

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

IARA PEREIRA SOARES

**POLIMERIZAÇÃO DO ÁCIDO 4-HIDROXIBENZÓICO EM ELETRODOS DE
CARBONO GRAFITE VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR
ENZIMÁTICO**

**PATOS DE MINAS
DEZEMBRO DE 2018**

IARA PEREIRA SOARES

**POLIMERIZAÇÃO DO ÁCIDO 4-HIDROXIBENZÓICO EM ELETRODOS DE
CARBONO GRAFITE VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR
ENZIMÁTICO**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Diego Leoni Franco


**PATOS DE MINAS
DEZEMBRO DE 2018**


IARA PEREIRA SOARES

Polimerização do ácido 4-hidroxibenzoico em eletrodos de carbono grafite visando o desenvolvimento de um biossensor enzimático

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:


Dr. Diego Leoni Franco – IQ - UFU
Presidente


Dra. Djenaine de Souza – IQ - UFU
Membro


Dr. Gilvan Caetano Duarte – IBTEC - UFU
Membro

Patos de Minas, Minas Gerais, 06 de dezembro de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo Dom da vida e pela força para superar todos os obstáculos.

A toda minha família, por sempre me incentivarem. De maneira especial, agradeço meus pais pelo apoio incondicional, por vibrarem comigo a cada conquista e serem meu ombro amigo nos dias difíceis, vocês são o meu exemplo.

Ao meu orientador Diego, sempre paciente e com bom humor, pela confiança, por compartilhar comigo seu conhecimento e que tornou possível a realização deste trabalho.

À professora Djenaine e ao professor Gilvan, que aqui representam todos os docentes que fizeram parte da minha formação acadêmica, o meu muito obrigada.

Aos amigos da faculdade: Isabella, Willow, Leonardo, João, Dayanne, Mikaelle e Flávia, por todos momentos compartilhados seja nos estudos ou nas festas, sem vocês essa jornada seria ainda mais difícil. As amigas de longa data, Hellen, Marielle e Ana Paula, por estarem comigo em todos os momentos.

Aos colegas do LEABE, por me acolherem tão bem e compartilharem todos os sofrimentos e as alegrias com muitas risadas nos longos dias de experimentos.

Agradeço ao CNPq, FAPEMIG, CAPES, PROPP/UFU e Rede Mineira de Química pelo suporte financeiro.

RESUMO

O estudo de novos biossensores é uma área da ciência em pleno desenvolvimento devido à diversidade de aplicações nos setores da saúde, alimentícios e ambientais. Este trabalho teve como objetivo a modificação, caracterização e otimização de uma plataforma para imobilização de biomoléculas com o intuito de desenvolver um biossensor utilizando eletrodos de trabalho de baixo custo de carbono grafite de lapiseira. O monômero 4-hidroxibenzóico foi escolhido por possibilitar a formação de um polímero funcionalizado com grupos ácido carboxílico. A formação do polímero foi realizada por Voltametria Cíclica. Experimentos eletroquímicos, morfológicos e espectroscópicos foram utilizados para caracterização do material. Aliado aos dados obtidos com o estudo de pH foi proposto um mecanismo de eletropolimerização. O sistema foi otimizado para ser utilizado na imobilização de biomoléculas onde os melhores valores foram 5,0mM de ácido 4-hidroxibenzóico, 0,5M de ácido perclórico e 30 varreduras. Dois sistemas foram construídos visando a melhor imobilização de biomolécula: um eletrodo resinado e um esmaltado. Foi comprovado que o esmaltado apresentou mais facilidade na montagem e melhores respostas eletroquímicas. A imobilização da enzima fosfatase alcalina foi realizada e a análise do substrato 4-nitrofenilfosfato foi possível pela detecção do produto da reação enzimática, 4-nitrofenol. O sistema apresentou boa resposta, além da possibilidade de desenvolvimento de biossensores para detecção de pesticidas organofosforados, e também pode permitir a detecção da enzima em solução para análise de alterações de disfunções ósseas e hepáticas no organismo humano.

Palavras-chave: Biossensor. Polimerização. Ácido 4-hidroxibenzóico. Fosfatase Alcalina.

ABSTRACT

The study of new biosensors is an area of science in full development due to the diversity of applications in the health, food and environmental sectors. The objective of this work was to modify, characterize and optimize a platform for biomolecule immobilization seeking a biosensor development using low-cost pencil carbon graphite electrodes. The monomer 4-hydroxybenzoic acid was chosen because it has the possibility to form a functionalized polymer with carboxyl groups. The formation of the polymer was performed through cyclic voltammetry. Electrochemical, morphological and spectroscopic experiments were performed for the material characterization. Allied to the data obtained by the pH study, it was proposed an electropolymerization mechanism. The system was optimized to be used in the immobilization of biomolecules and the best values were 5.0mM 4-hydroxybenzoic acid, 0.5M perchloric acid and 30 cycles. Two systems were constructed seeking the better biomolecule immobilization; a resin electrode and an enameled electrode. It was proved that the enameled presented easiness to assembly and better electrochemical responses. The immobilization of the enzyme alkaline phosphatase was performed and the substrate 4-nitrophenylphosphate was analyzed by the detection of the enzymatic reaction product, 4-nitrophenol. The system presents good response besides the possibility to develop a biosensor to detect organophosphate pesticides, as well the detection of the enzyme in solution for the analysis of bone and hepatic dysfunction in human organism.

Keywords: Biosensor. Polymerization. 4-Hydroxybenzoic acid. Alkaline phosphatase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AHB: ácido 4-hidróxibenzóico

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

BR: tampão Britton – Robinson

ECGL: eletrodo de carbono grafite de lapiseira

ECGLe: eletrodo de carbono grafite de lapiseira esmaltado

ECGLr: eletrodo de carbono grafite de lapiseira resinado

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)

EIE: espectroscopia de impedância eletroquímica

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay (arranjo de enzimas imuno-adsorvidas)

