Brasil pela doação da enzima horseradish-peroxidase;

À todos os meus amigos e familiares pelo incentivo.

Muito obrigado a todos!

" I'm a great believer in luck, and I find the harder I work, the more I have of it." Theodore Roosevelt

"The happiest moments of my life have been the few which I have past at home in the bosom of my family." Thomas Jefferson

RESUMO

BOSCO, Alfredo Jackson Telles. **Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção do biocombustível etanol**. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A presente dissertação trata do desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para medição do biocombustível etanol. O elemento de transdução foi constituído pelo compósito grafite:polianilina:epóxi onde foram imobilizadas as enzimas álcool-oxidase e horseradish-peroxidase. Foi realizado um planejamento experimental para determinar a melhor proporção entre os componentes do compósito e outro para determinar a melhor composição da solução utilizada na imobilização enzimática. Para proporcionar um biossensor mais eficiente foram sintetizadas nanopartículas de prata através do Método de Turkevich e incorporadas à mistura da matriz. A dispersão de nanopartículas foi caracterizada por espectroscopia UV-Visível baseada na varredura de comprimento de onda entre 250 e 700 nm. A caracterização térmica dos constituintes da matriz do biossensor foi realizada por Análise Termogravimétrica e por Calorimetria Exploratória Diferencial. Os eletrodos obtidos foram caracterizados por voltametria cíclica a diferentes velocidades de varredura de potencial utilizando uma solução de K₄Fe(CN)₆ 10 mM em KCI 3 M entre 0,2 e 0,75 V vs. Ag/AgCI e contra-eletrodo de platina. A caracterização morfológica da superfície do biossensor foi realizada com Microscopia Eletrônica de Varredura operando com aceleração de voltagem de 20 kV. A repetitividade dos biossensores foi examinada realizando leituras consecutivas no mesmo dia e a reprodutibilidade foi examinada realizando leituras diárias durante três dias consecutivos obtidas por voltametria de onda quadrada. Os biossensores foram testados em uma amostra do biocombustível etanol e outra amostra de meio fermentado oriundo de práticas laboratoriais da EQ-UFRJ que foram anteriormente analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. O planejamento experimental propôs que a massa da matriz do eletrodo seja composta por 25% de grafite, 40% de polianilina e 35% de resina epóxi, e que o volume da solução de imobilização enzimática seja composta por 85% de solução enzimática, 10% de albumina e 5% de glutaraldeído. O espectro de absorção da dispersão coloidal de nanopartículas de prata exibiu uma banda de absorção em

aproximadamente 400 nm, confirmando o sucesso de sua síntese. Com a caracterização térmica foi possível observar a influência das nanopartículas de prata no comportamento do compósito da matriz. A caracterização eletroquímica dos eletrodos informou que a adição de nanopartículas de prata proporcionou um aumento de 32,35% no pico de corrente catódica do biossensor e que as correntes de picos maiores e mais definidas foram as fornecidas pelo eletrodo com a composição estimada pelo planejamento experimental. A caracterização morfológica do biossensor apresentou uma grande redução do número de sulcos na sua superfície após a imobilização indicando que houve a reticulação do glutaraldeído com as enzimas imobilizadas. A repetitividade do biossensor e a reprodutibilidade da metodologia na confecção do mesmo foram consideradas satisfatórias por obter a maior variação de leitura em 4,5% e 9% respectivamente. Porém o mesmo não ocorreu com sua reprodutibilidade por manter sua funcionalidade durante apenas um dia. O biossensor desenvolvido apresento u uma precisão de 67,23% ao ser utilizado na medição do biocombustível etanol e de 82,61% ao ser utilizado na medição de meio fermentado oriundo de práticas laboratoriais da EQ-UFRJ.

Palavras-chave: Biossensor. Etanol. Álcool-oxidase. *Horseradish-peroxidase*. Polianilina. Nanopartículas de prata. Voltametria.

ABSTRACT

BOSCO, Alfredo Jackson Telles. **Development of an electrochemical biosensor for the detection of biofuel ethanol**. Rio de Janeiro, 2015. Dissertation (Master in Chemical and Biochemical Process Technology) - School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

This dissertation is about of the developing of an electrochemical biosensor for measuring biofuel ethanol. The transducing element constituted by graphite/polyaniline/Epoxy composite where alcohol oxidase and horseradish peroxidase enzymes were immobilized. An experimental design carried out to determine the best ratio between the components of the composite and the other to determine the best composition of the enzyme solution used for immobilization. To provide an efficient biosensor, silver nanoparticles were synthesized through of the Turkevich method and incorporated it into the composite. The nanoparticles dispersion was characterized by UV-Visible spectroscopy in the scanning based wavelength between 250 and 700 nm. Thermal characterization of the biosensor matrix constituents was achieved by Thermogravimetric Analysis and Differential Scanning Calorimetry. The morphological characterization of the biosensor surface was performed with Scanning Electron Microscopy. The responses of the electrodes obtained were characterized by cyclic voltammetry at different scan rates using a 10 mM K₄Fe(CN)₆ solution in KCl from 0.2 to 0.75 V vs. Ag/AgCl and platinum counter electrode. The repeatability of the biosensor was examined by performing consecutive readings on the same day and the reproducibility was examined by performing daily readings for three consecutive days obtained by square wave voltammetry. The experimental design proposed that the electrode matrix is composed of 25 mass% of graphite, 40% of polyaniline and 35% epoxy resin, and the volume of immobilized enzyme solution is comprised of 85% enzyme solution, 10% albumin and 5% glutaraldehyde. Biosensors were tested in an ethanol fuel sample and another sample of fermented medium come from laboratory practices EQ-UFRJ illustrated previously Analyzed by Liquid Chromatography of High Efficiency. The absorption spectrum of the colloidal dispersion of silver nanoparticles exhibited an absorption band at 400 nm, confirming the successful synthesis. With the thermal characterization was possible to observe the influence of silver nanoparticles in the matrix composite behavior. The electrochemical characterization of the electrodes indicated that the addition of silver nanoparticles resulted in an increase of 32.35% in the cathodic peak current and the biosensor current peaks higher and more defined by the electrode were provided with composition estimated by the experimental design. The morphological characterization of the biosensor showed a large reduction in the number of grooves on its surface after the immobilization. Indicating there was the reticulation of the glutaraldehyde with immobilized enzymes. The repeatability of the biosensor and the reproducitibility of its manufacturing methodology were considered satisfied once it presented greatest variation in 4.5% and 9%, respectively. However, this did not occur with reproducibility for maintaining its functionality for only one day. The biosensor had developed an accuracy of 67.23% when used in measuring fuel ethanol and 82.61% when used in measuring fermented medium coming from laboratory practices EQ-UFRJ.

Keywords: Biosensor. Ethanol. Alcohol oxidase. Horseradish peroxidase. Polyaniline. Silver nanoparticles. Voltammetry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Ilustração esquemática do funcionamento de um biossensor	.21
FIGURA 2: Ilustração esquemática dos métodos de imobilização enzimática	.27
FIGURA 3: Participação percentual dos estados na produção nacional de	
etanol hidratado e anidro	.39
FIGURA 4: Estrutura tridimensional da álcool-oxidase	.41
FIGURA 5: Estrutura tridimensional da horseradish-peroxidase	.42
FIGURA 6: Representação esquemática do ciclo catalítico da	
horseradish-peroxidase tendo o fenol como substrato de redução	.43
FIGURA 7: Estrutura geral da polianilina	.44
FIGURA 8: Protonação da esmeraldina	.45
FIGURA 9: Célula eletroquímica de três eletrodos	.47
FIGURA 10: Voltametria cíclica	.48
FIGURA 11: Voltametria de onda quadrada	.50
FIGURA 12: Etapas da confecção das pastilhas	.54
FIGURA 13: Método dos dois terminais para determinação da	
condutividade elétrica	.55
FIGURA 14: Eletrodo confeccionado com o compósito grafite: PANI: resina epóxi	
e suas dimensões	.56
FIGURA 15: Potenciostato e célula eletrolítica de três eletrodos	.57
FIGURA 16: Etapas da síntese e incorporação das AgNPs à mistura de	
grafite, PANI e resina epóxi	.58
FIGURA 17: Valores previstos versus valores observados da	
condutividade elétrica	.66
FIGURA 18: Gráfico de Pareto para a condutividade elétrica apresentada pelo	
compósito em função dos valores da estatística do teste <i>t</i> de Student	.67
FIGURA 19: Superfície de resposta para a condutividade elétrica apresentada pelo	
compósito em função dos pseudo-componentes da mistura	.69
FIGURA 20: Curvas de nível para a condutividade elétrica apresentada pelo	
compósito em função dos pseudo-componentes da mistura	.69

FIGURA 21: Diagrama ternário com restrição para condutividade elétrica
apresentada pelo compósito em função dos componentes grafite, epóxi e PANI70
FIGURA 22: Gráfico normal dos resíduos para os componentes do compósito71
FIGURA 23: Gráfico dos resíduos versus valores previstos para os componentes do
compósito71
FIGURA 24: Testes quantitativos da normalidade dos resíduos para os
componentes do compósito72
FIGURA 25: Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo com massa de 15% de
grafite, 30% de PANI e 55% de resina epóxi73
FIGURA 26: Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo com massa de 30% de
grafite, 45% de PANI e 25% de resina epóxi73
FIGURA 27: Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo com massa de 0% de
grafite, 60% de PANI e 40% de resina epóxi74
FIGURA 28: Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo com massa de 15% de
grafite, 45% de PANI e 40% de resina epóxi74
FIGURA 29: Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo com massa de 25% de
grafite, 40% de PANI e 35% de resina epóxi75
FIGURA 30: Curvas de correlação entre as correntes de pico catódicas e anódicas
em função da raiz quadrada da velocidade de varredura76
FIGURA 31: Feixe de luz atravessando a dispersão coloidal de AgNPs77
FIGURA 32: Espectro de absorção da dispersão de AgNPs77
FIGURA 33: Curvas TGA do compósito de PANI/grafite enriquecido com AgNPs78
FIGURA 34: Curvas DSC das amostras de grafite, grafite enriquecido com AgNPs,
PANI e PANI/grafite enriquecido com AgNPs79
FIGURA 35: Curvas DSC da amostras de PANI80
FIGURA 36: Curvas DSC do compósito PANI/grafite enriquecido com AgNPs81
FIGURA 37: Curvas DSC da amostra de grafite enriquecido com AgNPs82
FIGURA 38: Curvas DSC da dispersão de AgNPs83
FIGURA 39: Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo com AgNPs84
FIGURA 40: Curvas de correlação entre as correntes de pico anódicas e catódicas
em função da raiz quadrada da velocidade de varredura fornecidas
pelo eletrodo com AgNPs85
FIGURA 41: Voltamogramas cíclicos obtidos com os eletrodos
sem e com AgNPs86

FIGURA 42: Gráfico obtido para o cálculo da atividade enzimática	.87
FIGURA 43: Valores previstos versus valores observados da	
corrente de pico resultante	.88
FIGURA 44: Superfície de resposta para a corrente de pico resultante produzida pe	lo
eletrodo com enzimas imobilizadas em função dos	
pseudo-componentes da mistura	.90
FIGURA 45: Curvas de nível para a corrente de pico resultante produzida pelo	
eletrodo com enzimas imobilizadas em função dos	
pseudo-componentes da mistura	.90
FIGURA 46: Diagrama ternário com restrição para a corrente de pico resultante	
produzida pelo eletrodo com enzimas imobilizadas em função dos	
componentes solução enzimática, albumina e glutaraldeído	.91
FIGURA 47: Testes quantitativos da normalidade dos resíduos para os	
componentes da solução de imobilização	.92
FIGURA 48: Micrografia por MEV da superfície do eletrodo sem e	
com imobilização enzimática	.93
FIGURA 49: Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o biossensor enzimátic	;0
em diversas concentrações de etanol	.93
FIGURA 50: Curva padrão do biossensor enzimático para	
determinação de etanol	.94
FIGURA 51: Voltamogramas dos biossensores utilizados para	
avaliar a repetitividade	.96
FIGURA 52: Variação de leitura de cada biossensor para	
avaliar a repetitividade	.97
FIGURA 53: Voltamogramas dos biossensores utilizados para	
avaliar a reprodutibilidade	.98
FIGURA 54: Variação de leitura de cada biossensor para	
avaliar a reprodutibilidade	.99
FIGURA 55: Voltamogramas de onda quadrada obtido com o	
biossensor enzimático nas amostras reais1	00

LISTA DE QUADROS E TABELAS

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS	21
3.2 ELEMENTOS DE RECONHECIMENTO BIOLÓGICO	22
3.2.1 Enzimas	23
3.2.2 Antígeno/anticorpo	23
3.2.3 Quimiorreceptores	24
3.2.4 Células e tecidos	25
3.3 APLICAÇÃO DAS ENZIMAS EM BIOSSENSORES	26
3.4 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	27
3.4.1 Métodos de imobilização enzimática	27
3.4.1.1 Imobilização por adsorção física	28
3.4.1.2 Imobilização por aprisionamento físico	28
3.4.1.3 Imobilização por aprisionamento em rede polimérica	29
3.4.1.4 Imobilização por ligação covalente	29
3.4.1.5 Imobilização por ligação cruzada	30
3.4.2 Suportes de imobilização para biossensores	30
3.5 ELETRODOS PARA BIOSSENSORES	31
3.6 SISTEMAS DE TRANSDUÇÃO	31
3.6.1 Biossensores eletroquímicos	32
3.6.1.1 Biossensores amperométricos	33
3.6.1.2 Biossensores potenciométricos	34
3.6.1.3 Biossensores condutimétricos	35
3.6.2 Biossensores acústicos	35
3.6.3 Biossensores ópticos	36

3.6.4 Biossensores calorimétricos	37
3.7 ANALITO DE ESTUDO: ETANOL	37
3.8 COMPONENTES DO BIOSSENSOR CONFECCIONADO	40
3.8.1 Álcool-oxidase	40
3.8.2 Horseradish-peroxidase	41
3.8.3 Polian ilina	43
3.8.4 Nanopartículas de prata	45
3.9 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS	46
3.9.1 Voltametria cíclica	48
3.9.2 Voltametria de onda quadrada	49
CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1 EQUIPAMENTOS	52
4.2 REAGENTES	52
4.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MATRIZ DO BIOSSENSOR	53
4.3.1 Preparação dos compósitos	53
4.3.2 Determinação da condutividade elétrica	54
4.4 CONFECÇÃO DOS ELETRODOS	55
4.5 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS	56
4.6 INCORPORAÇÃO DAS AgNPs AO COMPÓSITO	57
4.7 CARACTERIZAÇÃO DA DISPERSÃO DE AgNPs	58
4.8 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DOS CONSTITUINTES	
DA MATRIZ DO BIOSSENSOR	59
4.9 TRATAMENTO E PREPARO DA HRP	60
4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	60
4.11 APLICAÇÃO DA VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA	61
4.12 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE IMOBILIZAÇÃO	
ENZIMÁTICA	61
4.13 CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DO ELETRODO	62
4.14 CURVA PADRÃO DO BIOSSENSOR ENZIMÁTICO	63
4.15 REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE DO BIOSSENSOR	63
4.16 UTILIZAÇÃO DO BIOSSENSOR EM AMOSTRAS REAIS	63

CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MATRIZ DO BIOSSENSOR	65
5.1.1 Análise estatística da determinação da composição da	
matriz do biossensor	65
5.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS SEM AgNPs	72
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA DISPERSÃO DE AgNPs	76
5.4 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DOS CONSTITUINTES DA MATRIZ DO	
BIOSSENSOR	78
5.5 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO ELETRODO COM AgNPs	83
5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA HRP	86
5.7 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE IMOBILIZAÇÃO	
ENZIMÁTICA	87
5.7.1 Análise estatística da determinação da composição da	
solução de imobilização enzimática	88
5.8 CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DO ELETRODO	92
5.9 CURVA PADRÃO DO BIOSSENSOR ENZIMÁTICO	93
5.10 REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE DO BIOSSENSOR	95
5.11 UTILIZAÇÃO DO BIOSSENSOR EM AMOSTRAS REAIS	99
CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES	102
CAPÍTULO 7: SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

O biossensoramento é um tema de grande relevância, tanto na área científica quanto na área tecnológica, dado o seu potencial em diversas aplicações como diagnóstico médico, cuidados de saúde, meio ambiente, energia, segurança alimentar e outros. Dessa forma, a detecção específica e sensível de substâncias em curto espaço de tempo desempenha um papel primordial em diveros processos. (BANULS; PUCHADES; MAQUIEIRA, 2013).

O monitoramento contínuo e o controle em processos exige o domínio de métodos analíticos confiáveis simples, rápidos, que minimizem o consumo de reagentes e, consequentemente, a geração de resíduos. O monitoramento contínuo também visa a detecção rápida de anormalidades e adoção de ações corretivas. (RIBEIRO; ROCHA, 2013).

Um sensor químico é um dispositivo que transforma uma informação química, variando desde a concentração de um componente específico da amostra até a análise da composição total, num sinal analiticamente útil. Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) um biossensor é um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica, quantitativa ou semi-quantitativa através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que está em contato direto com o elemento de transdução (SILVA, 2011). Diversas biomoléculas têm sido aplicadas como elementos sensoriais, tais como enzimas, anticorpos, receptores, organelas, micro-organismos, células e tecidos de animais e plantas. Dentre estes biocomponentes, as enzimas são os mais amplamente utilizados na confecção dos biossensores. (KARIM; FAKHRUDDIN, 2012).

Muitos eletrodos, polímeros, sol-gels, nanomateriais e monocamadas automontadas têm sido usados para obter biossensores enzimáticos. Os materiais compósitos à base de polímeros condutores, mediadores redox, nanopartículas metálicas e nanocompósitos têm sido utilizados para combinar as propriedades dos componentes individuais com um desempenho sinérgico na fabricação de biossensores. (CEVIK; SENEL; ABASIYANIK, 2012).

A imobilização de enzimas é um passo decisivo na construção dos biossensores. A escolha do método de imobilização depende principalmente da enzima a ser imobilizada, do suporte utilizado para imobilização e do mecanismo de

transdução. O uso da técnica de imobilização de enzimas em processos onde atuam como agentes de catálise, seja na biotransformação ou em análise qualitativa e quantitativa possui muitas vantagens, tais como: boa estabilidade térmica e operacional, capacidade de reutilização, utilização contínua, facilidade de separar a enzima do seu produto e redução do custo operacional. Como principal desvantagem uma possível perda da atividade enzimática durante a imobilização. (ERDEN; KILIC, 2013).

Devido às possíveis toxidades desses novos materiais, são necessários estudos mais abrangentes e profundos relacionados tanto à saúde humana quanto para o meio ambiente. Um exemplo dessa toxidade são os nanomateriais que podem conter em sua composição diversos metais pesados e, além disso, existe o fato desses nanomateriais poderem interagir fortemente com o ambiente em que se encontram, comprometendo o funcionamento do biossensor. (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

O mercado para biossensores enzimáticos vem aumentando devido, principalmente, ao desenvolvimento de novas tecnologias de construção, de metodologias mais evoluídas e modernas de imobilização de biomoléculas e de micro-organismos geneticamente modificados. Com isso, dependendo da aplicabilidade, os biossensores vêm apresentando uma precisão cada vez maior, e consequentemente, proporcionando um monitoramento biossensorial aprimorado, que permite o reconhecimento de concentrações muito baixas de analitos em sistemas de detecção de elevada acurácia e sensitividade. (SUSANTO *et al.*, 2013).

A medição do etanol é necessária em muitas aplicações, como em fermentadores, indústria alimentar, farmacêutica, médica e, em geral, em toda a indústria onde é um solvente amplamente utilizado. Todas estas aplicações têm necessidades diferentes, incluindo sensibilidade, limite de detecção, tempo de ensaio, custos, etc. Existem vários métodos para a determinação de etanol, incluindo sensores de gás, cromatografia líquida e gasosa, espectroscopia Raman e de massa, polarografia e sensores eletroquímicos. No entanto, estes métodos são demorados ou exigem o uso de instrumentação dispendiosa, sendo grande a necessidade por métodos mais rápidos, simples, de baixo custo e confiáveis para a determinação deste analito. (SHARMA; QUANTRILL, 1994).

A utilização de enzimas na confecção de biossensores, para análise de etanol em amostras complexas, tem se tornado uma alternativa interessante por apresentar um menor gasto em pré-tratamentos além do aumento da especificidade. A enzima álcool-oxidase é geralmente utilizada imobilizada para confecção dos biossensores eletroquímicos, monitorando o consumo de O₂ ou a produção de H₂O₂. Esta enzima oxida álcoois de baixo peso molecular aos seus aldeídos correspondentes utilizando como receptor de elétrons o oxigênio molecular. (HERSZENHAUT, 2013).

Para a apresentação do trabalho desenvolvido, essa dissertação foi dividida na seguinte forma: No Capítulo 1, foi apresentado a introdução com os aspectos gerais relacionados ao tema do trabalho, com um breve apanhado da motivação do mesmo. No Capítulo 2 estão apresentados o objetivo geral e os específicos visando a construção de um biossensor eletroquímico para detecção de etanol. No Capítulo 3 o estado da arte foi abordado visando justificar a proposta desta dissertação. No Capítulo 4 estão descritos os materiais e as metodologias utilizados na execução dos experimentos visando a caracterização do compósito, da imobilização e avaliação de desempenho do dispositivo desenvolvido. No Capítulo 5 são apresentados os resultados e discussões comparativas com os dados encontrados na literatura. No Capítulo 6 estão reportadas as conclusões obtidas neste trabalho. No Capítulo 7 estão apresentadas sugestões de trabalhos futuros visando possíveis investigações de variáveis que possam aprimorar a performance do eletrodo. E por último estão listadas as referências consultadas e citadas ao longo desta dissertação.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho consiste em desenvolver um biossensor para determinação de biocombustível etanol, utilizando a enzima álcool-oxidase em conjunto com a enzima *horseradish-peroxidase*, empregando o método amperométrico como técnica de transdução eletroquímica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Otimizar o desempenho do biossensor eletroquímico para detecção do biocombustível etanol desenvolvido por Southgate (2011) com o intuito de aumentar a sensibilidade para quantificação de faixas menores de concentração de etanol;

 Determinar a formulação do compósito preparado à base de grafite, polianilina e resina epóxi que permita gerar os melhores sinais de resposta eletroquímica e de condutividade elétrica;

 ✓ Sintetizar nanopartículas de prata a serem incorporadas na matriz do biossensor;

 ✓ Caracterizar o compósito com as nanopartículas de prata incorporadas na matriz, quanto a natureza do sinal de resposta eletroquímica gerada;

✓ Determinar composição do preparado bienzimático contendo em sua formulação as enzimas álcool-oxidase e *horseradish-peroxidase* que gera o melhor sinal de resposta eletroquímico;

✓ Caracterizar o biossensor desenvolvido quanto à sua morfologia, repetitividade, reprodutibilidade e confiabilidade.

CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS

Os biossensores de forma geral são definidos como dispositivos de detecção que incorporam um elemento biológico que traduz os parâmetros de um sistema para um sinal físico, conforme ilustrado na Figura 1. Os biossensores permitem realizar diagnósticos seletivos e podem ser aplicados na avaliação qualitativa e quantitativa de diversas substâncias de interesse. A partir da década de 1950, os biossensores enzimáticos passaram a ser explorados comercialmente com o desenvolvimento de uma tira teste para análises simples de soluções. (FREE; FREE, 2003).



FIGURA 1: Ilustração esquemática do funcionamento de um biossensor. Fonte: ARYA; DATTA; MALHOTRA, 2008.

O sinal de resposta pode ser proveniente de uma reação química do analito ou de uma propriedade físico-química do sistema investigado. Um biossensor eletroquímico é uma subclasse dos sensores químicos constituído por transdutores eletroquímicos a uma elevada especificidade dos processos de reconhecimento biológico (enzimas, anticorpos, proteínas, ácidos nucléicos, células e tecidos ou receptores). Estes sensores reagem seletivamente com o analito alvo e produzem sinais elétricos relacionando com a concentração do analito, apresentando alta sensibilidade e baixos limites de detecção, sendo atualmente uma das áreas mais ativas da pesquisa em química analítica. (PRAKASH *et al.*, 2013). O primeiro exemplo desta técnica foi a combinação da enzima glicose-oxidase e um eletrodo de oxigênio, que mede a glicose através da detecção da redução do oxigênio quando a oxidação de glicose é catalisada pela enzima. (CLARK; LYONS, 2002).

Os biossensores eletroquímicos oferecem várias vantagens distintas, entre elas são a possibilidade de atender em miniatura, rentabilidade, baixa exigência energética e utilização em diversas aplicações. No desenvolvimento dos biossensores eletroquímicos, a etapa de transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo tem sido um grande desafio, mas mediadores químicos ou biológicos, como as enzimas peroxidases, vem sendo utilizadas para melhorar a transferência de elétrons na concepção de biossensores. (AHMADALINEZHAD; CHEN, 2011).

Nos biossensores eletroquímicos enzimáticos, os eletrodos (sejam eles eletrodo de trabalho, eletrodo de referência ou contra-eletrodo) se comportam como transdutores, que convertem as informações oriundas de um determinado material biológico em um sinal elétrico. O fenômeno de biorreconhecimento e a reação redox ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho, onde está sobreposta a camada do biocatalisador. (LI *et al.*, 2013).

Os biossensores enzimáticos são afetados pelo pH, força iônica, íons de metais pesados e inibidores orgânicos, além de muitos perderem a atividade a partir de 50°C. Há uma necessidade de desenvolver técnicas de imobilização de biomoléculas para os biossensores que permitem a utilização nestes ambientes, ou o desenvolvimento de enzimas artificiais que irão superar os problemas apresentados pelas moléculas complexas. (ROE, 2002).

3.2 ELEMENTOS DE RECONHECIMENTO BIOLÓGICO

Para que um componente possa atuar como elemento de reconhecimento biológico é necessário atender a alguns requisitos, como (SILVA, 2011):

- Ter disponível um sítio ativo a reagir com o analito;
- Manter a estabilidade no meio e nas condições de medição;
- Capacidade de imobilização sem grandes perdas no desempenho.

Dessa forma, componentes como enzimas, antígeno/anticorpo, quimiorreceptores, DNA, células e tecidos são exemplos de elementos biológicos utilizados como elementos de reconhecimento, considerados adequados para aplicação na confecção dos biossensores, como descrito a seguir:

3.2.1 Enzimas

As enzimas têm sido utilizadas nos últimos 20 anos para confecção do tipo de biossensor mais disponível comercialmente, os biossensores enzimáticos. Na maioria dos casos, a enzima não interage diretamente com o eletrodo, mas a proximidade da enzima permite que o eletrodo detecte um subproduto da reação enzimática. Diversos biossensores foram preparados utilizando enzimas naturais, enzimas artificiais e sistemas de enzimas isoladas a partir de células bacterianas e de tecidos de plantas ou animais. (AZEVEDO, 2005; RECHNITZ, 2008; ROE, 2002).

Em qualquer uma das variações dos biossensores enzimáticos, a interação do analito com a camada biocatalítica leva a formação de um produto que pode ser interpretado pelo transdutor e transformado em sinal de resposta, que pode ser elétrico, ótico ou calorimétrico. Estes produtos podem ser monitorados para detectar qualitativamente e quantificar diretamente um composto na amostra utilizando um transdutor de sinal. Processos catalisados por enzimas de oxirredução, que atuam na transferência de elétrons, foram acoplados para muitos tipos de transdutores na construção de biossensores. (KAMPFRATH; HINTSCHE, 2009).

Há biossensores que utilizam enzimas artificiais com uma vida útil estável por pelo menos 6 meses, sem o uso de co-fatores adicionais. Essas enzimas artificiais (*synzymes*) são cadeias de polímeros sintéticos com grupos funcionais que imitam a atividade biocatalítica de enzimas naturais utilizando a poli(etilenimina) parcialmente quaternizada, onde 10% em massa dos resíduos são conservados como aminas primárias. A *synzyme* desenvolvida catalisa a descarboxilação do oxalacetato e usa um eletrodo de CO₂ como transdutor. (HO; RECHNITZ, 2007).

3.2.2 Antígeno/anticorpo

Os anticorpos também são bons candidatos para elementos de reconhecimento em biossensores. Eles podem ser produzidos pela maioria das

biomoléculas, drogas, vírus e materiais celulares com capacidade de se ligar seletivamente a antígenos com uma sensibilidade elevada. (ROE, 2002).

Os eletrodos potenciométricos podem ser acoplados com reações anticorpo/antígeno, onde o antígeno é quimicamente ligado a um veículo que pode alterar o potencial de um modo seletivo. Enzimas ou ionóforos marcados com um antígeno são frequentemente usados para mediar a reação. A reação do antígeno com o anticorpo modula as propriedades portadoras e, portanto, altera o potencial. Este eletrodo pode ser reutilizável baseando-se no fato de que o antígeno de baixo peso molecular poder passar através de membranas porosas, enquanto o anticorpo volumoso é preso no dispositivo sensor. Tais sensores são limitados a antígenos de baixo peso molecular, tais como os de dinitrofenol ou digoxina, e para sistemas de antígeno/anticorpo que são rapidamente reversíveis, apresentando problemas com interferências não específicos em fluidos biológicos. (MONROE, 2006).

3.2.3 Quimiorreceptores

Os quimiorreceptores são conjuntos biomoleculares de células que compõem os sentidos químicos como olfato, paladar e outras funções fisiológicas. Rechnitz (2008) desenvolveu o uso de quimiorreceptores como biossensores, com estruturas intactas de crustáceos e peixes, para detectar produtos químicos que variam de sais e aminoácidos à esteróides e feromônios. Como esses organismos aquáticos vivem em água doce ou salgada, eles possuem um aparato fisiológico necessário para detecção do meio em que vivem e, portanto, são excelentes candidatos para biossensores de materiais dissolvidos.

Porções das pequenas antenas de detecção do caranguejo azul, o *Callinectes sapidus*, atuaram como elementos de reconhecimento de aminoácidos, unindo as fibras nervosas quimiorreceptoras a um eletrodo de uma micropipeta. Foram detectadas concentrações de aminoácidos excitatórios, como ácido caínico e ácido quisquálico, em concentrações tão baixas como 10⁻¹⁵ M. A interação da biomolécula estimulante com o local quimiorreceptor produz picos elétricos que percorrem através do nervo celular cuja frequência é uma função da concentração do estimulante. O disparo desse pico elétrico e seu restabelecimento em repouso tem um tempo de resposta de 2 a 3 milissegundos apenas. No entanto, as antenas

desse caranguejo não respondem quantitativamente, provavelmente por causa de outros receptores e reguladores. (BUCH; RECHNITZ, 2009).

Diversas limitações permeiam o uso dos quimiorreceptores em biossensores de forma comercial, devido aos custos de produção em grande escala, dificuldades de reprodução, embalagens, armazenagem e manutenção. Estes sistemas podem ter fraca seletividade, não só porque os receptores são geralmente seletivos para classes de compostos químicos específicos, mas também por causa da presença de uma variedade de diferentes receptores no mesmo tecido. Além das dificuldades enumeradas, há a dificuldade em fazer a interface com os sistemas de transdutores para manter a estabilidade mecânica e boas características funcionais. (OHASHI; TAMIYA; KARUBE, 2000).

3.2.4 Células e tecidos

Outra tendência importante nesta área é a utilização de células e tecidos como alternativas biocatalíticas para enzimas isoladas. A vantagem principal desses materiais é que as enzimas existentes no seu ambiente natural contam com a sua estabilidade incorporada ao componente. Nenhuma evidência direta foi apresentada mostrando que as células e tecidos são realmente mais estáveis do que os preparados de enzimas em laboratório, mas vidas úteis de 30 a 60 dias foram atingidas por certos biossensores celulares, enquanto os seus homólogos de enzimas isoladas duraram apenas alguns dias. Estes sistemas celulares também demonstraram serem altamente seletivos na sua resposta a uma vasta variedade de analitos. (GLAZIER; RECHNITZ, 2009).

A literatura reporta pesquisas realizadas com tecidos celulares de plantas e animais. Glaizer e Rechnitz (2009) utilizaram a incorporação de caule de beterraba moída com pasta de grafite na ponta de um eletrodo de H₂O₂ para determinar oxalato. O H₂O₂ gerado pela degradação enzimática do oxalato foi monitorado com um limite de detecção de 10⁻⁴ M e um tempo de resposta inferior a 1 minuto. Uma vez que a oxalato-oxidase também é encontrada em cascas de banana, musgos e mudas de cevada, estes também podem ser usados. Outro exemplo é um biossensor de banana que pode medir o neurotransmissor dopamina, quando acoplado a um eletrodo de oxigênio. A reação de escurecimento da banana converte a dopamina à melanina consumindo oxigênio. Outros exemplos de aplicação de

tecidos de células animais e vegetais que podem ser citados são: folhas de espinafre para catecol, pétala de flor de magnólia para medições de aminoácidos, folhas de salsa para medir aminoácidos e uréia, bexiga de sapo para vasopressina, repolho para a vitamina C, e outros. (KARUBE *et al.*, 2009; SATO; CHIKYU; KOBAYAKAWA, 2009).

3.3 APLICAÇÃO DAS ENZIMAS EM BIOSSENSORES

As enzimas são os componentes biológicos mais utilizados em estudos de desenvolvimento de biossensores, pois uma grande variedade se adequam às características necessárias para atuar como elementos de reconhecimento e frequentemente suas propriedades catalíticas e a especificidade em relação ao substrato podem ser modificados por meio da engenharia de proteínas. As enzimas tem sido utilizadas como elemento biológico de reconhecimento na construção de biossensores, devido à sua elevada especificidade possibilitando o desenvolvimento de metodologias analíticas de elevada acurácia (relação de proximidade entre o resultado alcançado e o real valor da grandeza mensurada). Os biossensores enzimáticos possuem várias vantagens, dentre elas a capacidade de modificar as propriedades catalíticas ou a especificidade do substrato por meio da engenharia genética e o poder de amplificação catalítica de resposta do biossensor pela modulação da atividade enzimática em relação ao analito alvo. (KARIM; FAKHRUDDIN, 2012). Huseyin e outros (2007) reportaram a importância da aplicação de enzimas em metodologias analíticas, ressaltando que associado ao fato da melhoria considerável da especificidade no reconhecimento do analito há uma redução do custo total da análise, devido a despesas com o pré-tratamento da amostra.

Eletrodos enzimáticos baseados em câmara para a medição de glicose e de lactato foram descritos por Schneider, Hill e Prohaska (2000). Eles propuseram que as estruturas do tipo câmara seriam bem adequadas para a fabricação de biossensores miniaturizados, pois o volume definido proporciona um espaço para imobilizar biocatalisadores em estreita proximidade com o eletrodo de uma forma reprodutível. Estudos que utilizam glicose-oxidase e lactato-oxidase, imobilizadas em gel de agarose, colocadas num eletrodo de oxigênio do tipo câmara, exibiram tempos de resposta de 10 segundos, porém os estudos de reprodutibilidade não foram relatados.

3.4 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A imobilização enzimática surge neste contexto devido às vantagens de seu uso múltiplo e repetitivo, além do produto da reação não estar contaminado com a enzima. A enzima imobilizada tem um tempo de vida mais longo e taxa de decaimento previsível. (HUSEYIN *et al.*, 2007).

3.4.1 Métodos de imobilização enzimática

Existem diferentes alternativas no que diz respeito à imobilização na confecção de biossensores. Os principais métodos utilizados são os métodos físicos (adsorção física, aprisionamento físico em gel e aprisionamento em rede polimérica) e métodos químicos (ligação covalente e ligação cruzada) como apresentado na Figura 2. (ADELOJU; LAWAL, 2011).



FIGURA 2: Ilustração esquemática dos métodos de imobilização enzimática: a) Imobilização por adsorção física, b) Imobilização por aprisionamento físico, c) Imobilização por aprisionamento em rede polimérica, d) Imobilização por ligação covalente e e) Imobilização por ligação cruzada. Fonte: ADELOJU; LAWAL, 2011.

A imobilização enzimática pode ser uma das etapas cruciais na concepção de um biossensor e é um dos mais importantes, pois geralmente é nessa fase que o tempo de resposta, a estabilidade enzimática e o tempo de vida do sensor são projetados. (KAMPFRATH; HINTSCHE, 2009).

3.4.1.1 Imobilização por adsorção física

A adsorção física é o método mais antigo e mais simples para a imobilização enzimática, onde a retenção da biomolécula no suporte (Figura 2a) ocorre devido a forças de ligação fracas, tais como forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. No entanto, estas forças de ligação são susceptíveis a mudanças de pH, temperatura e força iônica. A estabilidade operacional e armazenamento dos biossensores baseados em enzimas adsorvidas não é muito satisfatória devido à sua dessorção. (ERDEN; KILIC, 2013).

3.4.1.2 Imobilização por aprisionamento físico

As enzimas podem ser imobilizadas por aprisionamento físico em gel, polímero ou matrizes de pasta de carbono, geralmente aumentando a estabilidade do biossensor. A possibilidade de perda das enzimas a partir da matriz são os principais inconvenientes deste método. (AHMADALINEZHAD; CHEN, 2011).

A polimerização eletroquímica (ou eletropolimerização) consiste na aplicação de um potencial, ou corrente, ao transdutor embebido numa solução aquosa contendo as enzimas e moléculas monômeras. A oxidação dos monômeros dá origem a um radical catiônico que reage com um segundo radical catiônico ou com um monômero neutro a fim de obter um dímero que é então oxidado formando um polímero na superfície do eletrodo. As moléculas de enzimas que estão presentes na vizinhança imediata da superfície do eletrodo são incorporadas fisicamente dentro da rede de polímero em crescimento (Figura 2b). (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012).

3.4.1.3 Imobilização por aprisionamento em rede polimérica

Na imobilização por aprisionamento em rede polimérica as enzimas são encapsuladas por uma rede polimérica (Figura 2c). Um exemplo dessa imobilização foi relatado por Sassolas, Blum e Leca-Bouvier (2012) que utilizaram o poli(2-hidroxietil acrilato) como fase hidrofílica e o polidimetilsiloxano como a fase hidrofóbica constituindo um procedimento de aprisionamento anfifílico. A enzima *horseradish-peroxidase* e o diamônio 2 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) foram co-imobilizados nesta matriz, com base nas propriedades de expansão dos polímeros, que depende da polaridade do solvente e de cada fase. O ABTS e a enzima se difundem da solução hidrofílica para a fase hidrofílica expandida da rede. Após secagem, há redução de tamanho da matriz polimérica e retenção do reagente indicador (ABTS) e da enzima em ambiente hidrofílico.

3.4.1.4 Imobilização por ligação covalente

A imobilização por ligação covalente envolve a formação de uma ligação forte e estável entre os grupos funcionais das enzimas e do suporte (Figura 2d). A superfície do suporte é geralmente ativada com reagentes multifuncionais, tais como o glutaraldeído, cloreto de tosila, carbonildiimidazol e carbodiimida, seguido pelo acoplamento da enzima na superfície ativada. Na ligação covalente a força da ligação é muito forte, não ocorrendo a liberação da enzima do suporte. No entanto, a baixa reprodutibilidade é a principal limitação dos biossensores baseados em ligações covalentes. Devido à dificuldade no direcionamento de grupos funcionais envolvidos na formação da ligação covalente, pode ser observada uma diminuição da atividade da enzima imobilizada como consequência de modificação da estrutura tridimensional da enzima e/ou do sítio catalítico, ou mesmo do bloqueio definitivo deste e consequente impedimento do acesso do analito ao centro catalítico da enzima. (ERDEN; KILIC, 2013).

Enzimas contendo tiol podem ser imobilizadas diretamente sobre a superfície do ouro devido à forte afinidade entre estes. As principais vantagens desta técnica são a simplicidade e a ligação forte e estável da biomolécula. As enzimas podem ser modificadas utilizando o reagente de Traut para substituir os grupos aminos primários das enzimas com grupos tiol que são ligados de forma covalentemente a um eletrodo de ouro. (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012).