FAL: fosfatase alcalina

FT-IR: espectroscopia de infravermelho – transformada de Fourier

MES: tampão de 2-(N-morfolino) ácido etanossulfônico

MEV: microscopia eletrônica de varredura

NHS: N-Hidroxisuccinimida

PPi: pirofosfato inorgânico

TRIS: tampão de tris(hidroximetil)aminometano

VC: voltametria cíclica

VPD: voltametria de pulso diferencial

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Esquema da célula eletroquímica onde os experimentos foram realizados utilizando (A) eletrodo auxiliar de platina; (B) eletrodo de trabalho de ECGL; (C) eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0M) e; (D) solução de medida. 17
- Figura 2 - Esquema de montagem do ECGL resinado: (A) tubo de vidro; (B) tubo de vidro com grafite passando pelo capilar e deixando as duas extremidades livres; (C) acoplamento de um segmento de ponteira de micropipeta; (D) utilização de resina Araldite® 90 minutos; (E) limpeza mecânica através de lixas d'água granulometria 400 e (F) visão superior do eletrodo contendo somente a resina em volta de uma das extremidades do eletrodo de grafite. A direita, uma fotografia de como o esquema ficou ao final da preparação. 19
- Figura 3 - Esquema de montagem e funcionamento do biossensor. 20
- Figura 4 - Voltamogramas cíclicos de soluções: (A) KCl 0,5M; (B) $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM contendo KCl 0,5M; (C) $HClO_4$ 0,5M, em ECGL Pentel 0,9 mm de diâmetro, dureza HB 22
- Figura 5 - Diagrama de Nyquist para EIE de $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M. $E = +0,250V$, $\Delta E = 10,0mV$, faixa de frequência de 10^5 à 10^2 Hz, sobre eletrodo de trabalho limpo. O símbolo quadrado representa os dados experimentais e a linha representa a simulação a partir do circuito equivalente de Randles proposto no *inset*. 24
- Figura 6 - Voltamograma cíclico de $HClO_4$ 0,5M contendo 4-AHB 2,5mM, $50mV.s^{-1}$ sobre ECGL. 27
- Figura 7 - Voltamogramas cíclicos de $HClO_4$ 0,5M contendo 4-AHB 2,5mM, $50mV.s^{-1}$, 100 ciclos sobre ECGL..... 28
- Figura 8 - Voltamogramas cíclicos de $HClO_4$ 0,5M à $50mV.s^{-1}$ sobre: (a) ECGL e (b) ECGL modificado com poli(4-AHB) em. 29
- Figura 9 - Voltamogramas cíclicos (A) $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M; (B) $Ru(NH_3)_6Cl_3$ 5,0mM + KCl 0,5M. $v = 100mV.s^{-1}$ sobre: (a) ECGL e (b) ECGL modificado com poli(4-AHB). 30
- Figura 10 - Diagrama de Nyquist para EIE em $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M. $E = +0,250V$, $\Delta E = 10,0mV$, faixa de frequência de 10^5 à 10^2 Hz sobre: (a) ECGL e (b) ECGL modificado com poli(4-AHB). O símbolo quadrado representa os dados experimentais e a linha representa a simulação a partir do circuito equivalente proposto no *inset*. 31
- Figura 11 - Micrografias obtidas por MEV para (A e B) ECGL e (C e D) ECGL modificado com poli(4-AHB). Ampliação de 100x para A e C e de 5000x para B e D. 32
- Figura 12 - FT-IR de (a) 4-AHB e (b) poli(4-AHB). 33

| | |
|---|----|
| Figura 13 – Perfil de potencial de pico <i>versus</i> pH obtidos de voltamogramas cíclicos em soluções de tampão BR 0,4M contendo 4-AHB 5,0mM, 50mV.s ⁻¹ . Primeiro ponto, pH 0,5 foi obtido do voltamograma realizado em HClO ₄ | 35 |
| Figura 14 – Estruturas do 4-AHB e respectivos valores de pKa..... | 36 |
| Figura 15 – Mecanismo de eletropolimerização do 4-AHB..... | 37 |
| Figura 16 - Perfil de pico de corrente anódica (—■—) e catódica (—●—) <i>versus</i> concentração do monômero. Dados obtidos a partir de voltamogramas cíclicos de: (A) K ₃ Fe(CN) ₆ 5,0mM + KCl 0,5M, $\nu = 100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ e (B) HClO ₄ 0,5M, $\nu = 50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Polimerizações feitas com 30 varreduras em solução de HClO ₄ 0,5M contendo diferentes concentrações de 4-AHB..... | 39 |
| Figura 17 - Perfil de pico de corrente anódica (—■—) e catódica (—●—) <i>versus</i> concentração do eletrólito suporte. Dados obtidos a partir de voltamogramas cíclicos em: (A) K ₃ Fe(CN) ₆ 5,0mM + KCl 0,5M, $\nu = 100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ e (B) HClO ₄ 0,5M, $\nu = 50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Polimerizações feitas com 30 varreduras em solução de 4-AHB 5,0mM contendo diferentes concentrações de HClO ₄ | 40 |
| Figura 18 - Perfil de pico de corrente anódica (—■—) e catódica (—●—) <i>versus</i> número de varreduras. Dados obtidos a partir de voltamogramas cíclicos em: (A) K ₃ Fe(CN) ₆ 5,0mM + KCl 0,5M, $\nu = 100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ e (B) HClO ₄ 0,5M, $\nu = 50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Polimerizações feitas em solução de 4-AHB 5,0mM contendo HClO ₄ 0,5M com diferentes números de ciclos..... | 41 |
| Figura 19 - Voltamogramas cíclicos em K ₃ Fe(CN) ₆ 5,0 M + KCl 0,5M sobre: (A) ECGL e (B) ECGLr. As setas indicam o sentido do crescimento com o aumento da velocidade de varredura..... | 43 |
| Figura 20 - Perfil de corrente de pico <i>versus</i> raiz da velocidade de varredura. Dados obtidos de voltamogramas cíclicos em: K ₃ Fe(CN) ₆ 5,0mM + KCl 0,5M sobre: (A) ECGL e (B) ECGLr, (—■—) picos anódicos e (—○—) picos catódicos. | 44 |
| Figura 21 - Perfil de log da corrente de pico <i>versus</i> log da velocidade de varredura. Dados obtidos de voltamogramas cíclicos em K ₃ Fe(CN) ₆ 5,0mM + KCl 0,5 M, sobre: (A) ECGL e (B) ECGLr (—■—) picos anódicos e (—○—) picos catódicos. | 45 |
| Figura 22 - Voltamogramas de pulso diferencial em tampão TRIS 0,1M, pH 9,0, $\nu = 10\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ de (a) linha de base de ECGLr/poli(4-AHB), (b) ECGLr/FAL e (c) ECGLr/poli(4-AHB)/EDC/NHS/FAL..... | 47 |
| Figura 23 - Imagem da superfície dos eletrodos resinados. À esquerda, biossensor antes e, à direita, biossensor após a detecção do produto 4-nitrofenol..... | 48 |
| Figura 24 - Possível estrutura da resina Araldite® após a mistura do pré-polímero com o endurecedor. | 49 |
| Figura 25 - (A) Voltamogramas cíclicos de ECGL esmaltado de K ₃ Fe(CN) ₆ 5,0mM + KCl 0,5M. As setas indicam o sentido do crescimento com o aumento da velocidade de varredura; (B) Perfil de corrente de pico <i>versus</i> raiz da velocidade de varredura e (C) Perfil de log de corrente de pico <i>versus</i> log da velocidade de varredura. Dados obtidos de voltamogramas cíclicos presentes em (A), (—■—) picos anódicos e (—○—) picos catódicos..... | 50 |