3.4.1.5 Imobilização por ligação cruzada

A imobilização por ligação cruzada envolve a formação de uma ligação forte e estável entre as enzimas por meio de seus grupos funcionais (Figura 2e). A imobilização por ligação cruzada utilizando reagentes bifuncionais, como o glutaraldeído ou a carbodiimida, é outro método eficaz e amplamente utilizado para a imobilização enzimática. Sua principal limitação é a possibilidade de perdas de atividade devido a uma distorção da conformação da enzima e alterações químicas no sítio ativo promovidas pelos reagentes bifuncionais. (ERDEN; KILIC, 2013). Esse método tem atraído diversos interesses devido à sua simplicidade para imobilização direta de enzimas em vários tipos de eletrodos. (ADELOJU; LAWAL, 2011).

3.4.2 Suportes de imobilização para biossensores

Uma variedade de material sintético, assim como materiais poliméricos naturais, tem sido utilizada na imobilização enzimática para a preparação de biossensores. Dentre os materiais naturais, os de origem proteica têm se mostrado promissores neste sentido. A membrana da cebola, por exemplo, já proporcionou sua aplicação em biossensores assim como a membrana da casca de ovo, que também é um material natural, essencialmente constituído por fibras de proteína, tendo flexibilidade na solução aquosa e possuindo uma excelente permeabilidade a gás e água. (D'SOUZA *et al.*, 2013).

Ao escolher o material de suporte, devem ser cumpridos alguns critérios básicos: o suporte deve possuir estabilidade mecânica suficiente para suportar o esforço físico, deve oferecer boas e constantes propriedades de fluxo e o material do suporte não deve ter nenhuma atividade catalítica ou tendência a interagir com a amostra, perturbando as medições. (YAKOVLEVA; BHAND; DANIELSSON, 2013).

3.5 ELETRODOS PARA BIOSSENSORES

Baixa sensibilidade, baixa seletividade e envenenamento da superfície devido a intermediários adsorvidos são algumas das desvantagens apresentadas por diversos eletrodos. Os eletrodos de compósitos modificados com nanopartículas metais-polímeros podem evitar esses problemas, que são as suas características atraentes como sensores e biossensores eletroquímicos. A seletividade de um biossensor eletroquímico depende do elemento de reconhecimento, da matriz hospedeira e da interação entre eles. Os compósitos de nanopartículas metaispolímeros são adequados para atingir a sensibilidade e estabilidade adequada, pois as nanopartículas metálicas atuam como mediador redox de biomoléculas e os polímeros atuam como adsorvente seletivo para biomoléculas. (PRAKASH *et al.*, 2013).

Diversas técnicas baseadas na utilização de nanomateriais para aplicação em biossensores têm se mostrado promissoras e eficazes. Materiais como TiO₂, MnO₂, Fe₃O₄, ZnO e outros filmes nanoestruturados têm sido usados para montar uma nova geração de biossensores para a detecção de H₂O₂ e também compostos biológicos, tais como o ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, ácido ascórbico, guanina, L-tirosina, acetaminofeno, e β -NADH. (YAGATI *et al.*, 2013).

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas têm recebido grande atenção como nanomateriais. Suas principais vantagens são o reforço da taxa de transferência de elétrons, excelente condutividade elétrica, redução da contaminação da superfície do eletrodo, alta resistência mecânica e boa estabilidade, reduzindo a necessidade do uso de grandes quantidades de analitos, mas ainda precisam ser mais explorados para melhorar sua sensibilidade e eficiência para aplicação em biossensores. (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

3.6 SISTEMAS DE TRANSDUÇÃO

Entende-se por transdutores todo dispositivo capaz de transformar uma espécie de energia numa outra qualquer. No que diz respeito à instrumentação elétrica, diz-se que são equipamentos que convertem uma grandeza física, que não seja elétrica, em um sinal elétrico mensurável. Em se tratando de biossensores, os transdutores são capazes de converter o produto de uma reação biológica num sinal

elétrico quantificável e processável, capaz de informar quantitativamente determinada substância. Os transdutores eletroquímicos são os mais comuns e mais frequentemente citados na literatura. (SILVA, 2011).

Quanto ao tipo de transdutores os biossensores podem ser classificados como eletroquímicos (compreendendo os biossensores amperométricos, potenciométricos, condutimétricos e impedimétricos), acústicos, ópticos e calorimétricos conforme o Quadro 1.

BIOSSENSORES	SISTEMAS DE TRANSDUÇÃO	MEDIÇÃO	APLICAÇÕES TÍPICAS
Eletroquímicos	Amperométrico	Corrente	Substratos enzimáticos e antígenos/anticorpos
	Potenciométrico	Voltagem	lons, gases, espécies redox
	Condutimétrico	Condutância	Reações catalizadas por enzimas
	Impedimétrico	Impedância	lmunossensores enzimáticos
Acústicos	Cristais piezoelétricos, equipamentos de superfície acústica	Variação de massa	Gases voláteis, vapores e analitos imunológicos
Ópticos	Optoeletrônicos, fibras ópticas, equipamento de ondas guiadas	Variação de Iuminosidade, índice de refração	pH, substratos enzimáticos, analitos imunológicos
Calorimétricos	Termistores, diodos	Calor	Enzima, organela, vitaminas, analitos imunológicos

QUADRO 1: Transdutores empregados em biossensores.

Fonte: SILVA, 2011.

Cada transdutor geralmente tem sua vantagem sobre os outros tipos, por isso, na prática, é a aplicação que determina um tipo de sensor sobre o outro. Os parâmetros de operação da medição irão determinar o transdutor escolhido, e nenhum sistema provou ser ideal para todos os casos. (KAMPFRATH; HINTSCHE, 2009).

3.6.1 Biossensores eletroquímicos

A transdução eletroquímica é o método mais popular usado em biossensores, muitas vezes empregando técnicas potenciométricas ou amperométricas. Em dispositivos potenciométricos a informação analítica é obtida através da conversão do processo de biorreconhecimento num sinal de potencial, ao passo que os tipos amperométricos são baseados no controle da corrente associado com a oxidação ou com a redução das espécies eletroativas envolvidas no processo de reconhecimento. (SUSANTO *et al.*, 2013).

3.6.1.1 Biossensores amperométricos

Os biossensores amperométricos são os mais atraentes devido a sua alta sensibilidade e ampla faixa linear. Assim, os eletrodos enzimáticos amperométricos mantém uma posição de liderança entre os sistemas de biossensores atualmente disponíveis. Estes dispositivos combinam a seletividade da enzima com a transdução direta da taxa da reação biocatalítica a um sinal de corrente, que permite uma determinação rápida, simples e direta de vários compostos. (SUSANTO *et al.*, 2013).

Amplamente utilizada, a amperometria baseia-se na medição de uma corrente sob um potencial fixo (controle potenciostático) ou variável (voltametria). O acoplamento eletrônico entre as enzimas redox e os eletrodos para a construção dos biosensores amperométricos baseam-se na eletroatividade da enzima com o substrato (biossensores primeira geração); utilização de mediadores redox, livres em solução ou imobilizados com a biomolécula (biossensores de segunda geração); ou transferência eletrônica direta entre a biomolécula redox e a superfície do eletrodo (biossensores de terceira geração). (SOTOMAYOR *et al.*, 2008).

Os inconvenientes com os biossensores de primeira geração, como o alto potencial aplicado por exemplo, foca sobre o uso de mediadores, que são pequenas moléculas redox (derivados do ferroceno, ferrocianeto, sais orgânicos condutores e quinonas) que podem reagir com o sítio ativo da enzima e com a superfície do eletrodo, transportando os elétrons entre a enzima e o eletrodo dando origem aos biossensores de segunda geração. O uso de mediadores tornou possível a diminuição do potencial aplicado para muitos biossensores baseados em enzimas redox. Infelizmente, esses mediadores não apenas facilitaram a transferência de elétrons entre o eletrodo e a enzima, mas facilitou também várias reações interferentes. (FRE IRE *et al.*, 2003).

Nos biossensores de terceira geração a transferência eletrônica está associada ou ocorre durante a transformação catalítica do substrato em produto. A enzima redox atua como um eletrocatalisador, facilitando a transferência de elétrons entre o eletrodo e o substrato sem envolver nenhum mediador neste processo.

Assim, este tipo de biossensor geralmente oferece melhor seletividade, pois são capazes de funcionar num intervalo de potencial mais próximo do potencial redox da própria enzima, tornando-as menos expostas à reações interferentes. Uma maior integração entre a biomolécula e a superfície do eletrodo também pode melhorar a sensibilidade deste biossensor. Uma série de estudos tem sido realizados no desenvolvimento de transferência de elétrons na interface entre as enzimas redox e eletrodos para aplicá-los como biossensores amperométricos de alto desempenho. (SADIK; MWILU; ALUOCH, 2010).

3.6.1.2 Biossensores potenciométricos

Os biossensores potenciométricos detectam a relação entre a atividade das espécies do analito e o potencial de resposta observado utilizando um sistema de dois eletrodos (eletrodo indicador e eletrodo de referência). Eletrodos de íon-seletivo com membranas poliméricas contendo veículos seletivos (ionóforos) são os sensores potenciométricos mais comumente utilizados. Eles têm sido largamente utilizados para a determinação direta vários íons orgânicos e inorgânicos em análises clínicas, ambientais e industriais. (BRATOV; ABRAMOVA; IPATO, 2010).

Em comparação com outras técnicas analíticas, os eletrodos de íon-seletivo têm algumas características únicas, como pequeno tamanho, facilidade de operação, portabilidade e baixo custo. Nos últimos anos, os eletrodos de íon-seletivo têm feito grandes progressos na melhoria do limite mínimo de detecção, explorando novos materiais para membrana, propondo novos conceitos de detecção e desenvolvendo teorias mais aprofundadas sobre as respostas potenciométricas. (YIN; QIN, 2013).

A resposta dos sensores potenciométricos é um fenômeno complexo que depende de propriedades em massa de uma membrana/filme íon-seletivo, bem como propriedades superficiais em ambos os lados da membrana regidas pela composição, termodinâmica e cinética. Diferentes modelos teóricos podem ser aplicados para obter a resposta do sensor potenciométrico. Interferências de outros íons presentes na solução são levados em conta pela introdução de coeficientes de seletividade potenciométricas. (BRATOV; ABRAMOVA; IPATO, 2010).

3.6.1.3 Biossensores condutimétricos

A condutimetria raramente é aplicada no desenvolvimento de biossensores, mas sua grande aplicabilidade é devido à observação de que quase todas as reações enzimáticas envolvem um consumo ou produção de espécies carregadas levando alterações na composição iônica da membrana enzimática. (SENILLOU *et al.*, 1999).

Esses biossensores fazem uso das mudanças na condutância que resultam a partir da geração dos produtos de uma reação catalisada por enzima. A enzima geralmente é imobilizada na superfície de um eletrodo e interações específicas com a substância a analisar dão origem a espécies que modificam a condutância da camada enzimática. Um número de enzimas são conhecidos por produzir produtos iônicos que aumentam a condutividade elétrica, mas existem também enzimas, como a glicose-oxidase, onde as espécies formadas resultam numa menor condutividade elétrica. (SOTO; JAFFARI; BONE, 2001).

São difíceis de serem realizadas medidas condutimétricas com dispositivos simples pois as medições são bastante sensíveis a variações de temperatura, além disso, as amostras não devem ser diluídas e o sinal produzido não é estável. (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002).

É interessante observar de que os biossensores condutimétricos não precisam de eletrodo de referência e a tensão conduzida pode ser suficientemente baixa para não provocar danos aos tecidos vivos, no caso de aplicações *in vivo*. No entanto, a imobilização precisa e estável das enzimas sobre a superfície dos microeletrodos interdigitados (nariz e língua eletrônica), com retenção completa da sua atividade, continua a ser um grande problema no desenvolvimento de microbiossensores. (SENILLOU *et al.*, 1999).

3.6.2 Biossensores acústicos

Os biossensores acústicos baseiam-se na piezoeletricidade dos cristais anisotrópicos como o quartzo, por exemplo. Ao aplicar uma tensão alternada ao biossensor acústico é provocada uma oscilação no cristal com uma dada frequência, que é associada à massa e às constantes elásticas deste determinado cristal. O biossensor acústico mais conhecido e antigo é a Microbalança de Cristal de Quartzo
(QCM - Quartz-Crystal Microbalance) que é útil em várias aplicações. (KRISHNAMOORTHY et al., 2008).

Nos últimos anos, os dispositivos de onda acústica de superfície (Surface Acoustic Wave - SAW) têm sido amplamente utilizados no campo bioanalítico e de biossensores devido às suas vantagens de alta sensibilidade, confiabilidade e reutilização. Os dispositivos SAW são transdutores que podem ser integrados em sistemas de micro-arranjo portáteis, tornando-os mais baratos e adequados para diversas aplicações. A maioria destes dispositivos são fabricados sobre substratos piezoelétricos comerciais tais como niobato de litio (LiNbO₃), tantalato de lítio (LiTaO₃) e quartzo. Os biossensores SAW com quartzo possuem baixos coeficientes de acoplamento eletromecânico, alta profundidade de penetração e baixa permissividade dielétrica quando se trabalha em meio líquido, enquanto os biossensores SAW de LiNbO₃ e LiTaO₃ sofrem atenuação da onda devido à excitação de ondas acústicas no cristal. (LUO, J. *et al.*, 2013).

3.6.3 Biossensores ópticos

Os sensores ópticos são mais versáteis do que os demais, pois podem ser feitos de diferentes materiais, tais como silício, vidro, metais ou polímeros e oferecem diferentes modos e arquiteturas de detecção que podem ser combinados. Eles também oferecem outras vantagens como fabricação em grande escala, excelentes propriedades físicas, boa seletividade e sensibilidade e podem realizar a detecção de várias substâncias num único dispositivo. Na detecção óptica, o modo de transdução pode ser baseado no índice de refração, absorção óptica ou espectroscopia Raman. Nas últimas duas décadas, os sensores ópticos baseados no índice de refração estavam entre os mais estudados. (BANULS; PUCHADES; MAQUIE IRA, 2013).

Em um material dielétrico comum, o índice de refração está diretamente relacionado à polarizabilidade das moléculas em comprimentos de onda ópticos. As moléculas biológicas possuem um índice de refração maior do que o ar ou a água, e diminuem a velocidade de propagação dos campos eletromagnéticos que passam por elas. Os biossensores ópticos são projetados para traduzir as mudanças na velocidade de propagação de luz através de um meio que contenha o material

biológico para um sinal quantificável proporcional à quantidade de material presente na superfície do sensor. (VIEIRA, 2006).

Diferentes fenômenos são empregados para projetar os biossensores ópticos, sendo que os métodos mais representativos incluem a ressonância de superfície de plasma, a espectroscopia de interferência reflectométrica, a interferometria de polarização dual e a tecnologia de cristais. (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002).

3.6.4 Biossensores calorimétricos

Os biossensores calorimétricos exploram a propriedade fundamental das reações biológicas, ou seja, a absorção ou libertação de calor. Isso reflete como alteração da temperatura no meio reacional. Estes dispositivos predominantemente medem as variações de temperatura do fluido circulante após a reação com um substrato apropriado junto as enzimas imobilizadas. (YAKOVLEVA; BHAND; DANIELSSON, 2013).

A calorimetria tem um considerável potencial em bioanalises. Os dois tipos de abordagens populares incluem a calorimetria de condução adiabática e a calorimetria de condução de calor. Ambos os princípios foram aplicadas extensivamente, levando ao biossensor calorimétrico. A principal vantagem sobre o calorímetro tradicional é a adequação dos dispositivos de monitoramento contínuo e um potencial para a criação de mini/micro versões. (XIE; RAMANATHAN; DANIELSSON, 2000).

Os biossensores calorimétricos detectam todo o calor produzido durante a reação, que pode ser resultado da diluição ou mistura dos componentes, e não o calor gerado devido à ação enzimática. Essas características fazem com que os biossensores calorimétricos possuam baixa especificidade na análise, sejam altamente complexos e apresentarem altos custos. (MELO, 2008).

3.7 ANALITO DE ESTUDO: ETANOL

O etanol, ou álcool etílico (CH₃CH₂OH) possui um odor característico, incolor, límpido, com ponto de fusão de -114^oC, ponto de ebulição de 78,5^oC e densidade de 0,789 g/mL à 20^oC, podendo ser produzido por meio da fermentação de açúcares, oriundos de diversas matérias-primas, ou a partir de derivados de petróleo, como eteno, etino, gases de petróleo e hulha. (HERSZENHAUT, 2013).

O etanol a partir da biomassa tem sido utilizado como um substituto para os combustíveis líquidos fósseis, tais como a gasolina e o diesel, sem contribuir efetivamente para o aquecimento global, uma vez que o dióxido de carbono produzido pela combustão do etanol é consumido durante o crescimento de sua matéria-prima. (VONSIVERS; ZACCHI, 1996).

O processo de produção do biocombustível etanol é basicamente o mesmo aplicado na produção de bebidas alcoólicas, ou seja, por meio de micro-organismos que fermentam as soluções de açúcares produzindo o etanol como produto e o dióxido de carbono como coproduto metabólico. O teor alcoólico resultante da fermentação oscila entre 6 e 12%, sendo que concentrações mais elevadas são obtidas por meio de destilação, com teores entre 60 e 95%. (HUNSAKER JR; MCBRAYER; ELMORE, 2009).

Este é o biocombustível mais comum em todo o mundo produzido pela fermentação de açúcares derivados de trigo, milho, beterraba e cana-de- açúcar. Os métodos de produção utilizados são a digestão enzimática (liberando os açúcares dos amidos, por exemplo a partir de trigo e de milho), a fermentação, destilação, desidratação e secagem. O etanol pode ser utilizado em motores como um substituto para a gasolina além de também poder misturar com gasolina a qualquer porcentagem. (AHMED; ABUBAKAR; AHMED, 2009).

As perspectivas para o uso do biocombustível etanol têm crescido em todo o mundo. Uma vez limitado a poucos países especializados, a produção e o consumo do etanol começaram a se espalhar por todo o mundo. Produzido a partir de amido e de açúcar, há debates sobre a viabilidade do bio-etanol como um substituto dos combustíveis fósseis. Preocupações comuns incluem a grande quantidade de terra arável necessária para as culturas além do balanço de energia/poluição do ciclo de produção do etanol. (SRP, 2014).

Enquanto a pesquisa e o desenvolvimento de etanol celulósico promete acalmar essas preocupações, a maioria dos analistas concorda que a produção em grande escala não é esperada num futuro próximo. O Brasil, pioneiro da indústria do biocombustível etanol na década de 1970, ainda se mantém produtor dominante e consumidor do biocombustível etanol, embora a indústria tem crescido drasticamente nos Estados Unidos, Europa, África e Ásia. (MUSSATTO *et. al.*, 2010).

De todo o etanol mundial, estima-se que 82% da produção é destinada ao setor de combustíveis, enquanto 11% ao setor de bebidas e o restante destinada ao setor industrial. (HERSZENHAUT, 2013).

A capacidade total de produção do biocombustível etanol no Brasil em 2014 foi de 309.234 m³/dia, sendo 205.041 m³/dia de etanol hidratado e 104.193 m³/dia de etanol anidro distribuídos em 382 plantas produtoras de etanol ratificadas pela ANP. O estado de São Paulo lidera a produção nacional de etanol hidratado e anidro com 47,2% e 48,2%, respectivamente, como apresentado na Figura 3. (SRP, 2014).



FIGURA 3: Participação percentual dos estados na produção nacional de etanol hidratado e anidro. Fonte: SRP, 2014.

O biocombustível etanol, que pode ser encontrado na forma anidra ou hidratada, é definido pela Lei nº 12.490, de 16 de setembro de 2011: "Biocombustível líquido derivado de biomassa renovável, que tem como principal componente o álcool etílico, que pode ser utilizado, diretamente ou mediante alterações, em motores a combustão interna com ignição por centelha, em outras formas de geração de energia ou em indústria petroquímica, podendo ser obtido por rotas tecnológicas distintas, conforme especificado em regulamento." (ANP, 2014).

A utilização do etanol não só reduz a emissão dos gases responsáveis pelo efeito estufa, mas também contribui para a diminuição do preço do petróleo, uma vez que diminui a sua demanda. Praticamente toda sua produção atual é oriunda de

grãos e de cana-de-açúcar e, com isso, a necessidade de novas áreas de cultivo fortalece o desenvolvimento rural. Por outro lado, é provável que haja uma competição por áreas produtoras de alimentos, além dos possíveis impactos ambientais negativos, mas esses pormenores estão sendo analisados por meio de pesquisas que estudam a produção desse biocombustível por meio de matérias-primas lignocelulósicas. (MUSSATTO *et. al.*, 2010).

3.8 COMPONENTES DO BIOSSENSOR CONFECCIONADO

3.8.1 Álcool-oxidase

A álcool-oxidase (AOD) é uma enzima produzida por leveduras metilotróficas (como *Hansenula*, *Pichia* e *Candida*) em microcorpos subcelulares conhecidos como peroxissomas, durante o crescimento em metanol. A AOD é a primeira enzima envolvida na via de oxidação do metanol por leveduras metilotróficas e, embora o seu papel fisiológico seja a oxidação do metanol, também são capazes de oxidar outros alcoóis alifáticos lineares e de cadeia curta, como o etanol. Em sequência, são oxidados a uma taxa mais lenta o n-propanol, n-butanol, álcool de alilo, álcool de propargilo, metil e etil-mercaptano e formaldeído. (AZEVEDO *et al.*, 2005).

Sua faixa de temperatura ideal é de 40 a 45°C, seu congelamento não a inativa, a solubilidade está inversamente relacionada com a temperatura e o pH ótimo é de 7,5 a 8,0 com uma faixa de trabalho de 6,0 a 9,5, sendo livremente solúvel em tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH acima de 7,0, com massa molecular de 675 kDa. Possui aplicação na determinação qualitativa e/ou quantitativa de etanol ou metanol, remoção de álcool ou aldeído, produção de peróxido de hidrogênio e remoção de oxigênio. (KROUTIL, *et. al.*, 2004).

A AOD é uma enzima oligomérica consistindo de oito sub-unidades idênticas dispostas num arranjo quase cúbico, cada uma contendo um co-factor fortemente ligado, a molécula flavina adenina dinucleótido (FAD) de acordo com a representação da Figura 4. (KATO *et. al.*, 2006).



FIGURA 4: Estrutura tridimensional da álcool-oxidase. Fonte: KATO *et. al.*, 2006 modificado.

Dessa forma, a AOD é responsável pela oxidação de alcoóis de baixo peso molecular ao seu aldeído correspondente, por meio de transferências de elétrons para o oxigênio molecular (O₂) com a concomitante produção de peróxido de hidrogênio (Equação 1) que é um grande inibidor desta enzima, sendo necessário a utilização de uma segunda enzima para promover a decomposição irreversível do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. (JOHANSSON *et al.*, 2003).

$$CH_{3}CH_{2}OH + O_{2} \xrightarrow{AOD} CH_{3}CHO + H_{2}O_{2}$$
(1)

O grupo prostético da AOD (FAD), que é o responsável pela oxidação do etanol, é um dos principais carreadores de elétrons na oxidação de diversas moléculas podendo receber até dois elétrons. A FAD é fortemente vinculada à sua apoproteína e portanto mais protegida, tolerando uma ampla e razoável gama de receptores de elétrons sintéticos (mediadores) ao invés de apenas do oxigênio molecular, permitindo sua regeneração *in vitro*. (KROUTIL, *et. al.*, 2004).

3.8.2 Horseradish-peroxidase

A horseradish-peroxidase (HRP) é uma enzima contendo grupo heme que utiliza o peróxido de hidrogênio, o seu principal substrato, para oxidar uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. É uma glicoproteína globular obtida por meio da raíz forte (*Amoracia rusticana*) possuindo um grande número de isoenzimas. (VEITCH, 2004).

Esta enzima possui dois domínios bem definidos em sua estrutura, onde em cada um deles está presente um íon cálcio que promove a estabilidade estrutural e controla sua atividade enzimática. Esses domínios oferecem um ambiente hidrofóbico onde o grupo heme (grupo prostético da enzima) se encontra, como mostra a Figura 5. (HOCEVAR, 2011).



FIGURA 5: Estrutura tridimensional da *horseradish-peroxidase* apresentando o grupo prostético heme em vermelho entre os dois domínios em azul com um íon Ca²⁺. Fonte: HOCEVAR, 2011.

Em combinação com o peróxido de hidrogênio produzido pelas oxidases, a HRP tem sido intensivamente utilizada em métodos eletroquímicos e espectrofotométricos para a detecção do substrato das oxidases. Sabe-se que uma transferência aparentemente direta e muito eficiente de elétrons pode ser conseguida entre o eletrodo e a HRP (ou outras peroxidases) imobilizada neste mesmo eletrodo. (AZEVEDO *et al.*, 2005).

O ciclo catalítico da HRP está esquematicamente ilustrado na Figura 6 e representado pela Equação 2, onde a primeira etapa consiste na clivagem do peróxido de hidrogênio gerando $H_2O = O^{2+}$. O cátion O^{2+} se liga a dois elétrons do íon Fe III presente no grupo heme da HRP nativa que o oxida ao Fe V, dando origem ao composto I (HRP oxidada). Na falta de um doador forte de elétrons é utilizado um

substrato de redução, como o fenol (C₆H₅OH) por exemplo, que transfere um elétron ao composto I para formar o composto II, HRP ainda oxidada, que por sua vez recebe mais um elétron de outra molécula do substrato de redução, retornando ao estado fundamental, ou seja, HRP nativa. (VEITCH, 2004).



FIGURA 6: Representação esquemática do ciclo catalítico da *horseradish-peroxidase* (HRP) tendo o fenol como substrato de redução. As constantes de velocidade K₁, K₂ e K₃ representam a taxa de formação do composto I, taxa de redução de composto I e taxa de redução do composto II, respectivamente. Fonte: VEITCH, 2004 modificado.

 $H_2O_2 + 2C_6H_5OH \xrightarrow{HRP} 2H_2O + 2C_6H_5O^{\bullet}$ (2)

Os sensores para etanol mais promissores desenvolvidos até o momento são os biossensores enzimáticos baseados na imobilização da álcool-oxidase com *horseradish-peroxidase*. Estes biossensores fazem uso da transferência direta ou mediada de elétrons entre a *horseradish-peroxidase* e o eletrodo. (SMUTOK *et al.*, 2006).

3.8.3 Polianilina

A polianilina (PANI), um polímero condutor da família dos polímeros semiflexíveis, foi descoberta no século XIX e tem tomado a atenção da comunidade científica devido à sua alta condutividade elétrica e baixo custo. Por isso a PANI vem sendo sendo explorada continuamente em diversas aplicações, incluindo aquelas em biossensores devido uma série de recursos úteis, tais como: deposição direta e fácil sobre o eletrodo sensor; controle da espessura; características de condutividade redox e polieletrólito; área de superfície elevada; especificidades químicas; estabilidade ambiental a longo prazo e propriedades sintonizáveis. (DHAND *et al.*, 2011).

O termo polianilina é descritivo de uma classe de polímeros condutores cujo estado de oxidação é descrito pelo parâmetro y que pode ter valores de y = 1 para uma PANI totalmente reduzida possuindo apenas nitrogênios amina, y = 0 para uma PANI totalmente oxidada possuindo apenas nitrogênios imina e y = 0,5 para o estado intermediário de oxidação possuindo tanto nitrogênios amina, quanto imina. Todos ou alguns dos átomos de nitrogênio (aminas ou iminas) nestas formas podem ser protonados para produzir uma variedade de sais correspondentes. As propriedades das PANIs descritas pela fórmula geral apresentada na Figura 7 dependem de duas variáveis: o grau de oxidação e o grau de protonação. (RAY *et al.*, 1989).



De acordo com o estado de oxidação, a polianilina é conhecida como leucoesmeraldina (y = 1), pernigranilina (y = 0) e esmeraldina (y = 0,5) que possui uma condutividade elétrica em torno de 10^{-11} S/mm e pode ser protonada (dopada) por um ácido aquoso 1 M (pH ~ 0) para um estado de condutividade elétrica de aproximadamente 0,5 S/mm. A esmeraldina dopada é considerada como a forma mais útil da PANI devido à sua elevada estabilidade à temperatura ambiente e, além disso, a sua forma dopada (sal de esmeraldina) é eletricamente condutora. (HANSEN, 2011).

A princípio, esta protonação pode ocorrer em cada nitrogênio imina para obter um sistema altamente estabilizado por ressonância no qual todos os anéis -C₆H₄- e átomos de N são quimicamente equivalentes como apresentado na Figura 8. (MACDIARMID; EPSTEIN, 1995).



FIGURA 8: Protonação da esmeraldina. Fonte: HANSEN, 2011 modificado.

A PANI é um material muito interessante para ser aplicado nas interfaces de sensores e de biossensores, pois pode atuar como um mediador eficaz na transferência de elétrons nas reações redox ou enzimáticas. Seu papel como mediador é devido às cargas redox deslocalizados presentes ao longo de uma série de grãos condutores (polarons) em seu cristal esmeraldina dopada. (DHAND *et al.*, 2011).

3.8.4 Nanopartículas de prata

Com a utilização dos nanomateriais são alcançadas maior sensibilidade e fixação das enzimas devido à sua elevada área superficial, bem como as suas propriedades físicas, químicas e eletrônicas. As aplicações dos nanomateriais têm atraído muita atenção no que diz respeito ao desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de alto desempenho. (AHMADALINEZHAD; CHEN, 2011).

Um grande interesse em nanopartículas metálicas (NPs) tem sido motivado por suas potenciais aplicações em sensores eletroquímicos devido ao seu pequeno tamanho (1-100 nm), propriedades eletrônicas, químicas e físicas únicas diferentes do material bruto (*bulk*) e flexibilidade para a construção de novos e melhores dispositivos de detecção. Diferentes tipos de nanopartículas estão desempenhando papéis diversificados em diferentes sistemas de sensores eletroquímicos. Em geral, a excelente condutividade elétrica e as propriedades catalíticas das nanopartículas metálicas tornaram-nas adequadas para confecção de "fios eletrônicos" (aumentando a transferência de elétros) e catalisadores eletroquímicos (devido à sua estrutura e tamanho nanométrico). (PRAKASH *et al.*, 2013).

A síntese química mais empregada para obtenção das NPs é o Método de Turkevich, que é baseado numa reação de oxi-redução entre o citrato de sódio e o sal metálico. Trata-se de uma maneira simples, rápida, de baixo custo, reprodutível e segura de sintetizar NPs com pequenas dimensões, aproximadamente 20 nm, que são responsáveis pela alta atividade cinética proporcionando uma maior interação com o substrato. (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951).

Os eletrodos modificados com a inclusão das NPs apresentam diversas vantagens em comparação aos eletrodos isentos de tal material, como aumento do transporte de massa, da área de contato e do efeito eletrocatalítico que proporciona um eletrodo com maior sensibilidade, menor limite de detecção e aplicação de um menor potencial de trabalho (BRUST, *et. al.*, 1994). Alta condutividade elétrica, resistência mecânica e boa compatibilidade elétrica são outras características que as NPs proporcionam aos sensores e biossensores. (WELCH; COMPTON, 2006).

As nanopartículas de prata (AgNPs) tem sido amplamente estudadas e aplicadas devido às suas propriedades únicas (como propriedades ópticas, elétricas e magnéticas) que podem ser incorporadas em aplicações antimicrobianas, fibras compostas, materiais supercondutores criogênicos, produtos cosméticos, componentes eletrônicos e materiais para biossensores. (MORI *et al.*, 2011).

A confecção de eletrodos quimicamente modificados com as AgNPs vem aumentando de maneira considerável. Uma vez que a prata é quatro vezes mais barata que o ouro, demonstra excelente atividade catalítica, boa condutividade elétrica/térmica e sua aplicação em eletroanálises é muito favorável atuando como pré-concentradores de espécies de interesse e/ou mediando reações redox. (OLIVEIRA, 2012).

3.9 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

As técnicas eletroanalíticas são baseadas em processos onde uma reação química ocorre devido uma tensão (diferença de potencial - ddp) aplicada em um eletrodo. Uma dessas técnicas é a voltametria, que é capaz de fornecer informações qualitativas e/ou quantitativas de uma determinada espécie química por meio de registros de curvas corrente-potencial realizadas durante a reação. É fundamental que as espécies a serem analisadas oxidem ou reduzem sob um determinado potencial proporcionando um fluxo de elétrons na interface solução-eletrodo. (WANG, 2006).

A célula eletrolítica da voltametria é constituída por três eletrodos: o eletrodo de trabalho, o eletrodo auxiliar (também chamado de contra-eletrodo) e o eletrodo de referência. É no eletrodo de trabalho que é aplicado o potencial e onde ocorre a redução/oxidação da espécie química a ser analisada. Já o eletrodo de referência possui a função de fornecer um potencial constante e definido sem ocorrer sua polarização durante o experimento, enquanto o eletrodo auxiliar fornece a corrente requerida pelo eletrodo de trabalho. (VOGEL, 2002).

Para controlar a ddp aplicada entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho na célula eletrolítica é utilizado um dispositivo eletrônico denominado potenciostato (Figura 9) que age como um catalisador de reações eletroquímicas, sendo ajustado para fazer uma varredura completando o potencial de oxidação e redução da espécie a ser analisada. (WANG, 2006).



FIGURA 9: Célula eletroquímica de três eletrodos. Fonte: OLIVEIRA, 2013 modificado.

Cada espécie química possui um potencial característico em que ocorre sua oxidação/redução ao passo que a corrente de pico produzida (fluxo de elétrons) é proporcional à sua concentração. (ANDRADE *et al.*, 2004).

3.9.1 Voltametria cíclica

Na voltametria cíclica, inicialmente é aplicado um determinado potencial no qual não ocorre redução. Em seguida o potencial é aumentado para regiões negativas ocorrendo a redução da substância a analisar gerando uma corrente de pico catódica (pico de redução) que é proporcional à concentração da substância no meio (Figura 10). No momento em que o potencial atinge o valor máximo estabelecido, varre-se o potencial no sentido inverso até o valor inicial oxidando os produtos gerados durante o sentido direto - quando a reação for reversível - gerando uma corrente de pico anódica (pico de oxidação) simétrica à corrente de pico catódica. (RIBEIRO, 2009).



FIGURA 10: Voltametria cíclica: (A) Varredura de potencial. (B) Voltamograma. Fonte: SIMÕES, 2005 modificado.

A voltametria cíclica é muito bem empregada no conhecimento da eletroafinidade de compostos, investigação de reações químicas acopladas, análise de íons e quando há necessidade de estudar a superfície de um eletrodo, além de fornecer informações relativas à reversibilidade de um sistema que está relacionado com a troca de elétrons entre a solução e o eletrodo. (SILVA, 2010).

Segundo Diao e Zhang (1996) algumas características para sistemas reversíveis são importantes e devem ser mencionadas, são elas:

 A corrente de pico (I_p) para os processos reversíveis a 25°C é dado pela Equação 3 segundo Randles-Sevcik:

$$lp = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} ACD^{1/2} v^{1/2}$$

48

(3)

Onde:

n: número de elétrons

A: área do eletrodo (cm^2)

C: concentração (mol/cm³)

D: coeficiente de difusão (cm²/s)

v: velocidade de varredura (V/s).

Tal equação indica que a corrente de pico é linearmente proporcional à concentração no meio, aumentando com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

 Nos processos reversíveis onde há transferência de 1 elétron (n = 1) a separação dos potenciais (ΔE_p) deve ser aproximadamente 0,057 V, de acordo com a Equação 4:

$$\Delta E_{p} = (E_{pa} - E_{pc})/n \approx 0.057/n \tag{4}$$

Onde E_{pa} é o potencial de pico anódico, E_{pc} é o potencial de pico catódico e n é o número de elétrons transferidos.

 O módulo da razão entre a corrente de pico anódica (I_{pa}) e a corrente de pico catódica (I_{pc}) deve ser aproximadamente igual a 1 de acordo com a Equação 5:

$$|\mathbf{I}_{\rm pa}/\mathbf{I}_{\rm pc}| \approx 1 \tag{5}$$

3.9.2 Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada é uma das técnicas eletroquímicas mais avançadas, rápidas e sensíveis. Seus limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Embora frequentemente aplicada para fins analíticos, esta é uma técnica eletroquímica empregada tanto em estudos eletrocinéticos quanto em estudos mecanísticos de vários processos eletródicos. (SIMÕES, 2005).

A configuração da varredura de potencial da voltametria de onda quadrada está representada na Figura 11. Na voltametria de onda quadrada, a varredura de

potencial compreende uma rampa no formato de escada combinado com pulsos potenciais quadrados (Figura 11A). Os principais parâmetros de um ciclo do potencial composto de dois pulsos vizinhos são a amplitude (E) e a frequência dos pulsos da onda quadrada (Figura 11B). (MIRCESKI; GULABOSKI, 2014).

O ciclo do potencial, repetido a cada passo da rampa de escada, é constituído de um pulso direto e de um pulso inverso, sendo esses termos definidos em relação à direção da rampa de escada. No decorrer de cada ciclo de potencial, a reação no eletrodo ocorre tanto no sentido anódico quanto no sentido catódico, proporcionando assim uma visão do mecanismo do eletrodo. (OLIVEIRA, 2011).



FIGURA 11: Voltametria de onda quadrada: (A) Varredura de potencial no formato de escada.
 (B) Um ciclo de potencial. (C) Voltamograma de voltametria de onda quadrada. A resposta consiste de uma componente direta (anódica, Ψ_D), de uma componente inversa (catódica, Ψ_I) e de uma componente resultante (Ψ_R).
 Fonte: MIRCESKI; GULABOSKI, 2014.

No decorrer de um experimento voltamétrico, a corrente é registrada no final de cada pulso de potencial. Portanto, as correntes associadas com os pulsos de potencial direto e inverso formam a componente direta e a componente inversa do voltamograma de onda quadrada, respectivamente (Figura 11C). (MIRCESKI; GULABOSKI, 2014).

É importante salientar que as componentes diretas e inversas são representadas graficamente em relação ao potencial da rampa de escada, isto é, o potencial médio dos dois pulsos vizinhos compõem um ciclo de potencial. Consequentemente, para cada etapa de potencial, dois valores são atribuídos. Subtraindo-se das correntes diretas as correntes inversas, uma componente líquida do voltamograma de onda quadrada é obtida que é frequentemente uma curva em forma de sino que permite determinar com precisão sua posição e altura. (SIMÕES, 2005).

CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os principais materiais e a descrição dos procedimentos utilizados durante o desenvolvimento dessa dissertação buscando a forma otimizada para a confecção de um biossensor eletroquímico para detecção do biocombustível etanol, bem como sua aplicação em amostras reais.

4.1 EQUIPAMENTOS

Foram utilizados os seguintes equipamentos durante o presente trabalho: balança de precisão (Gehaka, modelo AG 200), estufa (Fanem, modelo 002 CB), eletrômetro (Keithley, modelo 6517B), paquímetro digital (Digimess), potenciostato (Autolab, modelo PGSTAT12), eletrodo de referência de Ag/AgCI (ALS, modelo 012167 RE-1B), contra-eletrodo de fio de platina, agitador magnético (Marconi, modelo MA 085), forno elétrico (Quimis, modelo Q819V2), espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV - 1800 120V), microscópio eletrônico de varredura (Jeol, modelo JSM-6460LV) cromatógrafo líquido (Shimadzu, detector RID-10A), analisador termogravimétrico (PerkinElmer, modelo PYRIS 1 TGA), calorímetro exploratório diferencial (PerkinElmer, modelo PYRIS Diamond DSC).