- Figura 26 - Voltamogramas de pulso diferencial em tampão TRIS 0,1 M, pH 9,0, $v = 10\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ de: (a) linha de base de ECGLe/poli(4-AHB), (b) ECGLe/FAL e (c) ECGLe/poli(4-AHB)/EDC/NHS/FAL.52
- Figura 27 - (A) voltamogramas de pulso diferencial em solução tampão TRIS 0,1 M, pH 7,5 (a), 8,0 (b), 8,5 (c) e 9,0 (d), $v = 10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ sobre ECGLe/poli(4-AHB)/EDC/NHS/FAL. Solução. (B) perfil de corrente de pico *versus* pH...53

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 11 |
| 2.1 Polímeros condutores e não condutores | 11 |
| 2.2 Biossensores | 12 |
| 2.3 Biossensor enzimático | 13 |
| 2.4 Eletropolimerização..... | 13 |
| 2.5 Fosfatase Alcalina | 14 |
| 2.6 Pesticidas organofosforados | 15 |
| 3 OBJETIVOS | 15 |
| 3.1 Objetivo geral | 15 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 16 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 4.1 Montagem da célula eletroquímica | 16 |
| 4.2 Limpeza dos eletrodos de grafite..... | 17 |
| 4.3 Preparo das soluções..... | 18 |
| 4.4 Modificação dos EGCL com 4-AHB | 18 |
| 4.5 Caracterização espectroscópica e morfológica..... | 19 |
| 4.6 Imobilização da fosfatase alcalina..... | 19 |
| 4.7 Utilização do sensor para a detecção de 4-nitrofenil fosfato..... | 21 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 21 |
| 5.1 Padrão de eletrodos..... | 21 |
| 5.2 Escolha do eletrodo de trabalho | 25 |
| 5.3 Eletropolimerização do ácido 4-hidroxibenzoico..... | 27 |
| 5.4 Caracterização eletroquímica do poli(4-AHB)..... | 29 |
| 5.5 Caracterização morfológica do poli(4-AHB) | 32 |
| 5.6 Caracterização espectroscópica do poli(4-AHB) | 33 |
| 5.7 Oxidação do 4-AHB em diferentes pHs | 34 |
| 5.8 Mecanismo de eletropolimerização do 4-AHB | 37 |
| 5.9 Otimização da eletropolimerização do 4-AHB | 38 |
| 5.10 ECGL de menor área geométrica isolado com resina | 42 |
| 5.11 Detecção de 4-nitrofenol com sistema resinado | 47 |

| | |
|---|----|
| 5.12 ECGL de menor área geométrica isolado com esmalte..... | 49 |
| 5.13 Detecção de 4-nitrofenol com sistema esmaltado | 51 |
| 5.14 Detecção do 4-nitrofenol em diferentes pHs | 52 |
| 6 CONCLUSÃO | 54 |
| REFERÊNCIAS | 56 |

1 INTRODUÇÃO

Os biossensores apresentam uma grande aplicabilidade para análises ambientais e na área da saúde. O diagnóstico precoce de patologias proporciona um tratamento mais eficaz em muitos casos; para isso, é de interesse que se obtenha resultados rápidos. Os exames laboratoriais são amplamente utilizados, visando um diagnóstico preciso ou apenas para prevenção à doenças. Utiliza-se de exames generalizados e, em casos positivos, exames mais específicos devem ser realizados. Porém grande parte desses exames requer um especialista para sua realização e análise dos resultados, além de equipamentos e reagentes de custos elevados.

A enzima Fosfatase Alcalina (FAL) está presente no corpo humano, sendo encontrada em maiores concentrações nos ductos biliares do fígado e nos tecidos ósseos, mas também em menores concentrações nos rins, intestino e placenta. A FAL é classificada na subclasse das enzimas fosfatases (Phosphoric Monoester Hydrolases, EC 3.1.3) da classe das hidrolases. Essa enzima tem como função promover a catálise de um ácido de um monoéster ortofosfórico em presença de água em um álcool e ácido ortofosfórico (HATTORI et al., 1998).

Como a FAL está presente nos ductos biliares do fígado e nos tecidos ósseos em maior concentração, alterações nos níveis dessa enzima presente no sangue pode ser indício de uma série de patologias. Desta forma, a detecção dos níveis de FAL se mostra como uma alternativa para o diagnóstico de alterações hepáticas, intestinais e ósseas. Atualmente, a FAL pode ser detectada por ensaios colorimétricos, fluorométricos e imunoenaios. Todos esses ensaios são comerciais, porém necessitam de equipamentos laboratoriais específicos, mão de obra especializada, tempo maior de análise além de um custo mais elevado. Por isso, é de interesse que novos métodos de diagnósticos mais rápidos, de fácil interpretação para que qualquer pessoa possa realizar, além de mais baratos e confiáveis sejam elaborados com novas tecnologias disponíveis, e os biossensores se tornam uma boa opção para facilitar esse diagnóstico.

Os biossensores podem ter enzimas, anticorpos, receptores, ácidos nucléicos e aptâmeros imobilizados em seus transdutores; que podem ser eletroquímicos, piezoelétricos ou calorimétricos (CALIL; SILVA, 2018); apresentam alta especificidade, baixo custo e rápido diagnóstico. Nos biossensores enzimáticos a enzima de interesse é imobilizada no transdutor em que é detectado o sinal proveniente da catálise enzimática do substrato em

produto. Os transdutores podem ainda ter sua superfície modificada para uma melhor interação com o analito-alvo. O sinal proveniente da diminuição da concentração do(s) substrato(s), aumento da concentração do(s) produto(s) (WANG, 2008) ou através da inibição dos sítios ativos da enzima por inibidores enzimáticos específicos (MARQUES; YAMANAKA, 2008) são os mais comuns.

Visando então uma melhor detecção da enzima FAL para o diagnóstico de algumas patologias clínicas, os biossensores se mostram uma boa opção. A modificação da superfície do eletrodo com filme polimérico funcional torna-se necessária para a imobilização enzimática. Desta forma, obtendo resultados rápidos, confiáveis, um custo menor do que os exames médicos laboratoriais, além da fácil interpretação não necessitando de uma mão de obra especializada. Através desse mesmo sistema, o biossensor pode ser utilizado para a detecções ambientais, de pesticidas organofosforados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Polímeros condutores e não condutores

A utilização de polímeros formados eletroquimicamente, e que contenham grupos funcionais específicos auxiliam em uma das etapas mais importantes na preparação do biossensor: a imobilização do composto biológico de interesse. Além de possuírem características de interesse, como a proteção do eletrodo contra a adsorção de analitos inespecíficos, estabilidade ao ar e em soluções aquosas, também apresentam facilidade no controle de formação do filme, em espessura e quantidade.