4.2 REAGENTES

Os reagentes utilizados para a realização desta pesquisa foram: polianilina (sal de esmeraldina), resina epóxi DER 332, glutaraldeído e enzima álcool-oxidase EC 1.1.3.13 (obtida de *Pichia pastoris*) adquiridos da Sigma-Aldrich; ferrocianeto de potássio, cloreto de potássio, citrato de sódio, 4-aminoantipirina, peróxido de hidrogênio, fenol e etanol 95% P.A. adquiridos da Vetec; nitrato de prata (Synth); enzima *horseradish-peroxidase* EC 1.11.1.7 (Toyobo Brasil); grafite em pó e albumina adquiridos da Fluka; biocombustível etanol (Petrobras); meio fermentado (EQ-UFRJ) e tampão fosfato de sódio pH 7,0.

4.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MATRIZ DO BIOSSENSOR

É necessário que a matriz de um biossensor demonstre condutividade elétrica para que o mesmo seja eficaz. Dessa forma, foi utilizado o software STATISTICA 8 para realizar o planejamento experimental de misturas com o objetivo de determinar a melhor proporção entre os componentes do compósito para obter a maior condutividade elétrica.

Os componentes utilizados na confecção do compósito da matriz do biossensor foram grafite, PANI (sal de esmeraldina) e resina epóxi DER 332 e a variável de resposta foi a condutividade elétrica (S/mm) apresentada pelo compósito.

O planejameto experimental de misturas foi elaborado com as seguintes restrições: grafite variando a massa de 0 a 30%, PANI variando a massa de 30 a 60% e resina epóxi variando a massa de 25 a 55%, baseado nos parâmetros de Southgate (2011).

O software sugeriu 11 composições (Tabela 1) a fim de estimar a proporção que forneça um eletrodo com a maior condutividade elétrica.

porçao que	torneça um elet	rodo com a maior co	ndutividade eletric
Amostra	Grafite (%)	Polianilina (%)	Epoxi (%)
1	30,0	30,0	40,0
2	0,0	45,0	55,0
3	30,0	45,0	25,0
4	15,0	45,0	40,0
5	15,0	60,0	25,0
6	30,0	37,5	32,5
7	22,5	30,0	47,5
8	15,0	30,0	55,0
9	7,5	37,5	55,0
10	22,5	52,5	25,0
11	0,0	60,0	40,0

TABELA 1: Composições sugeridas pelo software a fim de estimar a proporção que forneça um eletrodo com a maior condutividade elétrica.

4.3.1 Preparação dos compósitos

Uma vez as proporções definidas pelo planejamento, os compósitos foram preparadas por meio de homogeneização com gral e pistilo e confeccionadas na forma de pastilhas. Foi adicionado 0,25 g de cada mistura, sobre um papel filme, no

pastilhador e prensadas manualmente com o auxílio de um martelo. Em seguida foram desenformadas e deixadas em estufa a 30°C por 24 horas (Figura 12).



FIGURA 12: Etapas da confecção das pastilhas. A) Homogeneização do grafite, PANI e resina epóxi.
B) Pastilhador. C) Adição da mistura, sobre um papel filme, no pastilhador. D) Prensa manual com auxílio de um martelo. E) Pastilha desenformada. F) Secagem em estufa.

Confeccionadas as pastilhas, as mesmas foram submetidas ao eletrômetro para a determinação de suas condutividades elétricas e assim estimar a composição que proporcionará um compósito com máxima condutividade elétrica dentro dos limites estabelecidos.

4.3.2 Determinação da condutividade elétrica

Para a determinação da condutividade elétrica foi utilizado o eletrômetro que é um método padrão recomendado pela ASTM (D257-99) baseado na resistência elétrica do material pelo método dos dois terminais, como mostra a Figura 13. Os testes de condutividade elétrica foram realizados em triplicata.



FIGURA 13: Método dos dois terminais para determinação da condutividade elétrica. Equipamento sem (A) e com (B) a luva de apoio e o peso padrão (200g). A pastilha encontra-se entre os dois terminais.

Para calcular a condutividade elétrica de um material é necessário conhecer suas dimensões de acordo com a Equação 6:

 $C = e / (a \times r)$

(6)

Onde:

C: condutividade elétrica (S/mm)

e: espessura (mm)

a: área (mm²)

r: resistência (Ω)

4.4 CONFECÇÃO DOS ELETRODOS

Em um suporte de PVC para a confecção de biossensores foi inserido um fio de ferro previamente lixado com lixa de 400 mesh deixando aproximadamente 1,5 mm de comprimento na região onde será introduzida o compósito e aproximadamente 20,0 mm de comprimento na outra extremidade para conecção do potenciostato de acordo com a Figura 14.



FIGURA 14: Eletrodo confeccionado com o compósito grafite:PANI:resina epóxi (A) e suas dimensões (B).

Cada mistura foi inserida na extremidade vazia dos suportes de PVC e mantidos na estufa a 30°C por 24 horas. Após esse tempo a extremidade contendo o compósito foi lixada com lixa de 1200 mesh e armazenados em geladeira a 4°C conforme o procedimento descrito por Southgate (2011).

4.5 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS

Para corroborar os resultados obtidos pelo planejamento experimental, foram realizadas medidas eletroquímicas de eletrodos confeccionados com algumas das composições propostas. Foram selecionadas três composições alternadas nos vértices do planejamento, uma composição do ponto central e a composição prevista para fornecer a maior condutividade elétrica.

Todas as medidas eletroquímicas executadas durante esse trabalho foram realizadas em uma célula de vidro típica (25 mL de capacidade) com três eletrodos usando o eletrodo confeccionado como eletrodo de trabalho. Padronizou-se o volume de 10 mL de solução eletrolítica para todos os experimentos.

Os eletrodos obtidos foram caracterizados pela técnica de voltametria cíclica, utilizando um potenciostato para controlar as diferentes velocidades de varredura de potencial (20, 40, 60, 80, 100, 125 e 150 mV/s), entre 0,2 e 0,75 V vs. Ag/AgCI utilizando uma solução aquosa de K₄Fe(CN)₆ 10 mM em KCI 3 M e um contraeletrodo de platina como apresentado na Figura 15.



FIGURA 15: (A) Célula eletrolítica de três eletrodos: (A1) eletrodo de referência Ag/AgCl, (A2) contraeletrodo de platina e (A3) eletrodo de trabalho confeccionado e (B) potenciostato.

O controle dos parâmetros voltamétricos e a aquisição dos dados obtidos foram efetuados por meio do software GPES (General Purpose Electrochemical System) versão 4.9.005, da Metrohm, Utrecht, Holanda e para apresentação dos voltamogramas e gráficos foi utilizado o software Origin 6.0.

4.6 INCORPORAÇÃO DAS AgNPs AO COMPÓSITO

Foram incorporadas AgNPs à mistura estabelecida pelo planejamento experimental para proporcionar um eletrodo com maior sensibilidade, menor limite de detecção e outras características benéficas. Tais partículas foram sintetizadas por através do Método de Turkevich por meio de redução química de acordo com a Equação 7:

 $4AgNO_3 + C_6H_5O_7Na_3 + 2H_2O \longrightarrow 4Ag^0 + C_6H_5O_7H_3 + 3Na^+ + H^+ + O_2$ (7)

As AgNPs foram incorporadas à mistura de grafite, PANI e resina epóxi como descrito a seguir e apresentado na Figura 16:

- Com auxílio de uma placa de aquecimento, aqueceu-se 50 mL de uma solução de nitrato de prata 0,001 M sob agitação até sua ebulição;
- Cessou-se o aquecimento;
- Ainda sob agitação constante, à solução de nitrato de prata foi adicionada uma solução de citrato de sódio 1%, gota a gota, até que a coloração da mistura se tornasse amarela pálida;

- A dispersão coloidal de AgNPs concebida foi vertida em 150 mg de grafite;
- A suspensão resultante foi mantida em forno a 100℃ até completa evaporação (aproximadamente 12 horas);
- O grafite obtido, enriquecido com as nanopartículas de prata, foi homogeneizado via gral e pistilo com a PANI e a resina epóxi de acordo com a proporção estabelecida pelo planejamento experimental.



FIGURA 16: Etapas da síntese e incorporação das AgNPs à mistura de grafite, PANI e resina epóxi. A) Solução de nitrato de prata 0,001 M em ebulição. B) Adição da solução de citrato de sódio 1%, gota a gota. C) Dispersão coloidal amarelada, indicando a presença das AgNPs. D) Suspensão com a dispersão coloidal de AgNPs e grafite. E) Evaporação completa da dispersão coloidal de AgNPs em forno a 100°C. F) Homogeneização do grafite enriquecido com AgNPs com PANI e resina epóxi.

Com a mistura obtida foram confeccionadas pastilhas, para averiguar sua condutividade elétrica, e eletrodos, para caracterização eletroquímica, de acordo com procedimentos relatados nos ítens 4.3.1 e 4.4, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DA DISPERSÃO DE AgNPs

Para a caracterização da dispersão coloidal de AgNPs foi utilizada a espectroscopia UV-Visível que é uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização estrutural de AgNPs.

Essa técnica é muito sensível à presença de colóides de prata uma vez que tais nanopartículas exibem um pico de absorção intenso devido à excitação do plasma de superfície. A banda de absorção na região de 350 a 450 nm é típica para as AgNPs (RASHID; BHUIYAN; QUAYUM, 2013).

A dispersão de AgNPs foi levada ao espectrofotômetro para leitura da absorbância com a varredura do comprimento de onda entre 250 e 700 nm.

4.8 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DOS CONSTITUINTES DA MATRIZ DO BIOSSENSOR

A estabilidade térmica do compósito, e de seus constituintes, foi investigada através de experimentos de análise termogravimétrica (TGA) e de calorimetria exploratória diferencial (DSC) com o objetivo de verificar a influência das AgNPs no comportamento do compósito.

A TGA da mistura (PANI + grafite enriquecido com AgNPs) foi realizada para determinar a faixa de temperatura a ser utilizada na DSC. A TGA foi executada por aquecimento da mistura até 800°C numa taxa de 10°/min.

A DSC foi realizada por meio da variação de temperatura das diferentes amostras (amostra 1: PANI; amostra 2: grafite; amostra 3: dispersão de AgNPs; amostra 4: grafite enriquecido com AgNPs e amostra 5: 38% de grafite enriquecido com AgNPs e 62% de PANI) de acordo com o seguinte programa:

- Resfriamento a 0°C e manutenção desta temperatura por 1 minuto;
- Aquecimento a 350°C numa taxa de 10°C/min e manutenção desta temperatura por 1 minuto;
- Resfriamento a 0°C numa taxa de 10°C/min e manutenção desta temperatura por 2 minutos;
- Aquecimento a 350℃ numa taxa de 10℃/min.

As análises foram realizadas em atmosfera de nitrogênio como uma vazão de 20 mL/min.

4.9 TRATAMENTO E PREPARO DA HRP

A HRP utilizada neste trabalho foi doada pela Toyobo Brasil e se encontrava misturada com terra diatomácea, sendo recomendado pelo fornecedor um tratamento prévio ao procedimento da medida de atividade enzimática e sua utilização.

4 g da HRP foram suspensos em 30 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0, e após, a suspensão obtida passou por um procedimento de filtração para remoção de particulados utilizando papel filtro Inlab (porosidade de 2 μm). O filtrado obtido foi submetido à purificação por processo de diálise em membrana (faixa de peso molecular de 12000 - 14000 Dalton, Spectrum) previamente hidratada, durante 24 horas, sob refrigeração (4°C) em geladeira, com substituição da água destilada a cada 6 horas.

Após 24 horas, a solução foi recolhida e acondicionada em microtubos (1,5 mL de solução enzimática/microtubo) e armazenada em congelador.

4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a determinação da atividade enzimática (U) da HRP foi utilizado o método turbidimétrico que usa fenol como agente redutor, 4-aminoantipirina como agente cromógeno e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como substrato. Em concentrações adequadas destes reagentes a taxa do produto corado (vermelho) a 510 nm é proporcional a taxa de consumo de H_2O_2 que por sua vez é proporcional à atividade enzimática da enzima. (NICELL; WRIGHT, 1997).

O substrato foi preparado pela homogeneização de 1 mL de solução de fenol 0,2 M, 15 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0, 1 mL de 4-aminoantipirina 4,8x10⁻² M e 2 mL de peróxido de hidrogênio 2x10⁻² M. Separadamente 3,8 mL do substrato e 0,2 mL da amostra enzimática diluída se mantiveram em banho aquecido a 25°C durante 3 minutos e em seguida homogeneizados e levados ao espectrofotômetro para leitura da variação da absorbância durante 1 minuto.

A determinação da atividade enzimática foi realizada por meio dos valores de absorbância obtidos a 510 nm usando o espectrofotômetro de acordo com a Equação 8:

$$U = \frac{a \times Vc}{L \times \epsilon \times Va} \times Fd \times 60$$

Onde:

a: Coeficiente angular da equação da reta obtida

Vc: Volume da cubeta (4 mL)

L: Caminho ótico (1 cm)

- ε: Coeficiente de extinção molar (7,21 mL. μmol⁻¹.cm⁻¹)
- Va: Volume da amostra (0,2 mL)
- Fd: Fator de diluição (volume total diluído/volume da HRP)

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como o número de µmol de peróxido de hidrogênio consumido durante 1 minuto sob as condições supracitadas.

Uma vez que a enzima AOD foi adquirida purificada e recentemente, não foi necessário nenhum tratamento e preparo enzimático para este trabalho, e sua atividade enzimática estava descrita no rótulo da embalagem (1107 U/mL).

4.11 APLICAÇÃO DA VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

A voltametria de onda quadrada foi aplicada nos experimentos envolvendo as enzimas imobilizadas pois, em baixas concentrações de etanol, não foi possível a obtenção de picos por meio da voltametria cíclica. Os parâmetros utilizados durante os ensaios com voltametria de onda quadrada foram os seguintes: 10 mL de solução eletrolítica, frequência de 25 Hz, velocidade de varredura de 40 mV/s, potencial entre 0,2 e 0,75 V vs. Ag/AgCl e contra-eletrodo de platina.

4.12 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Baseado nos parâmetros de Southgate (2011), Nunes, Jeanty e Marty (2004), Prada e outros (2003) e utilizando o software STATISTICA 8 foi realizado um planejamento experimental de misturas para determinar a melhor composição da solução utilizada na imobilização enzimática.

(8)

Os componentes utilizados na confecção da solução de imobilização foram glutaraldeído 2,5%, albumina 1 mg/mL e solução enzimática composta por 286 U de álcool-oxidase e 2640 U de HRP e a variável de resposta foi a corrente de pico resultante (mA) apresentada pelo eletrodo.

O planejameto experimental de misturas foi elaborado com as seguintes restrições: glutaraldeído variando o volume de 1 a 10%, albumina variando o volume de 0,5 a 10% e solução enzimática variando o volume de 80 a 98,5%.

O software sugeriu 6 composições (Tabela 2) a fim de estimar a proporção que forneça uma solução de imobilização que proporcione a maior corrente de pico resultante.

ιÇ	ção de infobilização que proporcione a maior conente de pico resu				
	Solução de imobilização	Solução Enzimática (AOD + HRP) (%)	Glutaraldeído 2,5% (%)	Albumina 1 mg/mL (%)	
	1	80,00	10,0	10,0	
	2	98,50	01,0	0,50	
	3	89,00	01,0	10,0	
	4	89,50	10,0	0,50	
	5	89,25	5,50	5,25	

TABELA 2: Composições sugeridas pelo software a fim de estimar a proporção que forneça uma solução de imobilização que proporcione a maior corrente de pico resultante.

A partir das proporções sugeridas pelo software, foram depositados 10 µL da solução de imobilização na superfície do eletrodo que permaneceu armazenado à 4ºC por 12 horas.

As correntes de pico resultantes foram obtidas por voltametria de onda quadrada numa célula contendo 10 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,0) com adição de 0,5 mL de solução de etanol 95%.

4.13 CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DO ELETRODO

Para analisar a morfologia da superfície do eletrodo foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (MEV) operando com aceleração de voltagem de 20 kV. O eletrodo foi fixado no porta-amostra utilizando uma fita adesiva de face dupla de carbono para melhorar a condutividade elétrica com o intuito de analisar o eletrodo com e sem imobilização enzimática.

4.14 CURVA PADRÃO DO BIOSSENSOR ENZIMÁTICO

Foram depositados 10 µL da solução de imobilização, cujo planejamento experimental estimou proporcionar a maior corrente de pico resultante nos limites do planejamento, na superfície do eletrodo que permaneceu armazenado à 4°C por 12 horas.

Para a construção da curva padrão foi utilizada solução tampão fosfato de sódio (pH 7,0) com adições de etanol 95% P.A. (concentração: 852,63 g/L) de forma a obter diversas concentrações de etanol. As correntes de pico resultantes foram obtidas por voltametria de onda quadrada em triplicata.

4.15 REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE DO BIOSSENSOR

A repetitividade se refere à variação do biossensor ao realizar leituras repetidas muito próximas, sob as mesmas condições. Já a reprodutibilidade se refere ao biossensor apresentar os mesmos resultados ao longo do tempo.

A investigação da repetitividade e da reprodutibilidade do biossensor foi realizada utilizado 9,85 mL de solução tampão fosfato de sódio (pH 7,0) com adição de 0,15 mL de etanol 95% P.A. (concentração: 852,63 g/L) perfazendo uma concentração de 12,79 g/L de etanol. Durante os ensaios de reprodutibilidade, os biossensores foram armazenados sob refrigeração a 4°C entre as leituras.

Para examinar a repetitividade foram utilizados biossensores confeccionados e realizadas cinco leituras consecutivas no mesmo dia com cada biossensor. A reprodutibilidade foi examinada utilizando biossensores confeccionados realizando leituras diárias durante três dias consecutivos.

4.16 UTILIZAÇÃO DO BIOSSENSOR EM AMOSTRAS REAIS

Foi analisada a concentração de etanol de uma amostra de biocombustível etanol e de uma amostra, oriunda de práticas laboratoriais da EQ-UFRJ, de meio fermentado composto de caldo de cana-de-açúcar, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, NaCl, extrato de levedura e antiespumante. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por se tratar de uma metodologia bem difundida em análises, e seu resultado serviu de parâmetro para determinar a

confiabilidade do biossensor desenvolvido. Os parâmetros de operação do cromatógrafo foram: coluna Hi-Plex H 300 x 7,7 mm, H_2SO_4 5 mM como fase móvel, temperatura da coluna de 60°C, do detector de 50°C e fluxo de 0,6 mL/min.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MATRIZ DO BIOSSENSOR

A Tabela 3 apresenta as médias das dimensões, das resistências obtidas pelo eletrômetro e das condutividades elétricas, de cada pastilha, calculadas de acordo com a Equação 6 mencionada no ítem 4.3.2.

TABELA 3: Médias das dimensões de cada pastilha e de suas condutividades elétricas.						
Amostra	Espessura (mm)	Área (mm ²)	Resistência (Ω)	Condutividade elétrica (S/mm)	Variância	Desvio padrão
1	1,21	131,51	82,163	1,120.10 ⁻⁰⁴	4,176.10 ⁻⁰⁸	5,719.10 ⁻⁰⁵
2	1,37	153,50	1690,755	5,425.10 ⁻⁰⁶	6,511.10 ⁻¹³	8,069.10 ⁻⁰⁷
3	1,65	133,28	65,577	2,312.10 ⁻⁰⁴	1,843.10 ⁻⁰⁸	1,358.10 ⁻⁰⁴
4	1,43	130,02	141,025	8,498.10 ⁻⁰⁵	8,572.10 ⁻¹⁰	2,928.10 ⁻⁰⁵
5	1,70	132,53	107,809	1,405.10 ⁻⁰⁴	7,313.10 ⁻⁰⁹	8,551.10 ⁻⁰⁵
6	1,47	132,87	51,220	2,170.10 ⁻⁰⁴	6,850.10 ⁻¹⁰	2,617.10 ⁻⁰⁵
7	1,38	130,25	101,063	1,071.10 ⁻⁰⁴	4,434.10 ⁻¹⁰	2,106.10 ⁻⁰⁵
8	1,10	153,57	437,905	1,714.10 ⁻⁰⁵	2,226.10 ⁻¹¹	4,718.10 ⁻⁰⁶
9	1,53	153,39	705,435	1,489.10 ^{-∪5}	2,224.10 ⁻¹¹	4,716.10 ^{-∪6}
10	1,78	132,32	66,972	2,011.10 ⁻⁰⁴	9,519.10 ⁻¹²	3,085.10 ^{-∪6}
11	1,38	131,78	373,359	2,807.10 ⁻⁰⁵	1,730.10 ⁻¹²	1,315.10 ^{-∪6}

5.1.1 Análise estatística da determinação da composição da matriz do biossensor

Dentre os modelos matemáticos que obtiveram significância estatística (modelo linear e modelo cúbico completo) o modelo cúbico completo foi o que obteve o maior coeficiente de determinação ajustado (R²_{ajust.}), ao passo que os modelos quadrático e cúbico especial não obtiveram significância estatística conforme apresentado na Tabela 4.