Desde a descoberta dos polímeros condutores (SHIRAKAW et al., 1977), sua caracterização e aplicações em biossensores têm sido estudadas. Estes são caracterizados pelas ligações π entre os carbonos conjugados sobre toda a cadeia polimérica e possuem as mesmas propriedades mecânicas que os polímeros convencionais, aliados às propriedades elétricas como condutividade, alta afinidade eletrônica e atividade redox (AYDEMIR; MALMSTRÖM; TRAVAS-SEJDIC, 2016).

Polímeros não-condutores produzidos por eletropolimerização possuem crescimento auto-limitado e formam um filme polimérico ainda mais fino do que os filmes poliméricos condutores. Devido a essa característica, possuem um tempo de resposta rápida já que os

substratos e produtos difundem facilmente (FRANCO, 2007). Apresentam ainda, seletividade, alta reprodutibilidade e alta permeabilidade, podendo se aproveitar dos grupos funcionais presentes para ligações covalentes com materiais de interesse.

A formação destes polímeros na superfície dos transdutores é realizada pela síntese eletroquímica-química-eletroquímica (ECE), este mecanismo consiste em uma reação química de polimerização na solução do eletrólito suporte, entre duas reações de transferência de elétrons (RIBEIRO et al., 2016). Para a eletropolimerização pode ser utilizada a técnica de Voltametria Cíclica (VC), (ALVES et al., 2016) a qual permite obter informação sobre o comportamento redox da reação e sem a necessidade de iniciadores para a formação do polímero.

2.2 Biossensores

Desde a criação do primeiro biossensor para detecção de glicose, o desenvolvimento de novos dispositivos vêm sendo estudados, devido as suas características vantajosas comparados com as análises tradicionais laboratoriais. Os biossensores são seletivos, específicos, com resultados rápidos, são métodos baratos, além de não necessitarem de uma mão de obra especializada (ALVES, 2014.).

Para obter a melhor eficiência na aplicação do biossensor, vários parâmetros devem ser analisados durante a formação do polímero, e este deve ser caracterizado. Dentre os materiais mais comumente utilizados como transdutores estão o ouro (GIMÉNEZ-GÓMEZ et al., 2016), platina (HUY et al., 2013.) e carbono grafite (FRANCO, et al., 2008). Mais recentemente, o uso de eletrodos de carbono grafite de lapiseira (ECGL) também tem sido descrito (IZADI et al., 2016; ENSAFI; KHODDAMI; REZAEI, 2017).

Os ECGL apresentam grandes vantagens, possuem baixo custo, e são encontrados facilmente em todos os lugares. Oferecem superfícies que podem ser facilmente manipuladas, e então renovadas com um polimento simples e rápido. Muitas vezes não necessitam de um pré-tratamento, apresentando respostas eletroquímicas comparáveis aos eletrodos de grafite comercial, e algumas vezes até melhores, oferecendo melhor possibilidade de miniaturização (TORRINHA et al.; 2018).

Os biossensores também são classificados quanto ao tipo de molécula biológica utilizada, podendo ser enzimas (ZHANG et al., 2018), anticorpos (POHANKA, 2018), células eucarióticas e procarióticas (WEN et al., 2014), e ácidos nucléicos (ALVES et al., 2016).

2.3 Biossensor enzimático

Exceto por um pequeno grupo de RNAs com atividade catalítica, todas as enzimas são proteínas. São essenciais em nosso organismo, sendo responsáveis por catalisar reações químicas que são essenciais para a manutenção da vida. O que caracteriza as enzimas é sua alta seletividade na conversão de um substrato em produto (NELSON; COX, 2014), o que as tornam uma importante ferramenta para os biossensores a fim de detectar analitos com especificidade.

Como em todos os biossensores, a imobilização da enzima sobre o transdutor é um passo crucial. É necessário que durante essa etapa a enzima seja imobilizada, mas sem perda da atividade biológica. Diversos estudos apresentam os polímeros como uma importante ferramenta para auxiliar neste processo de desenvolvimento dos biossensores.

São relatadas quatro técnicas para a imobilização da biomolécula: adsorção física (JE, DRYCHOWSKA et al., 2015), ligação covalente (SOYLEMEZ et al., 2013), reticulação (HERVÁS PÉREZ; LÓPEZ-RUIZ; LÓPEZ-CABARCOS, 2016) e aprisionamento (CHU et al., 2012).

A escolha de monômeros que podem apresentar grupos funcionais presentes na malha polimérica permite a possibilidade da imobilização de biomoléculas através de fortes e irreversíveis ligações covalentes ou através de reticulação, caso haja um agente bifuncional disponível, o que torna o sistema mais confiável para diversas aplicações. A adsorção física apresenta desvantagens devido ao fato das adsorções poderem ser reversíveis, diminuindo e dificultando a reprodutibilidade. O aprisionamento também apresenta grandes desvantagens, pois, como é feito a imobilização de biomoléculas junto com a polimerização, a garantia dos sítios ativos estarem indisponíveis aumenta consideravelmente.

2.4 Eletropolimerização

O conhecimento da biomolécula desejada é o ponto chave para a escolha do monômero a ser polimerizado sobre o transdutor. Monômeros com anel aromático ligado a um grupamento carboxílico já foram relatados como uma boa escolha para a polimerização, servindo como um material funcionalizado para a ligação com os grupamentos amino de enzimas (SOYLEMEZ et al., 2013).

Através da técnica de VC, a formação eletroquímica do polímero derivado do ácido 4-hidroxibenzoico (4-AHB), utilizando ácido perclórico como eletrólito suporte, foi descrita em eletrodos de carbono grafite comerciais (FERREIRA, et al., 2011).

2.5 Fosfatase Alcalina

Ectonucleotidases são enzimas responsáveis por hidrolisar nucleotídeos extracelulares, sendo divididas em quatro famílias: ENTPDase (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase); E-NPP (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase); fosfatases alcalinas; e ecto-5'-nucleotidase. Apresentam-se ancoradas à membrana plasmática das células com o sítio ativo exposto para o meio extracelular e também na forma solúvel, com atividade em pH alcalino (FURSTENAÛ, 2010).

As FAL podem hidrolisar diversos compostos que contenham fosfato, dentre eles, fosfatos de glicose, pirofosfato inorgânico (PPi), polifosfatos inorgânicos, fosfatidatos e *p*-nitrofenil fosfato. Podem ainda, ser divididas em dois grupos: fosfatase alcalina não específica tecidual e fosfatase alcalina específicas do tecido. Sendo que as fosfatases alcalinas do tecido se dividem entre fosfatase alcalina placentária, fosfatase alcalina intestinal, e fosfatase alcalina de células germinativas (RASHIDA; IQBAL, 2015).

Como a FAL está presente nos dutos biliares do fígado e nos tecidos ósseos em maior concentração, há um acúmulo da enzima, que é liberada na corrente sanguínea quando alguma irregularidade ocorre nesses órgãos. Sendo assim, um indício de patologias como a colestase (ARAÚJO et al., 2001), doença de Paget (CUNDY; REID, 2012), tumores ósseos (AYDEMIR et al., 2012), hiperparatireoidismo (EMAM et al., 2012), osteomacia e raquitismo (NAGATA et al., 2011). Associadas aos altos níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são indicativos de danos hepáticos (DEIRDRE, 2015). Assim, a detecção dos níveis de FAL torna-se uma alternativa para o diagnóstico de alterações hepáticas, intestinais e ósseas.

Atualmente a enzima FAL é detectada em ensaios colorimétricos e fluorométricos em exames de sangue de rotina utilizando um substrato comum, *p*-nitrofenil fosfato (pNPP), que é catalisado em presença de água em *p*-nitrofenol e ácido fosfórico. Como gera um fenóxido, produz uma coloração amarelada que pode ser detectada a 405 nm espectrofotometricamente. O ELISA também pode ser utilizado, método em que anticorpos secundários interagem com a enzima para a detecção em imunoenaios.

É relatada a imobilização da FAL por reticulação e detecção de cafeína em eletrodos

de ouro (AKYILMAZ; TUREMIS, 2010), e por ligação covalente em um biossensor condutimétrico para a determinação de fosfatos em soluções aquosas (UPADHYAY; VERMA, 2015). Assim, estes trabalhos demonstram a possibilidade da imobilização da enzima de diferentes formas, sem a perda de atividade catalítica.

2.6 Pesticidas organofosforados

Para manter a alta produção na agricultura, pesticidas são amplamente utilizados para o combate a pragas que danificam as plantas. Grande parte dos pesticidas são tóxicos, podendo levar a graves doenças caso haja contato com o produto. Observa-se que apesar da grande utilidade para a agricultura, eles tornam-se poluentes, sendo encontrados no solo e água (SILVA, 2011).

Por apresentar uma degradação mais rápida, e menores efeitos ao meio ambiente, pesticidas organofosforados passaram a substituir a primeira classe de pesticidas descoberta: os organoclorados. Os organofosforados são capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase, que é responsável por hidrolisar a acetilcolina. A acetilcolina é essencial para os impulsos nervosos. Através da inibição da acetilcolinesterase, ocorre a paralisia e morte de insetos (BARBOZA et al., 2018).

Devido à capacidade de lixiviação desses compostos e os efeitos tóxicos em organismos aquáticos e humanos, a detecção desses compostos mostra-se importante. Utilizando a enzima acetilcolinesterase, um biossensor enzimático amperométrico foi desenvolvido utilizando eletrodos de grafite HB, para a detecção desses compostos (WILKINS et al.; 2000). Baseado na especificidades da enzima FAL para composto organofosforados, esta é uma alternativa a esses sistemas para um novo biossensor enzimático.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho consiste em utilizar eletrodos de trabalho modificados com polímeros derivados de ácido 4-hidróxibenzóico que apresentam grupos funcionais para a

imobilização da fosfatase alcalina, na intenção de utilizá-la para detectar pesticidas organofosforados.

3.2 Objetivos específicos

- Modificar eletrodos de carbono grafite com os polímeros derivados do ácido 4-hidroxibenzoico;
- Caracterizar o polímero através de experimentos eletroquímicos, morfológicos e espectroscópicos;
- Estudar as melhores condições de eletropolimerização, como: concentração do monômero e do eletrólito suporte, número de varreduras, pH;
- Ativar os eletrodos modificados com poli(ácido 4-hidroxibenzoico) com EDC/NHS para a imobilização da fosfatase alcalina;
- Estudar as melhores condições de imobilização da fosfatase alcalina e detectar o produto da catálise enzimática.

4 MATERIAL E MÉTODOS

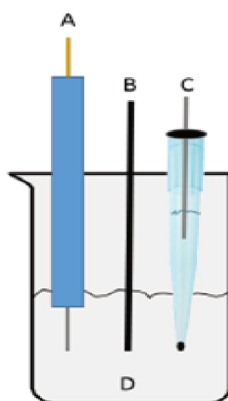
Os experimentos eletroquímicos foram realizados no Laboratório de Eletroquímica Aplicada a Biotecnologia e Engenharia de Alimentos (LEABE), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Campus Patos de Minas. A Espectroscopia de Infravermelho foi realizada no Laboratório de Quimiometria do Triângulo (LQT) da UFU no Campus em Uberlândia, e as Microscopias Eletrônicas de Varredura (MEV) foram feitas no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UFU no Campus em Uberlândia. Todas soluções foram preparadas com água deionizada pelo sistema de osmose reversa modelo 0550LX-Gehaka e utilizando-se reagentes analíticos de alta pureza.

4.1 Montagem da célula eletroquímica

Para a realização dos experimentos eletroquímicos foi utilizado o potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT204, da Metrohm, com o software NOVA

2.0.2, também da Metrohm. Foi utilizada uma célula eletroquímica de compartimento único, contendo três eletrodos: como eletrodo de referência o eletrodo de prata, cloreto de prata, cloreto de potássio 3M (Ag/AgCl/ KCl 3M), como eletrodo auxiliar o eletrodo de platina e como eletrodo de trabalho, o eletrodo de carbono grafite de lapiseira 0,9mm, de dureza HB da marca Pentel®, super Hi-Polyme 505C, juntamente com outras diferentes marcas para testes eletroquímicos preliminares.

Figura 1 - Esquema da célula eletroquímica onde os experimentos foram realizados utilizando (A) eletrodo auxiliar de platina; (B) eletrodo de trabalho de ECGL; (C) eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0M) e; (D) solução de medida.



Fonte: Própria (2018)

4.2 Limpeza dos eletrodos de grafite

Os ECGL foram usados nos estudos de polimerização do monômero, caracterizado pelas técnicas de VC, Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) e MEV.

Por se tratarem de eletrodos de grafite comuns, é feito em sua superfície, um banho de cera que recobre os poros, dando um aspecto mais liso à superfície (TORRINHA et al.; 2018), o que facilita o mecanismo de ejeção na lapiseira. Para retirar essa cera que é isolante, os ECGL foram polidos com lixa d'água, número 400, lavados com água deionizada e levados ao banho de ultrassom por 10 minutos para remover os resíduos que possam ter ficado na superfície após o polimento. Visando aumentar a sensibilidade e estabilidade ao longo dos experimentos (NEZHADALI; MEHRI; SHADMEHRI, 2018), os ECGL após o polimento foram pré-tratados aplicando-se um potencial de -1,5V em 0,5M de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a $0,1V.s^{-1}$ por 100 segundos.