TABELA	4: ANOVA para o	condutividade elétr	ica.
Significância estatística o	dos modelos mate	máticos previstos	pelo planejamento.
Modelo	p-level	R^2	R ² ajust.
Linear	0,000000	0,816336	0,801643
Quadrático	0,553916	0,832638	0,794601
Cúbico Especial	0,498959	0,836327	0,789563
Cúbico Completo	0,011144	0,910330	0,865495

Afirmando que o modelo matemático cúbico completo é estatisticamente significativo indica que a interação de terceira ordem entre os componentes é relevante. Dessa forma será utilizado o modelo cúbico completo para descrever a condutividade elétrica apresentada pelo compósito.

O modelo matemático proposto descreve de forma satisfatória a condutividade elétrica (S/mm). Essa informação está bem ilustrada na Figura 17 por meio do gráfico dos valores previstos *versus* valores observados da condutividade elétrica onde percebe pouca dispersão dos pontos sobre a curva. Considerando os dois pontos mais afastados da curva como *outliers*, o modelo matemático proposto descreve plenamente a condutividade elétrica (S/mm) apresentada pelo compósito.



FIGURA 17: Valores previstos versus valores observados da condutividade elétrica.

O gráfico de Pareto em função dos valores da estatística do teste *t* de Student (Figura 18) mostra que o componente epóxi, a interação quadrática entre o grafite e a PANI e a interação cúbica entre o grafite, a PANI e o epóxi não são estatisticamentes significativos, pois o valor do *p-level* de cada coeficiente é maior que 0,05, ou seja, a probabilidade de errar ao afirmar que o componente epóxi, a interação quadrática entre o grafite e a PANI e a interação cúbica entre o grafite, a PANI e o epóxi não são relevantes é menor que 0,05, não sendo necessário considerar seus coeficientes no modelo matemático.



FIGURA 18: Gráfico de Pareto para a condutividade elétrica apresentada pelo compósito em função dos valores da estatística do teste *t* de Student.

Uma vez que o valor da estatística do teste *t* de Student do grafite é negativo, isso indica que o mesmo de forma isolada, proporciona uma diminuição na condutividade elétrica apresentada pelo compósito, porém alguns valores da estatística do teste *t* de Student da interação do grafite de segunda ordem com os outros componentes são positivos, proporcionando um eletrodo com maior condutividade elétrica. Em suma, apesar do grafite de forma isolada proporcionar uma diminuição na condutividade elétrica, isso não é razão de ignorá-lo, pois sua interação com os demais componentes é essencial para aumentar a condutividade elétrica apresentada pelo compósito.

O valor da estatística do teste *t* de Student da PANI é o maior dentre os outros componentes, sendo assim, deduz-se que este componente determinará a condutividade elétrica do compósito, porém o valor da estatística do teste *t* de Student da interação entre o grafite e a PANI [AB(A-B)] é o maior, fazendo com que essa interação seja a responsável em produzir um compósito com maior condutividade elétrica.

A partir do gráfico de Pareto (Figura 18) também pode constatar que o grafite, a PANI e algumas interações de segunda ordem {grafite interagindo com epóxi [AC e AC(A-C)], PANI interagindo com epóxi [BC e BC(B-C)] e grafite interagindo com PANI [AB(A-B)]} são estatisticamente significativos visto que seus valores *p-level* são inferiores a 0,05.

Pelo gráfico de Pareto percebe-se que a combinação da PANI com epóxi forma uma mistura antagônica, pois os valores da estatística do teste *t* de Student de suas interações são negativos, e as demais combinações formam misturas sinérgicas.

É recomendado ignorar algumas interações que não são estatisticamente significativas para reduzir a quantidade de termos do modelo matemático proposto (CALADO; MONTGOMERY, 2003). Ignorando apenas a interação entre os três componentes (ABC), o R²_{ajust}. permaneceu praticamente o mesmo e o *p-level* do modelo teve uma diminuição de 0,01 para 0,009, tornando o modelo levemente mais estatisticamente significativo. Dessa forma têm-se o modelo matemático (Equação 9) para descrever a condutividade elétrica apresentada pelo compósito:

Condutividade elétrica = -0,041830A + 0,009105B - 0,003224C + 0,057378AB + 0,063282AC - 0,012000BC + 0,060381A²B + 0,060381AB² + 0,035185A²C + 0,035185AC² - 0,026401B²C - 0,026401BC² (9)

Onde:

A: massa de grafite (%) B: massa de PANI (%) C: massa de epóxi (%)

A superfície de resposta é utilizada para obtenção de faixas altas, intermediárias e baixas da condutividade elétrica apresentada pelo compósito em função do grafite, da PANI e do epóxi, conforme a Figura 19.



FIGURA 19: Superfície de resposta para a condutividade elétrica apresentada pelo compósito em função dos pseudo-componentes da mistura.

As curvas de nível fornecem uma visualização mais simples da tendência da variável de resposta, onde cada um dos pontos correspondem aos pontos experimentais e cada cor possui o mesmo valor da condutividade elétrica apresentada pelo compósito como apresentado na Figura 20.



FIGURA 20: Curvas de nível para a condutividade elétrica apresentada pelo compósito em função dos pseudo-componentes da mistura.

As curvas de nível são obtidas pelo rebatimento da superfície de resposta sobre um plano. Tanto as curvas de nível quanto a superfície de resposta levam em conta as restrições do planejamento, ou seja, os pseudo-componentes, e por isso não fica evidente a visualização da melhor composição para fornecer um compósito com maior condutividade elétrica em termos de porcentagem dos componentes originais.

Para uma visualização adequada da melhor composição da matriz do eletrodo com o objetivo de atingir a maior condutividade elétrica utiliza-se o diagrama ternário com restrição apresentado na Figura 21.



FIGURA 21: Diagrama ternário com restrição para condutividade elétrica apresentada pelo compósito em função dos componentes grafite, epóxi e PANI.

A região do planejamento encontra-se delimitada por um hexágono e a região que fornece a maior condutividade elétrica apresentada pelo compósito aparece em vermelho. A região delimitada indica que a maior condutividade elétrica é promovida por uma mistura em torno de 25% de grafite, 40% de PANI e 35% de epóxi. De acordo com as curvas de nível, existe uma região que proporciona uma condutividade elétrica ainda maior localizada no canto inferior direito (Figura 20), porém essa região não se encontra no interior do hexágono, ou seja, está fora da faixa experimental do planejamento e por isso deve ser desconsiderada pela análise.

De acordo com o modelo matemático proposto, um compósito confeccionado com 25% de grafite, 40% de PANI e 35% de epóxi proporcionará uma condutividade

elétrica de 2,53x10⁻⁴ S/mm. A escolha das porcentagens para a estimativa da condutividade elétrica apresentada pelo compósito foi baseada a partir das observações do diagrama ternário.

Foi realizada a análise qualitativa dos resíduos e de acordo com a Figura 22 percebe-se que os resíduos possuem distribuição normal, pois os pontos estão bem próximos à curva do gráfico e a variância pode ser considerada constante, uma vez que os resíduos estão distribuídos aleatoriamente (Figura 23).



FIGURA 22: Gráfico normal dos resíduos para os componentes do compósito.



FIGURA 23: Gráfico dos resíduos versus valores previstos para os componentes do compósito.
Também foi realizada a análise quantitativa dos resíduos para confirmar esta conclusão baseada nos testes de Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors e Shapiro-Wilk, como mostra a Figura 24. Ambos os testes admitem como hipótese nula a distribuição normal dos resíduos.



FIGURA 24: Testes quantitativos da normalidade dos resíduos para os componentes do compósito.

Os testes de Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors e Shapiro-Wilk confirmam a normalidade dos resíduos devido os valores de d e p serem maiores que 0,05 e W ser próximo de 1,0. Dessa forma a hipótese nula de que os resíduos realmente seguem uma distribuição normal é aceita, validando o teste t de Student e o teste F de Fisher realizados anteriormente.

5.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS SEM AgNPs

A Figura 25 apresenta os voltamogramas do eletrodo A, com massa de 15% de grafite, 30% de PANI e 55% da resina epóxi com diferentes velocidades de varredura de potencial.



FIGURA 25: Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo A, com massa de 15% de grafite, 30% de PANI e 55% de resina epóxi em solução contendo K₄Fe(CN)₆ 10 mM em KCl 3 M vs. Ag/AgCl.

A Figura 26 apresenta os voltamogramas do eletrodo B, com massa de 30% de grafite, 45% de PANI e 25% da resina epóxi com diferentes velocidades de varredura de potencial.



FIGURA 26: Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo B, com massa de 30% de grafite, 45% de PANI e 25% de resina epóxi em solução contendo K₄Fe(CN)₆ 10 mM em KCl 3 M vs. Ag/AgCl.

A Figura 27 apresenta os voltamogramas do eletrodo C, com massa de 0% de grafite, 60% de PANI e 40% da resina epóxi com diferentes velocidades de varredura de potencial.



FIGURA 27: Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo C, com massa de 0% de grafite, 60% de PANI e 40% de resina epóxi em solução contendo K₄Fe(CN)₆ 10 mM em KCl 3 M vs. Ag/AgCl.

A Figura 28 apresenta os voltamogramas do eletrodo D, com massa de 15% de grafite, 45% de PANI e 40% da resina epóxi com diferentes velocidades de varredura de potencial.



FIGURA 28: Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo D, com massa de 15% de grafite, 45% de PANI e 40% de resina epóxi em solução contendo K₄Fe(CN)₆ 10 mM em KCl 3 M vs. Ag/AgCl.

A Figura 29 apresenta os voltamogramas do eletrodo E, com a proporção sugerida pelo planejamento experimental com massa de 25% de grafite, 40% de PANI e 35% da resina epóxi com diferentes velocidades de varredura de potencial.



FIGURA 29: Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo E, com massa de 25% de grafite, 40% de PANI e 35% de resina epóxi em solução contendo K₄Fe(CN)₆ 10 mM em KCl 3 M vs. Ag/AgCl.

Verifica-se a partir das Figuras 25 à 29 que os voltamogramas que apresentaram os picos maiores e mais definidos foram os fornecidos pelo eletrodo E, com massa de 25% de grafite, 40% de PANI e 35% de resina epóxi, concordando com a composição estimada pelo planejamento experimental. Portanto, essa proporção foi selecionada para o prosseguimento do trabalho.

Foi determinada a velocidade de varredura de potencial que proporcionou o maior caráter de reversibilidade do sistema, que de acordo com a Tabela 5 tal velocidade foi de 80 mV/s, pois dentre as velocidades analisadas, essa é a que apresenta o módulo da razão entre a corrente de pico anódica (I_{pa}) e a corrente de pico catódica (I_{pc}) mais próxima de 1, ou seja, é nessa velocidade que o sistema apresenta o maior caráter de reversibilidade de acordo com Diao e Zhang (1996).

_	v (mV/s)	lpa (mA)	lpc (mA)	lpa/lpc			
-	20	-0,099	0,071	1,40			
	40	-0,142	0,106	1,33			
	60	-0,161	0,124	1,30			
	80	-0,175	0,136	1,28			
	100	-0,178	0,137	1,30			
	125	-0,176	0,133	1,33			
	150	-0,173	0,125	1,39			

TABELA 5: Valores de correntes de pico catódico, pico anódico e sua razão em função da velocidade de varredura frente ao eletrodo E.

Baseado nos parâmetros apresentados na Tabela 5 foi elaborado o gráfico que correlaciona as correntes de picos (catódicas e anódicas) com a raiz quadrada

da velocidade de varredura (Figura 30) fornecido pelo eletrodo E, também com o objetivo de confirmar o caráter de reversibilidade do sistema.



FIGURA 30: Curvas de correlação entre as correntes de pico catódicas (lpc) e anódicas (lpa) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (V/s)^{1/2} fornecidas pelo eletrodo E.

Segundo Diao e Zhang (1996), a reversibilidade do sistema é caracterizada de modo conjunto pela corrente de pico, que deve ser linearmente proporcional à concentração no meio, aumentando com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

Observa-se que não houve linearidade entre as correntes de pico catódica e anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando a não reversibilidade do sistema. Dessa forma foi necessário lançar mão de estratégias para alcançar tal linearidade aprimorando o desempenho do eletrodo, que será explicitado adiante.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA DISPERSÃO DE AgNPs

As AgNPs são muito pequenas para serem identificadas a olho nu, porém seu tamanho é maior que o comprimento de onda da luz visível. Dessa forma, um feixe de luz que atravessa uma dispersão coloidal de AgNPs é refratado por essas AgNPs conforme mostra a Figura 31, fenômeno este conhecido como Efeito Tyndall (BECHTOLD, 2011).



FIGURA 31: Feixe de luz atravessando a dispersão coloidal de AgNPs.

O espectro de absorção da dispersão coloidal de AgNPs está apresentado na Figura 32, que exibe uma banda de absorção aproximadamente em 400 nm, compatível com os resultados obtidos por Rashid, Bhuiyan e Quayum (2013) e por Reis (2011), confirmando que sua síntese foi bem sucedida uma vez que a banda de absorção típica para as AgNPs é na região de 350 a 450 nm.



FIGURA 32: Espectro de absorção da dispersão de AgNPs.

Tais bandas são propriedades físicas únicas dessas nanopartículas. Quando um campo eletromagnético externo, como a luz por exemplo, é aplicado a um metal, os elétrons de condução se movem em conjunto de modo a apresentar uma perturbação distribuída de carga conhecida como plasma, localizado próximo à superfície do metal (RASHID; BHUIYAN; QUAYUM, 2013).

5.4 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DOS CONSTITUINTES DA MATRIZ DO BIOSSENSOR

A Figura 33 apresenta as curvas TGA de perda percentual de massa do compósito de PANI/grafite enriquecido com AgNPs em função do aumento da temperatura.



FIGURA 33: Curvas TGA do compósito de PANI/grafite enriquecido com AgNPs.

Podem ser observados três eventos significativos de perda de massa, a 50,17°C (3,0%), entre 200°C e 293,5°C (7,8%) e um maior em 524,59°C (52,1%). A primeira perda observada em baixa temperatura (50,17°C) pode ser devida a evaporação de água, tendo em vista a PANI ser um polímero altamente higroscópico (TSOCHEVA *et al.*, 1998). As segunda e terceira perdas de massa verificadas devem estar relacionadas com a decomposição da estrutura do polímero obtendo-se um resíduo de cerca de 25%, que corresponde ao teor de grafite enriquecido com AgNPs utilizado no preparo do compósito. Traore e outros (1991) estudando a termodegradação da PANI relataram a fragmentação do polímero em temperaturas acima de 520°C em oligômeros e estruturas de peso molecular menores, podendo ocorrer reações cruzadas de fusão em anéis entre cadeias poliméricas próximas, formação de heterocíclicos e de amônio.

A Figura 34 mostra as curvas de DSC obtidas para amostras de grafite, grafite enriquecido com AgNPs, PANI e PANI/grafite enriquecido com AgNPs, onde os comportamentos térmicos de cada amostra podem ser evidenciados em função da natureza química da matéria e composição.



FIGURA 34: Curvas DSC das amostras de grafite, grafite enriquecido com AgNPs, PANI e PANI/grafite enriquecido com AgNPs.

Para a amostra de PANI pode ser verificado um evento endotérmico (191°C) e um evento exotérmico (292,2°C) (Figura 35). O primeiro evento (endotérmico) pode ser devido à perda de água e o evento exotérmico devido ao início da degradação da PANI e modificação da morfologia do polímero conforme reportado por Ding e outros (1999) devido provavelmente à recristalização ou reações de ligação cruzada.



FIGURA 35: Curvas DSC da amostras de PANI.

A temperatura de transição vítrea (temperatura de mudança do estado amorfo para estado cristalino) verificada neste estudo foi de 165,3°C, valor intermediário às duas observadas por Ding e outros (1999) de aproximadamente 70°C e de 250°C para PANI em pó. Abdelkader e outros (2012) estudando a estabilidade térmica de diferentes estados da PANI obteve distintos valores de temperatura de transição vítrea de 74,1°C para a básica, de 103,7°C para a forma de sal e de 126,9°C para a dopada com ácido clorídrico. Chauhan e outros (2011) estudando o comportamento térmico e condutor da base esmeraldina da PANI reportaram para diferentes condições de síntese dois significativos: um na faixa de 25°C a 60°C, creditado à evaporação de água adsorvida, e outro entre 90°C a 115°C devido possivelmente às reações de ligação cruzada entre anéis quinoidais próximos na estrutura do polímero.

Na Figura 36 pode ser observado o perfil de DSC obtido para o compósito PANI/grafite enriquecido com AgNPs, onde dois eventos térmicos aparecem, um endotérmico a 195,9°C e um exotérmico na temperatura de 292,4°C.



FIGURA 36: Curvas DSC do compósito PANI/grafite enriquecido com AgNPs.

O primeiro evento pode ser decorrente da evaporação da água e o segundo às reações cruzadas e recristalização promovidas pela elevação da temperatura. Pode ser observado um aumento da intensidade do evento exotérmico ao comparar com a curva de DSC obtida para a PANI (Figura 35) de 282,1 mJ (-75,5 J/g) para 1172,8 mJ (-252,5 J/g) que ocorre na mesma temperatura, cerca de 292°C.

A Tabela 6 apresenta comparativamente os valores de temperatura e quantidade de calor gerada nos eventos térmicos para as diferentes amostras estudadas em DSC.

termicos das diferentes amostras.								
Amostro	Тg	∆Cp	T1	Δ H1	Área 1	T2	Δ H2	Área 2
Amostra	(°C)	(J/g.°C)	(°C)	(J/g)	(mJ)	(°C)	(J/g)	(mJ)
PANI	165,3	0,378	191,0	48,9	173,5	292,2	-79,5	-282,1
PANI/Grafite+AgNPs	ND	ND	195,9	73,3	340,5	292,4	-252,5	-1172,8
Dispersão de AgNPs	-	-	106,3	143,8	2027,2	-	-	-

TABELA 6: Valores de temperatura e quantidade de calor gerada nos eventos

A análise de DSC conduzida com amostra de grafite não apresentou evento térmico e perfil descendente até a temperatura de 350°C (Figura 34). Entretanto, conforme demonstrado na Figura 37, a análise de DSC para a amostra de grafite enriquecida com AgNPs apresentou 5 eventos endotérmicos entre cerca de 25°C e 350°C, possivelmente devido a eliminação de água adsorvida por evaporação e

volatilização residuais adsorvidos no grafite, utilizados e/ou formados no preparo das AgNPs, tais como: de citrato de sódio, ácido cítrico, nitrato de sódio, nitrato de prata.



FIGURA 37: Curvas DSC da amostra de grafite enriquecido com AgNPs.

Pela análise DSC da dispersão de AgNPs, na faixa de temperatura investigada, observa-se um único evento endotérmico a temperatura T1 de 106,3°C, devido à evaporação de água conforme a Figura 38.



FIGURA 38: Curvas DSC da dispersão de AgNPs.

Mani e outros (2013) observaram perda de massa da ordem de 28% de AgNPs por TGA na faixa de estudo até 800°C e por DSC um evento endotérmico em 69°C, ao utilizar um método fitoquímico para promover a redução de Ag⁺ a Ag^o (nanopartículas), com faixa de diâmetro de 20 a 30 nm, gerando um composto estável termicamente a baixas temperaturas. Khan e outros (2011) reportaram total degradação em temperaturas superiores a 300°C, a ocorrência de pico exotérmico entre 200°C e 300°C creditada a dessorção de água. Em consonância com Mani e outros (2013), Khan e outros (2011) relataram perdas de massa em torno de 10% para temperaturas inferiores a 200°C para AgNPs de diâmetro médio de 17,5 nm.