4.3 Preparo das soluções

Para a realização dos experimentos foram utilizadas soluções aquosas de H_2SO_4 0,5M, soluções de ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 5,0mM em meio de cloreto de potássio (KCl) 0,5M, soluções de cloreto de hexaaminorutênio II ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$) 5,0mM em meio de KCl 0,5M, soluções de KCl 0,5M, soluções de ácido 4-hidroxibenzoico (4-AHB) 5,0mM em ácido perclórico (HClO_4) 0,5M, soluções com HClO_4 0,5M, soluções de tampão tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) 0,1M pH 9,0; soluções de 4-nitrofenilfosfato 1,0mM em tampão TRIS, soluções de 1-etil-3dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0,05M e de N-hidroxisuccinimida (NHS) 0,016M, em tampão de 2-(N-morfolino)ácido etanossulfônico (MES) 0,1M pH 4,5. Nos experimentos de otimização algumas destas concentrações foram alteradas.

A solução de enzima fosfatase alcalina foi preparada seguindo-se a sugestão informada pelo fabricante. Informações da enzima: Fosfatase alcalina de mucosa intestinal bovina – BioUltra, tamponada em solução aquosa de glicerol, ≥ 6500 DEA unidades/mg proteína, Sigma-Aldrich – frasco de 10kU – 20,0mg/mL – 7024U/mg – 0,07mL. A enzima no frasco original foi diluída com 3,0mL de tampão TRIS, pH 9,0 contendo 20,0mM de cloreto de magnésio até uma concentração final de $3,278\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, e esta foi chamada de solução estoque e armazenada em congelador à -12°C até sua utilização.

4.4 Modificação dos EGCL com 4-AHB

Após os eletrodos de grafite serem polidos e passarem pelo H_2SO_4 , 1cm de superfície (área geométrica de $0,289\text{cm}^2$) foi modificado com o filme polimérico. Foram realizadas VC em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em KCl e em solução de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ em KCl, e todas as respostas nestas soluções foram comparadas, a fim de obter um padrão de todos os eletrodos a serem modificados. Para comprovar a limpeza dos eletrodos, do eletrólito suporte e da célula eletroquímica, foram realizadas VC em HClO_4 antes da modificação da superfície dos eletrodos com o polímero. Através de VC foi formado o polímero derivado do monômero 4-AHB.

Com o poli(4-AHB) sobre a superfície dos eletrodos, eles foram novamente avaliados em soluções de HClO_4 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$. As respostas nessas soluções foram analisadas, pois caracterizavam o filme formado. Assim, a fim de obter as melhores

condições de formação do polímero, os estudos de concentração do monômero, concentração do eletrólito suporte e número de varreduras de potencial foram realizados.

4.5 Caracterização espectroscópica e morfológica

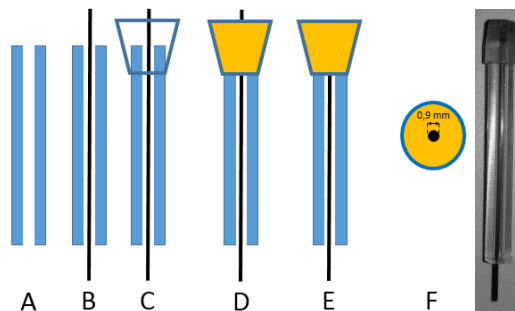
O material polimérico foi caracterizado morfológicamente através de MEV. Foi utilizado um microscópio VEGA3 da TESCAN, magnificações de 100 e 5000 vezes, com cobertura de ouro, e tensão de aceleração de 5kV.

O material formado no eletrodo foi extraído com acetonitrila em banho de ultrassom por 1 hora. O solvente foi removido por decantação. O sólido foi colocado em placa de Petri e o solvente residual foi evaporado à temperatura ambiente. Polímero extraído e monômero puro foram analisados por Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) utilizando um modelo Spectrum 2 FT-IR da Perkim-Elmer.

4.6 Imobilização da fosfatase alcalina

Visando a miniaturização do eletrodo e possibilidade de gotejamento de material biológico sobre a superfície dos eletrodos com eficiência, dois sistemas de montagem do eletrodo foram avaliados, um utilizando resina Araldite® e outro utilizando base comercial para unhas (esmalte). Desta forma foi estudada diferentes formas de utilização do ECGL. O esquema abaixo ilustra a montagem de um tubo de vidro capilar em torno do grafite de modo a utilizarmos somente a área circular de uma das extremidades do eletrodo.

Figura 2 - Esquema de montagem do ECGL resinado: (A) tubo de vidro; (B) tubo de vidro com grafite passando pelo capilar e deixando as duas extremidades livres; (C) acoplamento de um segmento de ponteira de micropipeta; (D) utilização de resina Araldite® 90 minutos; (E) limpeza mecânica através de lixas d'água granulometria 400 e (F) visão superior do eletrodo contendo somente a resina em volta de uma das extremidades do eletrodo de grafite. A direita, uma fotografia de como o esquema ficou ao final da preparação.



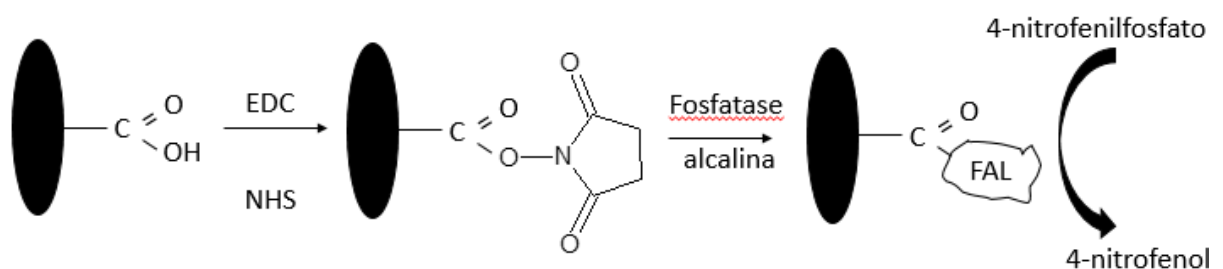
Fonte: Própria (2018)

Como pode ser visto neste esquema, os ECGL foram montados de modo que somente a superfície circular de 0,9mm de diâmetro, área geométrica de $6,36 \times 10^{-3} \text{cm}^2$ estivesse disponível para entrar em contato com as soluções. Para garantir similaridade nas respostas eletroquímicas, foram utilizadas soluções padrão de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e, medidas de VC foram comparados os eletrodos de áreas cilíndricas (ECGL) e circulares utilizando resina (ECGLr).

Outro sistema montado foi utilizando ECGL sem a necessidade de um tubo de vidro, porém com a utilização de um esmalte de unhas. Esmaltes para unhas não são novidades e já foram muito aplicados na preparação eletrodos de grafite (PRADELA-FILHO et al., 2017) e de ouro (WANG; PAMIDI, 1997) para isolamento de área. Se funcional, é extremamente vantajoso, pois facilita a montagem do sistema eliminando a utilização de tubos de vidro e resinas com cura de 90 minutos. Ainda é possível utilizar esmaltes de secagem rápida e reutilizar o eletrodo para outros experimentos após limpeza mecânica. Simplesmente os eletrodos foram imersos no frasco contendo o esmalte, removidos e deixados secar à temperatura ambiente (25°C) por 10 minutos. Após esse tempo, apenas a superfície de uma das extremidades foram polidas assim como feito na seção 4.2, obtendo assim os eletros esmaltados (ECGLe).

Assim, as melhores condições de formação do filme polimérico estudadas foram avaliadas nos ECGLr e ECGLe. A partir da caracterização do filme polimérico, sabendo-se da presença dos grupos funcionais de ácidos carboxílicos livres em sua estrutura, estes foram ativados por imersão em solução contendo EDC/NHS por 1 hora. Após esse tempo, sobre os eletrodos foi imobilizada a enzima FAL a partir da solução estoque $1,4\mu\text{L}$ (4,6 U) por gotejamento por 30 minutos. Após lavagem em tampão TRIS o biossensor estava pronto para uso. Um esquema deste sistema pode ser visto na figura 3.

Figura 3 - Esquema de montagem e funcionamento do biossensor.



4.7 Utilização do sensor para a detecção de 4-nitrofenil fosfato

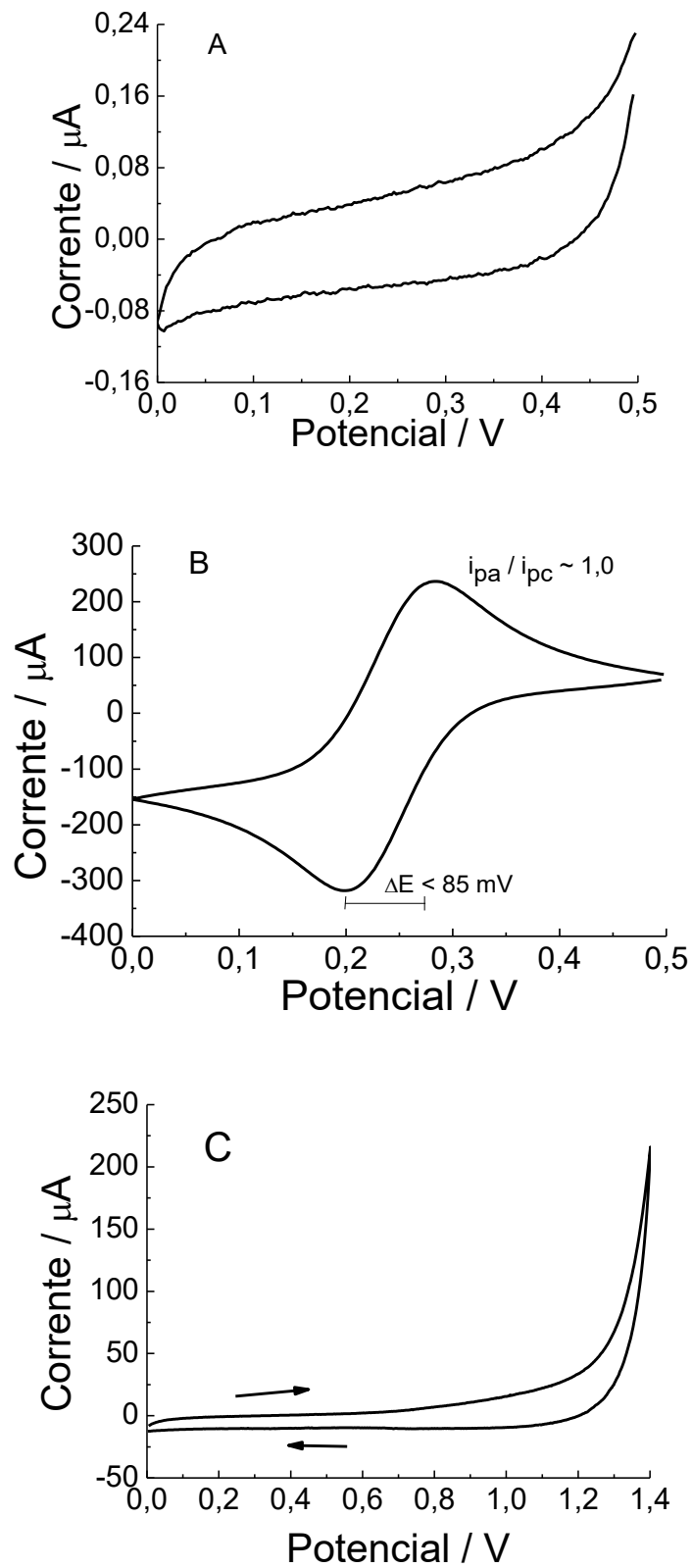
O sensor construído com polímero/enzima foi utilizado para identificação do 4-nitrofenil fosfato. O sensor contendo eletrodo/polímero/enzima catalisa o substrato 4-nitrofenil fosfato em 4-nitrofenol, e este é detectado eletroquimicamente por Voltametria de Pulso Diferencial (VPD). A resposta eletroquímica na ausência da enzima também foi analisada, a fim de comparar o perfil eletroquímico da linha de base (sem enzima) e diferenciar das análises (detecção do biossensor).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Padrão de eletrodos

Os estudos foram iniciados com a comprovação da eficiência eletroquímica do eletrodo de trabalho de carbono grafite de lapiseira. O processo de polimerização depende além da funcionalidade do eletrodo, da possibilidade de utilizá-lo nas faixas de potenciais comuns nesse tipo de estudo eletroquímico. Os primeiros estudos (Figura 4) além de mostrarem que é possível sua utilização ainda pode fornecer informações importantes acerca da solução de trabalho.

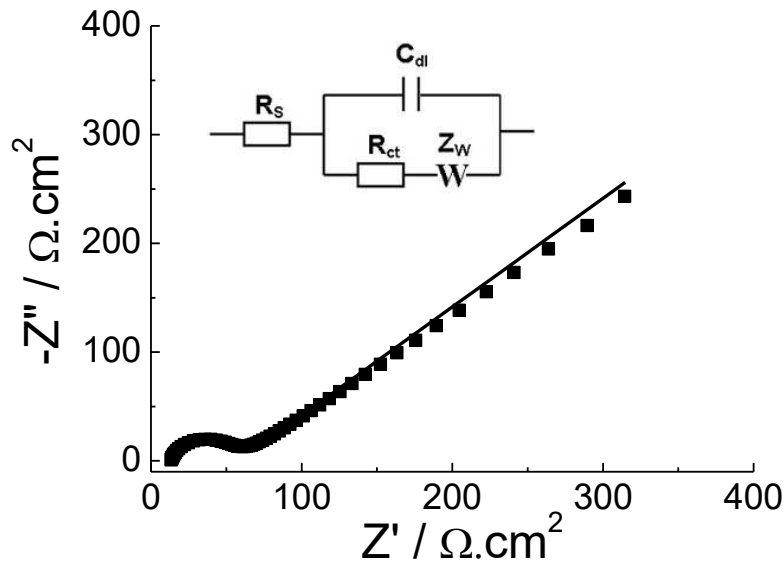
Figura 4 – Voltamogramas cíclicos de soluções: (A) KCl 0,5M; (B) $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM contendo KCl 0,5M; (C) $HClO_4$ 0,5M, em ECGL Pentel 0,9 mm de diâmetro, dureza HB