Os resultados obtidos pela TGA estão em consonância com os reportados por Khan e outros (2011), Mani e outros (2013) e com a análise DSC para dispersão de AgNPs realizada neste trabalho, que evidenciou um único pico endotérmico na temperatura de 106,3°C (evaporação de água).

5.5 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO ELETRODO COM AgNPs

A Figura 39 apresenta os voltamogramas do eletrodo com AgNPs em diferentes velocidades de varredura de potencial.



FIGURA 39: Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo com AgNPs em solução contendo K_4 Fe(CN)₆ 10 mM em KCl 3 M vs. Ag/AgCl.

Também foi elaborada a Tabela 7 para determinar a velocidade que proporciona o melhor pico frente ao eletrodo com AgNPs.

v (mV/s)	lpa (mA)	lpc (mA)	lpa/lpc			
20	-0,024	0,099	0,24			
40	-0,192	0,180	1,07			
60	-0,230	0,206	1,11			
80	-0,278	0,240	1,16			
100	-0,322	0,262	1,23			
125	-0,365	0,284	1,28			
150	-0,405	0,298	1,36			

TABELA 7: Valores de correntes de pico catódico, pico anódico e sua razão em função da velocidade de varredura frente ao eletrodo com AgNPs.

De acordo com a Tabela 7 tal velocidade é de 40 mV/s, pois dentre as velocidades analisadas essa é a que apresenta o módulo razão entre a corrente de pico anódica (I_{pa}) e a corrente de pico catódica (I_{pc}) mais próxima de 1, ou seja, é nessa velocidade que o sistema apresenta o maior caráter de reversibilidade segundo Diao e Zhang (1996).

Baseado nos parâmetros apresentados na Tabela 7 também foi elaborado o gráfico que correlaciona as correntes de picos (catódicas e anódicas) com a raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 40) fornecido pelo eletrodo com AgNPs.



FIGURA 40: Curvas de correlação entre as correntes de pico anódicas (lpa) e catódicas (lpc) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura [(V/s)^{1/2}] fornecidas pelo eletrodo com AgNPs.

Por se tratar de um processo reversível, as correntes de pico catódica e anódica são proporcionais à concentração da substância que está sendo reduzida e oxidada, aumentando e diminuindo, respectivamente, de forma linear com a raiz quadrada da velocidade de varredura (DIAO; ZHANG, 1996).

Houve uma melhora significativa na linearidade das correntes de pico tanto anódica quanto catódica fornecida pelo eletrodo com AgNPs em relação às correntes de pico fornecidas pelo eletrodo sem tais partículas, indicando que o processo de intercalação/extração dos íons agora é controlado pela difusão dos mesmos no interior da estrutura, evidenciando que a inclusão das AgNPs aprimorou a leitura eletrodo.

Com as velocidades que proporcionaram as melhores correntes de pico frente aos eletrodos sem e com AgNPs (80 e 40 mV/s respectivamente) foi plotado os voltamogramas para os dois eletrodos (Figura 41) no intuito de verificar se a inclusão das AgNPs favoreceu algum tipo de aumento na corrente de pico.



FIGURA 41: Voltamogramas cíclicos obtidos com os eletrodos sem e com AgNPs em solução contendo K₄Fe(CN)₆ 10 mM em KCl 3 M vs. Ag/AgCl.

É possível observar claramente que as correntes de pico maiores e mais definidas foram as fornecidas pelo eletrodo com AgNPs, como esperado e confirmado pela Tabela 8.

TABELA 8: Comparação entre as correntes de pico dos eletrodos sem e com AgNPs.

Eletrodo	v (mV/s)	lpa (mA)	lpc (mA)	lpa/lpc
Sem AgNPs	80	-0,175	0,136	1,28
Com AgNPs	40	-0,192	0,180	1,07

A inserção das AgNPs proporcionou um aumento tanto na corrente de pico anódica quanto na corrente de pico catódica, além de aumentar o caráter de reversibilidade do eletrodo, uma vez que a razão |lpa/lpc| se tornou mais próxima de 1, característico de um sistema reversível (DIAO; ZHANG, 1996).

5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA HRP

A seguir (Figura 42) um dos resultados obtidos no ensaio da atividade enzimática da HRP. Foram feitos diversos ensaios de atividade enzimática, pois é necessário ter o conhecimento da atividade enzimática da HRP toda vez que for fazer um procedimento de imobilização.



FIGURA 42: Gráfico obtido para o cálculo da atividade enzimática. Variação da absorbância a 510 nm durante 1 minuto.

Sabendo que a amostra analisada foi diluída 600 vezes e que a equação da reta adquirida fornece um coeficiente angular, calcula-se a atividade enzimática de acordo com a Equação 8 apresentada no item 4.10. A atividade enzimática da solução de HRP para esta amostra foi de 933,7 U/mL.

5.7 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A Tabela 9 apresenta as médias da corrente de pico resultante de acordo com cada solução de imobilização enzimática.

Solução de	lpr média	Variância	Desvio
imobilização	(mA)	vanariola	padrão
1	0,015	9,33.10 ⁻⁰⁶	3,06.10 ⁻⁰³
2	0,155	3,10.10 ⁻⁰⁵	5,57.10 ⁻⁰³
3	0,143	6,16.10 ⁻⁰⁴	2,48.10 ⁻⁰²
4	0,181	2,86.10 ⁻⁰⁴	1,69.10 ⁻⁰²
5	0,134	4,93.10 ⁻⁰⁵	7,02.10 ⁻⁰³

TABELA 9: Médias da corrente de pico resultante em função da solução de imobilização.

5.7.1 Análise estatística da determinação da composição da solução de imobilização enzimática

Dentre os modelos matemáticos que obtiveram significância estatística (modelo linear e modelo quadrático) o modelo quadrático foi o que obteve o maior coeficiente de determinação ajustado (R²_{ajust.}), ao passo que os modelos cúbico e cúbico especial não obtiveram significância estatística conforme apresentado na Tabela 10.

TABELA 10: ANOVA para corrente de pico resultante. Significância estatística dos modelos matemáticos previstos pelo planejamento. R^2 R²ajust. Modelo p-level Linear 0.016144 0,497269 0,413480 Quadrático 0.016879 0,777769 0.688876 Cúbico Especial 0,777769 0,688876 Cúbico Completo 0,777769 0,688876

O modelo matemático proposto não descreve plenamente a corrente de pico resultante gerada pelo eletrodo com enzimas imobilizadas, pois o valor de 0,69 para o coeficiente de determinação ajustado está relativamente baixo. Essa informação está bem ilustrada na Figura 43 por meio do gráfico dos valores previstos *versus* valores observados da corrente de pico resultante onde percebe uma certa dispersão dos pontos em torno da curva.



FIGURA 43: Valores previstos versus valores observados da corrente de pico resultante.

Uma vez que o objetivo do planejamento não é o de obter um modelo matemático e sim determinar se, e quais, os componentes são relevantes em um determinado estudo, o modelo matemático gerado não é muito importante para a presente análise.

A Tabela 11 apresenta os coeficientes de regressão dos pseudocomponentes utilizados para identificar os componentes relevantes e suas interações.

TABELA 11: Coeficientes de regressão dos pseudo-componentes e suas significâncias estatísticas.

Fator	Coeficiente	p (IC*: 95%)
(A) Solução Enzimática	0,0001873	0,0000315
(B) Glutaraldeído 2,5% (%)	-0,0044553	0,0982712
(C) Albumina 1 mg/mL (%)	0,0042506	0,0962228
AB	0,0091370	0,0862246
AC	-0,0083963	0,1053623

*IC: Intervalo de Confiança.

A partir da Tabela 11 pode constatar que o fator solução enzimática é estatisticamente significativo para um intervalo de confiança (IC) de 95% visto que seu valor de *p-level* é inferior a 0,05. Os fatores glutaraldeído, albumina e a interação de segunda ordem AB (solução enzimática interagindo com glutaraldeído) são marginalmentes significativos para o mesmo intervalo de confiança pois 0,05 < p-level < 0,10, ao passo que interação de segunda ordem AC (solução enzimática interagindo com albumina) não é estatisticamente significativa para o mesmo intervalo de confiança pois o mesmo intervalo de confiança pois p-level < 0,10, ao passo que interação de segunda ordem AC (solução enzimática interagindo com albumina) não é estatisticamente significativa para o mesmo intervalo de confiança pois p-level > 0,10.

A superfície de resposta é utilizada para obtenção de faixas altas, intermediárias e baixas da corrente de pico resultante produzida pelo eletrodo com enzimas imobilizadas em função da solução enzimática, do glutaraldeído e da albumina, conforme a Figura 44.



FIGURA 44: Superfície de resposta para a corrente de pico resultante produzida pelo eletrodo com enzimas imobilizadas em função dos pseudo-componentes da mistura.

Para uma visualização mais simples da tendência da variável de resposta são criadas as curvas de nível pelo rebatimento da superfície de resposta num plano como apresentado na Figura 45.



FIGURA 45: Curvas de nível para a corrente de pico resultante produzida pelo eletrodo com enzimas imobilizadas em função dos pseudo-componentes da mistura.

Pelas curvas de nível não fica evidente a visualização da melhor composição da solução de imobilização em termos de porcentagem dos componentes originais, pois tanto as curvas de nível como a superfície de resposta são baseadas nas restrições do planejamento e não nos componentes originais. Para uma visualização adequada da melhor composição da solução de imobilização, com o objetivo de atingir a maior corrente de pico resultante, utiliza-se o diagrama ternário com restrição apresentado na Figura 46.



FIGURA 46: Diagrama ternário com restrição para a corrente de pico resultante produzida pelo eletrodo com enzimas imobilizadas em função dos componentes solução enzimática, albumina e glutaraldeído.

A região do planejamento encontra-se delimitada por um losango e as duas regiões que fornecem as maiores correntes de pico resultantes aparecem em laranja mais escuro. A primeira região indica alta corrente de pico resultante fornecida por um eletrodo com enzimas imobilizadas contendo uma solução com volume de 85% de solução enzimática, 10% de albumina e 5% de glutaraldeído e a segunda região indica alta corrente de pico resultante fornecida por um eletrodo com enzimas imobilizadas contendo por um eletrodo com enzimas imobilizadas contendo uma solução enzimática, 0,5% de albumina e 5% de glutaraldeído. Para este trabalho foi usada a solução de imobilização conforme a primeira região por utilizar um menor teor de enzima devido ao seu elevado custo.

Também foi realizada a análise quantitativa dos resíduos baseada nos testes de Kolmogorov e Shapiro-Wilk, como mostra a Figura 47. Ambos os testes admitem como hipótese nula a distribuição normal dos resíduos.



FIGURA 47: Testes quantitativos da normalidade dos resíduos para os componentes da solução de imobilização.

Os testes de Kolmogorov e Shapiro-Wilk confirmam a normalidade dos resíduos devido os valores de p e d serem maiores que 0,05 e W ser próximo de 1,0. Dessa forma a hipótese nula de que os resíduos realmente seguem uma distribuição normal é aceita, validando o teste t de Student e o teste F de Fisher realizados anteriormente.

5.8 CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DO ELETRODO

A análise da superfície por microscopia eletrônica de varredura mostrou que os eletrodos apresentaram um grau de rugosidade superficial (Figura 48A). Estas rugosidades promovem um aumento na superfície de contato do eletrodo contribuindo para o aumento do número de sítios ativos na superfície do mesmo que, por sua vez, contribuem para um aumento da área disponível para imobilização enzimática, podendo uma maior quantidade de etanol ser catalisada pela AOD.



FIGURA 48: Micrografia por MEV da superfície do eletrodo (ampliação de 1500X). A) Sem imobilização. B) Com AOD e HRP imobilizadas.

A superfície do eletrodo modificado está apresentada na Figura 48B, semelhante aos resultados obtidos por Silva *et. al.* (2011), onde há uma grande redução do número de sulcos na superfície do eletrodo indicando que foram totalmente preenchidos durante a reticulação do glutaraldeído com a AOD e com a HRP.

5.9 CURVA PADRÃO DO BIOSSENSOR ENZIMÁTICO

A Figura 49 apresenta os voltamogramas do biossensor enzimático em diferentes concentrações de etanol.



FIGURA 49: Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o biossensor enzimático em diversas concentrações de etanol.

É possível observar um aumento na corrente do sistema a medida em que se aumenta a concentração de etanol no meio.

Na Tabela 12 são apresentados os valores das correntes de pico resultantes para as diversas concentrações de etanol testadas.

Etanol P.A. (mL)	Tampão fosfato de sódio (mL)	Solução total (mL)	Etanol (g/L)	Corrente média (mA)	Variância	Desvio padrão
0,00	10,00	10,0	0,00	0,120	2,23.10 ⁻⁰⁵	4,73.10 ⁻⁰³
0,05	9,95	10,0	4,26	0,139	6,33.10 ⁻⁰⁶	2,52.10 ⁻⁰³
0,10	9,90	10,0	8,53	0,157	4,00.10 ⁻⁰⁶	2,00.10 ⁻⁰³
0,15	9,85	10,0	12,79	0,165	4,33.10 ⁻⁰⁶	2,08.10 ⁻⁰³
0,20	9,80	10,0	17,05	0,179	7,00.10 ⁻⁰⁶	2,65.10 ⁻⁰³
0,25	9,75	10,0	21,32	0,201	3,90.10 ⁻⁰⁵	6,24.10 ⁻⁰³
0,30	9,70	10,0	25,58	0,217	6,33.10 ⁻⁰⁶	2,52.10 ⁻⁰³
0,35	9,65	10,0	29,84	0,247	2,03 .10 ⁻⁰⁵	4,51.10 ⁻⁰³

TABELA 12: Diluições e correntes de pico resultantes para as diversas concentrações de etanol testadas.

Os dados da Tabela 12 foram utilizados na construção da curva padrão como mostra a Figura 50.



FIGURA 50: Curva padrão do biossensor enzimático para determinação de etanol.

A curva padrão apresenta uma linearidade positiva confirmando a oxidação do etanol pela AOD. A oxidação do etanol ocorre na superfície do biossensor provocando um fluxo de elétrons neste local. Dentro da faixa de concentração de etanol estabelecida, a medida que há um aumento na concentração de etanol maior

a quantidade de substrato ofertada à AOD, gerando um maior fluxo de elétrons confirmando os resultados obtidos por Johansson *et al.* (2003).

5.10 REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE DO BIOSSENSOR

A Figura 51 apresenta os voltamogramas dos biossensores utilizados para avaliar suas repetitividades e a Figura 52 mostra a variação de leitura de cada um desses biossensores.



FIGURA 51: Voltamogramas dos biossensores utilizados para avaliar a repetitividade.



FIGURA 52: Variação de leitura de cada biossensor para avaliar a repetitividade.

De acordo com a Figura 51 verifica-se uma pequena variação nas leituras entre os diferentes voltamogramas para os mesmos biossensores. Essa variação é melhor compreendida na Figura 52 onde as correntes de picos foram convertidas em concentração (g/L) de etanol na mistura. A repetitividade do biossensor foi considerada satisfatória, uma vez que houve pouca variação nas leituras. A variação foi de 3,6%, 2,2% e 4,5% para os biossensores 1, 2 e 3, respectivamente.

A Figura 53 apresenta os voltamogramas dos biossensores utilizados para avaliar suas reprodutibilidades e a Figura 54 mostra a variação de leitura de cada um desses biossensores com o passar dos dias.



FIGURA 53: Voltamogramas dos biossensores utilizados para avaliar a reprodutibilidade.



FIGURA 54: Variação de leitura de cada biossensor para avaliar a reprodutibilidade.

De acordo com a Figura 53 observa-se que os picos dos voltamogramas diminuem no segundo dia e no terceiro dia de leitura não há mais picos a serem observados. Essa variação é melhor compreendida na Figura 54 onde as correntes de picos foram convertidas em concentração (g/L) de etanol na mistura.

A reprodutibilidade do biossensor ao longo do tempo não foi satisfatória, uma vez que o seu funcionamento teve uma duração apenas de dois dias, e ainda assim, no segundo dia houve uma variação considerável nas leituras. Porém, a reprodutibilidade da metodologia na confecção deste dispositivo foi considerada satisfatória, indicando uma produção homogênea desses biossensores, uma vez que os resultados, obtidos na primeira leitura de cada biossensor, se apresentaram bem próximos com uma variação de leitura em torno de 9% apenas, podendo ser utilizados como biossensores descartáveis.

5.11 UTILIZAÇÃO DO BIOSSENSOR EM AMOSTRAS REAIS

De acordo com a análise em HPLC, a amostra adquirida de um posto de combustível possuía uma concentração de 787,08 g/L de etanol em sua composição e a amostra de meio fermentado oriunda de práticas laboratoriais da EQ-UFRJ possuía uma concentração de 13,69 g/L.

Uma vez que a concentração de etanol da amostra adquirida de um posto de combustível se encontrava fora dos limites de detecção da curva padrão, foi necessária uma diluição de 1:50 antes da análise com o biossensor. A concentração

de etanol da amostra do meio fermentado se encontrava nos limites de detecção da curva padrão, não sendo necessária sua diluição. Seus voltamogramas de onda quadrada estão apresentados na Figura 55.



IGURA 55: Voltamogramas de onda quadrada obtido com o biossensor enzimático nas amostras reais.

A determinação da concentração de etanol nas amostras foi baseada na corrente de pico resultante obtida pela voltametria de onda quadrada como mostra a Tabela 13.

IADELA	TABELA 15. Diluição e contente de pico resultante para as amostras reals testadas.							
	Amostra (mL)	Tampão (mL)	Total (mL)	Corrente de pico média (mA)	Variância	Desvio padrão		
Biocombustível Etanol	0,2	9,8	10	0,160	4,27.10 ⁻⁰⁵	6,53.10 ⁻⁰³		
Meio Fermentado	10	0	10	0,163	1,03.10 ⁻⁰⁵	3,21.10 ⁻⁰³		

TABELA 13: Diluição e corrente de pico resultante para as amostras reais testadas

Baseado nas correntes de pico resultantes encontradas, determina-se as concentrações de etanol na amostras de acordo com a regressão linear obtida pela curva padrão, conforme Equação 10.

$$C = \frac{|c - 0.118|}{0.004} \times Fd$$
(10)

Onde:

C: Concentração de etanol na amostra (g/L)

Ic: Corrente de pico resultante (mA)

Fd: Fator de diluição (volume total diluído/volume da amostra)

Segundo a Equação 10, a concentração de etanol encontrada na amostra do biocombustível foi de 529,17 g/L e a concentração de etanol encontrada na amostra do meio fermentado foi de 11,31 g/L, valores estes inferiores ao fornecido pela HPLC. Estima-se que essa incoerência de valores seja devida aos aditivos existentes tanto no biocombustível etanol (segredos do fabricante) quanto no meio fermentado (KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, NaCI e antiespumante) que por ventura podem causar perda de atividade enzimática das enzimas atuantes no biossensor.

CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES

Uma ampla variedade de analitos pode ser medida utilizando biossensores enzimáticos, como glicose, colesterol, ácido úrico, fenóis, etc. O etanol pôde ser determinado explorando métodos eletroquímicos com eletrodos modificados baseados em álcool-oxidase e *horseradish-peroxidase*, com montagem e operação simples uma vez que não requerem adição de um co-factor externo diferente do O₂.

O desenvolvimento de eletrodos a base de pasta de carbono para aplicação em biossensores amperométricos torna-se eficiente e prático ao se aplicar o planejamento experimental de misturas, sendo um método imprescindível para melhoria da sensibilidade do dispositivo.

Os dados estatísticos mostraram que a proporção dos componentes da matriz do eletrodo corroboraram com os valores da voltametria cíclica, sendo que a adição de nanopartículas de prata proporcionou um aumento de 9,71% no pico de corrente anódica e 32,35% no pico de corrente catódica aumentando a sensibilidade do sistema.

O planejamento experimental de misturas também se mostrou eficaz na determinação dos componentes da solução de imobilização enzimática, evitando gastos ou desperdícios de tempo e reagentes caros, uma vez a obtenção de resultados esperados.

A repetitividade do biossensor e a reprodutibilidade da metodologia na confecção deste dispositivo foram consideradas satisfatórias, porém o mesmo não ocorreu com sua reprodutibilidade ao longo do tempo, necessitando de novas pesquisas para melhorar a estabilidade do dispositivo desenvolvido.

O biossensor desenvolvido apresentou uma confiabilidade de 67,23% ao ser utilizado na medição de amostra real do biocombustível etanol e 82,61% ao ser utilizado na medição de amostras de meio fermentado oriundas de práticas laboratoriais da EQ-UFRJ, comparado ao resultado fornecido pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Tais precisões foram consideradas satisfatórias uma vez que há muito o que entender a respeito do comportamento enzimático a respeito da imobilização conjunta de álcool-oxidase e *horseradish-peroxidase*.

CAPÍTULO 7: SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

✓ Testar diferentes condições operacionais de temperatura e pH;

 ✓ Quantificar o peróxido de hidrogênio produzido durante a reação enzimática da álcool-oxidase com o etanol com o objetivo de determinar com maior precisão o teor da *horseradish-peroxidase* utilizada no biossensor;

✓ Investigar um procedimento de imobilização mais eficaz que conserve a fixação e a atividade das enzimas imobilizadas do biossensor por mais tempo;

✓ Aplicar o biossensor enzimático em outras amostras reais, como bebidas, esterilizantes, solventes, etc.;

✓ Desenvolver biossensores com fontes naturais das enzimas utilizadas neste trabalho, como tecidos vegetais como fonte de enzimas peroxidases e leveduras metilotróficas como fonte da enzima álcool-oxidase com o intuito de reduzir custos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-LATIF, M. S. et al. Fiber optic sensors: recent developments. **Analytical** Letters, v. 23, n. 3, p.375-399, 2000.

ABDELKADER, R.; AMINE, H.; MOHAMMED, B. Thermally stable forms of pure polyaniline catalyzed by an acid-exchanged montmorillonite clay called maghnite-H⁺ as an effective catalyst. **International Journal of Polymer Science**, p. 1-7, 2012.

ADELOJU, S. B.; LAWAL, A. T. Fabrication of a bilayer potentiometric phosphate biosensor by cross-link immobilization with bovine serum albumin and glutaraldehyde. **Analytica Chimica Acta**, v. 691, n. 1-2, p. 89-94, apr. 2011.

AHMADALINEZHAD, A.; CHEN, A. High-performance electrochemical biosensor for the detection of total cholesterol. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 11, p. 4508-4513, jul. 2011.

AHMED, G.; ABUBAKAR, S.; AHMED, N. M. Future prospects for ethanol fuel use - a review. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 2, n. 2, p. 49-52, 2009.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D257-99**: Standard Test Methods for DC Resistance or Conductance of Insulating Materials.

ANDRADE, L. S., et al. Estudo de efeito dos sais precursores sobre as propriedades eletrocatalíticas de eletrodos de Ti-SnO2/Sb preparados por decomposição térmica. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 866, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **ANP**. Glossário. Disponível em: ">http://www.anp.gov.br/?id=582#e>. Acesso em: 05 jun. 2014.

ARYA, S. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B.D. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p.1083–1100, 2008.

AZEVEDO, A. et al. Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, n. 2, p. 235-247, aug. 2005.

BANULS, M.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A. Chemical surface modifications for the development of silicon-based label-free integrated optical (IO) biosensors: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 777, p. 1-16, 13 mar. 2013.

BECHTOLD, M. Síntese e caracterização de nanopartículas de prata e aplicação como agente biocida em tinta poliuretânica hidrossolúvel. 2011. 116f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

BLUM, L. J.; GAUTIER, S. M.; COULET. P. R. Highly stable bioluminescence-based fiber-optic sensor using immobilized enzymes from Vibrio harveyi. **Analytical Letters**, v. 22, n. 10, p. 2211-2222, 2009.

BRATOV, A.; ABRAMOVA, N.; IPATO, A. Recent trends in potentiometric sensor arrays - a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 678, p. 149-159, 2010.

BRUST, M. et. al. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, p. 801-802, 1994.

BUCH, R. M.; RECHNITZ, G. A. Intact chemoreceptor-based biosensors: extreme sensitivity to some excitatory amino acids. **Analytical Letters**, v. 22, n. 14, p. 2685-2702, 2009.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando o** *Statistica*. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003. 260 p.

CEVIK, E.; SENEL, M.; ABASIYANIK, M. An amperometric urea biosensor based on covalent immobilization of urease on copolymer of glycidyl methacrylate and vinylferrocene. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 16, n. 1, p. 367-373, jan. 2012.

CHAUHAN, N. P. S. et al. Thermal and conducting behavior of emeraldine base (EB) form of polyaniline (PANI). **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 18, p. 118-122, 2011.

CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 29-45, 2002.

DAVIDSON, V. L. Quinoproteins: a new class of enzymes with potential use as biosensors. **American Biotechnology Laboratory**, p. 32-34, feb. 2000.

DHAND, C. et al. Recent advances in polyaniline based biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 6, p. 2811-2821, feb. 2011.

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.

DING, L.; WANG, X.; GREGORY, R. V. Thermal properties of chemically synthesized polyaniline (EB) powder. **Synthetic Metals**, v. 104, p. 73-78, 1999.

D'SOUZA, S. et al. Immobilization of the urease on eggshell membrane and its application in biosensor. **Materials Science and Engineering C-Materials For Biological Applications**, v. 33, n. 2, p. 850-854, mar. 2013.

ERDEN, P.; KILIC, E. A review of enzymatic uric acid biosensors based on amperometric detection. **Talanta**, v. 107, p. 312-323, mar. 2013.

FREE, A. H.; FREE, H. M.A simple test for urine bilirubin. **Gastroenterologia**, v. 24, p. 414-416, 2003.

FREIRE, R. et al. Direct electron transfer: An approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 230-243, mar-apr. 2003.

FREW, J. E; GREEN, M. J. Amperometric biosensors. **Analytical Proceedings**, v. 26, n. 10, p. 344-352, 2009.

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

GLAZIER, S. A.; RECHNITZ, G. A. Construction and characterization of beet stem based biosensors for oxalate. Analytical Letters, v. 22, n. 15, p. 2929-2948, 2009.

HALLOWELL, S. F.; RECHNITZ, G. A. Enzyme amplified receptor assay (ERA): a novel approach to drug detection. **Analytical Letters**, v. 20, n. 12, p. 1929-1949, 2007.

HANSEN, B. Metodologia para produção de biossensores amperométricos enzimáticos utilizando polímeros condutores: caso polianilina. 2011. 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

HERSZENHAUT, D. **Metodologia de buscas aplicada no estudo de biossensores para etenol.** 2013. 79f. Monografia (Engenharia Química) - Escola de Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

HO, M. Y. K.; RECHNITZ, G. A. Highly stable biosensor using an artificial enzyme. **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 536-537, 2007.

HOCEVAR, M. A. **Desenvolvimento de biossensores enzimáticos amperométricos utilizando nanopartículas de polipirrol**. 2001. 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalurgia e de Materiais) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

HUNSAKER JR, D. B.; MCBRAYER, J. F.; ELMORE, J. L. Ethanol production and the environment. **Energy**, v. 14, n. 8, p. 451-468, 2009.

HUSEYIN B. Y. et al. Immobilization of tyrosinase and alcohol oxidase in conducting copolymers of thiophene functionalized poly(vinyl alcohol) with pyrrole. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 332-337, 2007.

JOHANSSON, K. et al. A reagentless amperometric biosensor for alcohol detection in column liquid-chromatography based on co-immobilized peroxidase and alcohol oxidase in carbon-paste. **Journal of Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 301-316, dec. 2003.

KAMPFRATH, G; HINTSCHE, R. Plasma-polymerized thin films for enzyme immobilization in biosensors. **Analytical Letters**, v. 22, n. 11, p. 2423-2431, 2009.

KARIM, F.; FAKHRUDDIN, A. Recent advances in the development of biosensor for phenol: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio-Technology**, v. 11, n. 3, p. 261-274, set. 2012.

KARUBE, I. et al. Acetylcholine sensor based on ion sensitive field effect transistors and acetylcholine receptors. **Analytical Letters**, n. 20, p. 857-870, 2007.

KARUBE, I. et al. Biosensors for toxic compounds using immobilized animal cell membrane. **Maku**, v. 14, n. 5, p. 311-318, 2009.

KATO, N. et. al. Alcohol oxidases of Kloeckera sp. and Hansenula polymorpha: catalytic properties and subunit structures. **European Journal of Biochemistry**, v. 64, p. 341-350, 2006.

KHAN, M. A. M. et al. Structural and thermal studies of silver nanoparticles and electrical transport study of their thin films. **Nanoscale Research Letters**, v. 6, n. 434. p. 1-8, 2011.

KRISHNAMOORTHY, S. et al. An interleukin-6 ZnO/SiO2/Si surface acoustic wave biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 24, n. 2, p. 313-318, oct. 2008.

KROUTIL, W. et. al. Biocatalytic oxidation of primary and secondary alcohols. Advanced Synthesis e Catalysis, n. 346, p. 125-142, 2004.
KULP, T. J. et al. Polymer immobilized enzyme optrodes for the detection of penicillin. **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 2849-2853, 2007.

LASKY, S. J.; BUTTRY, D. A. Development of a real-time glucose biosensor by enzyme immobilization on the quartz crystal microbalance. **American Biotechnology Laboratory**, p. 8-16, feb. 2010.

LI, T. et al. Fabrication of nanoporous thin-film working electrodes and their biosensing applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 42, p. 5-11, abr. 2013.

LUO, J. et al. A new type of glucose biosensor based on surface acoustic wave resonator using Mn-doped ZnO multilayer structure. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 49, p. 512-518, nov. 2013.

LUO, S.; WALT, D. R. Avidin-biotin coupling as a general method for preparing enzyme-based fiber-optic sensors. **Analytical Chemistry**, v. 61, p. 1069, 2009.

MACDIARMID, A.; EPSTEIN, A. Secondary doping in polyaniline. **Synthetic Metals**, v. 69, n. 1-3, p. 85-92, mar. 1995.

MANI, U. et al. A simple and green method for the synthesis of silver nanoparticles using Ricinus communis leaf extract. **Progress in Nanotechnology and Nanomaterials**, v. 2, n. 1, p. 21-25, 2013.

MARTY, J. L.; SODE, K.; KARUBE, I. Amperometric determination of choline and acetylcholine with enzymes immobilized in a photocross-linkable polymer. **Analytica Chimica Acta**, n. 228, p. 49-53, 2000.

MELO, A. F. **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis**. 2008. 104f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MIRCESKI, V., GULABOSKI, R. Recent achievements in square-wave voltammetry (a review). **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 33, n. 1, p. 1-12, 2014

MONROE, D. Novel implantable glucose sensors. **American Clinical Laboratory**, v. 8, n. 12, p. 8-16, 2009.

MONROE, D. Potentiometric immunoassay. **American Biotechnology Laboratory**, p. 28-40, nov. 2006.

MORI, Y. et al. Simple and environmentally friendly preparation and size control of silver nanoparticles using an inhomogeneous system with silver-containing glass powder. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 7, p. 2799-2806, jul. 2011.

MUEHLBAUER, M. J.; GUILBEAU, E. J.; TOWE, B. C. Model for a thermoelectric enzyme glucose sensor. **Analytical Chemistry**, v. 61, p. 77-83, 2009.

MUSSATTO, S. I. et. al. Technological trends, global market, and challenges of bioethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 817-930, 2010.

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.

NUNES, G. S., JEANTY, G., MARTY, J-L. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides: Comparative study. **Analytica Chimica Acta**, v. 523, p. 107-115, 2004.

OHASHI, E.; TAMIYA, E.; KARUBE, I. A new enzymatic receptor to be used in biosensors. **Journal of Membrane Science**, n. 49, p. 95-102, 2000.

OLIVEIRA, L. M. Estudo da permeação do hidrogênio no aço 1% Cr - 0,5% Mo em diferentes soluções eletrolíticas. 2013. 59f. Monografia (Engenharia Metalúrgica) - Escola Politécnica, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

OLIVEIRA, N. M. P. de. **Biossensor para deteção do antigénio específico da próstata**. 2011. 88f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) - Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2011.

OLIVEIRA, P. R. Construção e avaliação de eletrodos modificados com hexacianoferrato de prata para a determinação amperométrica de isoniazida. 2012. 125f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

OLIVEIRA, T. et al. Biosensor based on multi-walled carbon nanotubes paste electrode modified with laccase for pirimicarb pesticide quantification. **Talanta**, v. 106, p. 137-143, mar. 2013.

PRADA, A. G-V. de. et al. Graphite-Teflon composite bienzyme amperometric biosensors for monitoring of alcohols. **Biosensors & Bioelectronics**, v.18, p.1279-1288, 2003.

PRAKASH, S. et al. Polymer thin films embedded with metal nanoparticles for electrochemical biosensors applications. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 41, p. 43-53, mar. 2013.

PRUSAK-SOCHACZEWSKI, E.; LUONG, J.; GUILBAULT, G. Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of Salmonella typhimurium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 3, p. 173-177, 1990.

RASHID, M. U., BHUIYAN, M. K. H., QUAYUM, M. E. Synthesis of silver nano particles (Ag-NPs) and their uses for quantitative analysis of vitamin C tablets. **Dhaka University Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 29-33, jun. 2013.

RAY, A. et al. Polyaniline - protonation deprotonation of amine and imine sites. **Synthetic Metals**, v. 29, n. 1, p. 151-156, mar. 1989.

RECHNITZ, G. A. Biosensors. Chemical and Engineering News, v. 5, p. 24-36, sep. 2008.

REIS, M. O. dos. **Desenvolvimento e caracterização de nanocompósitos produzidos a partir de miniemulsão acrílica aquosa contendo nanopartículas de prata**. 2011. 114f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalurgica e de Minas) - Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

RIBEIRO, J. D. Estudo analítico e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial da espécie *Pimenta dioica* Lindl. 2009. 95f. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

RIBEIRO, M. S.; ROCHA, F. R. P. A single-phase spectrophotometric procedure for in situ analysis of free glycerol in biodiesel. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 23-26. 2013.

ROE, J. N. Review: biosensor development. **Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 7, 2002.

SADIK, O. A.; MWILU, S. K.; ALUOCH, A. Smart electrochemical biosensors: from advanced materials to ultrasensitive devices. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 4287-4295, 2010.

SASSOLAS, A.; BLUM, L.; LECA-BOUVIER, B. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489-511, mai. 2012.

SATO, Y.; CHIKYU, K.; KOBAYAKAWA, K. Amino acid and urea sensors using parsley leaves as catalytic material. **Chemistry Letter**, v. 7, p. 1305-1308, 2009.

SCHNEIDER, B. H.; HILL, M. R. S.; PROHASKA, O. J. Microelectrode probes for

biomedical applications. American Biotechnology Laboratory, p. 17-23, feb. 2000.

SCHULTZ, J. S. et al. Affinity sensor: a new technique for developing implantable sensors for glucose and other metabolites. **Diabetes Care**. v. 5, n. 3, p. 245-253, 2002.

SCHULTZ, J. S. Biosensors. Scientific American, v. 2, n. 265, p. 64-69, aug. 2001.

SENILLOU, A. et al. A laponite clay-poly(pyrrole-pyridinium) matrix for the fabrication of conductimetric microbiosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 401, n. 1-2, p. 117-124, nov. 1999.

SHARMA, A.; QUANTRILL, N. Measurement of ethanol using fluorescence quenching. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 50, n. 6, p. 1161-1177, jun. 1994.

SILVA, J. S. da. **Biossensor amperométrico à base de peroxidase em matriz de bastão de grafite comercial: Estudos preliminares**. 2010. 67f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, L. M. C. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental.** 2011. 153f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SILVA, V. P. A. da. et. al. Biossensor amperométrico para determinação de peróxido de hidrogênio em leite. **Eclética Química**, v. 36, n. 2, p. 143-157, 2011.

SIMÕES, F. R. Desenvolvimento e caracterização de materiais de eletrodos modificados com polímeros condutores para a determinação eletroanalítica de pesticidas. 2005. 147f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Área Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

SMUTOK, O. et al. A reagentless bienzyme amperometric biosensor based on alcohol oxidase/peroxidase and an Os-complex modified electrodeposition paint. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 113, n. 2, p. 590-598, feb. 2006.

SOTO, A.; JAFFARI, S.; BONE, S. Characterisation and optimisation of AC conductimetric biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 23-29, jan. 2001.

SOTOMAYOR, M. D. P. T. et al. Construction and application of an electrochemical sensor for paracetamol determination based on iron tetrapyridinoporphyrazine as a

biomimetic catalyst of P450 enzyme. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 4, p. 734-743, 2008.

SOUTHGATE, E. F. **Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção de etanol**. 2011. 60f. Monografia (Bacharelado em Química Industrial) - Escola de Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SRP. Superintendência de Refino, Processamento de Gás Natural e Produção de Biocombustíveis. **Boletim do Etanol**, n. 1, fev. 2014. Disponível em: http://www.siamig.com.br/cache/Documentos/anp.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2014.

SUSANTO, H. et al. Immobilization of glucose oxidase on chitosan-based porous composite membranes and their potential use in biosensors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 6-7, p. 386-392, mai. 2013.

TOKONAMI, S. et al. Synthesis and bioanalytical applications of specifc-shaped metallic nanostructures: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 716, n. 76, 2012.

TRAORE, M. K. et al. Thermal analysis of polyaniline. Part 1. Thermal degradation of HCI-doped emeraldine base. **Synthetic Metals**, v. 40, p. 137-153, 1991.

TRETTNAK, W.; WOLFBEIS, O. S. A fiberoptic cholesterol biosensor with an oxygen optrode as the transducer. **Analytical Biochemistry**, v. 184, n. 1, p. 124-127, 2009.

TSOCHEVA, D.; ZLATKOV, T.; TERMLEMEZYAN L. Thermoanalytical studies of polyaniline 'Emeraldine base'. **Journal of Thermal Analysis**, v. 53, p. 895-904, 1998.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55-75, 1951.

VALDMAN, B.; FOLLY, R.; SALGADO, A. **Dinâmica, controle e instrumentação de processos**. Rio de Janeiro, RJ. Brasil.: Editora UFRJ, 2008.

VEITCH, N. Horseradish-peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 249-259, feb. 2004.

VIEIRA, N. C. S. **Biossensores de glicose nanoestruturados baseados em dendrímeros PAMAM e filmes finos de In₂O₃:Sn. 2006. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2006.** VOGEL, A. I. Análise química quantitativa. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 488p., 2002.

VONSIVERS, M.; ZACCHI, G. Ethanol from lignocellulosics: A review of the economy. **Bioresource Technology**, v. 56, n. 2-3, p. 131-140, may. 1996.

WALTER, B. S.; NIELSEN, T. J.; ARNOLD, M. A. Fiber-optic biosensor for ethanol based on an internal enzyme concept. **Talanta**, v. 35, p. 151-155, 2008. WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3^a ed. New York: Wiley-VCH, 272p., 2006.

WELCH, C. M.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 601–619, 2006.

XIE, B.; RAMANATHAN, K.; DANIELSSON, B. Mini/micro thermal biosensors and other related devices for biochemical/clinical analysis and monitoring. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 340-349, may. 2000.

YAGATI, A. et al. An enzymatic biosensor for hydrogen peroxide based on CeO2 nanostructure electrodeposited on ITO surface. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 47, p. 385-390, set. 2013.

YAKOVLEVA, M.; BHAND, S.; DANIELSSON, B. The enzyme thermistor-A realistic biosensor concept. A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 1-12, mar. 2013.

YIN, T.; QIN, W. Applications of nanomaterials in potentiometric sensors. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 51, p. 79-86, nov. 2013.

ZANON, N.; OLIVEIRA, O.; CASELI, L. Immbolization of uricase enzyme in Langmuir and Langmuir-Blodgett films of fatty acids: Possible use as a uric acid sensor. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 373, p. 69-74, mai. 2012.