Fonte: Própria (2018)

Um dos estudos mais comuns para comprovar a eficiência e condicionamento do eletrodo de trabalho é a VC utilizando o composto $K_3Fe(CN)_6$ ou $K_4Fe(CN)_6$. O perfil eletroquímico é utilizado como parâmetro de qualidade em vários estudos. Antes disso, na Figura 4A, pode-se observar um voltamograma cíclico em solução contendo apenas o eletrólito suporte KCl. A mesma faixa de potencial utilizada para esta solução será utilizada para o $K_3Fe(CN)_6$. Observa-se a ausência de resposta faradaica na região de interesse, o que mostra inicialmente que não há a presença de interferentes tanto no KCl, quanto na água utilizada como solvente tanto na superfície do próprio eletrodo. O perfil voltamétrico clássico é observado na figura 4B para o $K_3Fe(CN)_6$. De acordo com a equação de Nernst, o mínimo de diferença de potencial a ser observado, em um sistema reversível com transferência de 1 elétron, é de cerca de 59mV. Valores próximos são indicativos que o eletrodo apresenta superfície limpa, permitindo que a reversibilidade do par redox Fe^{2+}/Fe^{3+} seja observada. Desta maneira considera-se o eletrodo eficiente para o trabalho, assim como a razão entre o pico de corrente anódico com o pico de corrente catódico próximo do valor unitário. Como a concentração do analito é diretamente proporcional ao valor de corrente, o valor unitário indica que todo material que foi reduzido inicialmente foi oxidado na varredura inversa. Caso isso não ocorra, alguma adsorção ou instabilidade do analito ou alguma reação química do produto formado pode estar acontecendo na superfície do eletrodo. Como o comportamento do $K_3Fe(CN)_6$ é padrão nestas condições, apenas se a superfície do eletrodo não estiver com bom condicionamento é que a diferença será maior. A figura 4C apresenta o voltamograma cíclico na faixa de potencial de polimerização do ácido 4-hidróxibenzóico em solução contendo apenas o eletrólito suporte. Como pode ser visto, assim como na figura 1A, não há nenhuma resposta faradaica na região de interesse o que mostra além do $HClO_4$ e da água estarem sem contaminantes, que o eletrodo também pode ser utilizado. A figura 5 apresenta o comportamento do eletrodo de trabalho utilizando-se EIE.

Figura 5 - Diagrama de Nyquist para EIE de $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M. $E = +0,250V$, $\Delta E = 10,0mV$, faixa de frequência de 10^5 à 10^2 Hz, sobre eletrodo de trabalho limpo. O símbolo quadrado representa os dados experimentais e a linha representa a simulação a partir do circuito equivalente de Randles proposto no *inset*.



Fonte: Própria (2018)

É esperado, para esse sistema a presença de um pequeno semi-círculo nas regiões de alta frequência seguido de um comportamento linear com uma inclinação próxima a 45° na região de baixa frequência. Como em todo sistema onde há uma interface de um eletrodo sólido em contato com uma solução líquida, há uma pequena contribuição do R_s (resistência da solução) no valor simulado de $13,3\Omega$. Este é um ótimo valor considerando-se que eletrodos de carbono grafite comerciais apresentam respostas na faixa de $4 - 10\Omega$. Em frequências mais baixas o semi-círculo indica a presença de uma resistência à transferência de carga (R_{ct}) e uma capacitância (C_{dl}). Como o nome propriamente diz, o elemento R_{ct} refere-se à resistência na transferência de carga entre o analito e o eletrodo. Quanto menor a resistência, menor é o impedimento no processo redox indicando um eletrodo com superfície mais condutora e um analito com processo difusional rápido. O valor de $R_{ct} = 46,0\Omega$ mostra baixa resistência, aceitável por ser um eletrodo não convencional. O elemento C_{dl} ($6,68\mu\Omega^{-1} \cdot s^{0,88}$) representa a capacitância referente à existência da dupla camada elétrica presente nos sistemas eletroquímicos. Em baixas frequências, o sistema é governado pelo transporte de massa (parte linear do gráfico) representada pelo elemento resistivo de Warburg ($Z_w = 3,48m\Omega \cdot s^{0,5}$). Para nossos objetivos, o valor de R_{ct} é mais do que o suficiente para definirmos a qualidade dos sistemas em relação à eficiência do eletrodo e avaliarmos as alterações frente a uma possível modificação com um material polimérico.

5.2 Escolha do eletrodo de trabalho

Wang (WANG; KAWDE; SAHLIN, 2000) publicou um trabalho onde mostra a importância de utilizar carbonos grafites de lapiseira como eletrodos. Dentre os mais diversos tipos de material em relação à dureza, foi determinado que a dureza HB apresentou os melhores resultados. Desta maneira, neste trabalho, para utilização do melhor grafite para os experimentos eletroquímicos, foram testadas 10 marcas diferentes encontradas no mercado nacional, todas com dureza HB. Para tal, a análise das diferenças de potencial e razão de pico de corrente anódico e catódico em solução de ferricianeto de potássio foi utilizado juntamente com a análise dos valores de R_{ct} obtidos através dos experimentos de EIE. Além disso, o perfil voltamétrico em ácido perclórico, necessário para os processos de polimerização foram feitos para avaliar a possível presença de contaminantes nos eletrodos (lembrando obviamente que todos são fabricados com o intuito da escrita e não de experimentos químicos). Observou-se também a presença ou ausência de comportamento faradaico em solução de hidróxido de sódio pela possibilidade de trabalharmos em ambientes básicos (como é o caso da enzima fosfatase alcalina) como também em tampão fosfato salino pH 7,4 (por ser o tampão mais utilizado em eletroquímica em sistemas similares ao biológico). Os dados estão presentes na tabela 1 abaixo.

Tabela 1 - Respostas eletroquímicas de 10 diferentes marcas de carbono grafite de lapiseira (B1 à B10). Potenciais de pico e correntes de pico foram obtidas em $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M através de VC entre +0,5 e 0,0V, $v = 100mV.s^{-1}$. EIE foi realizada na mesma solução, $E = +0,250V$, $\Delta E = 10,0mV$, faixa de frequência de 10^5 à 10^2 Hz. Soluções aquosas contendo $HClO_4$ 0,5M, NaOH 0,5M e PBS, pH 7,4, 0,1M foram utilizadas e voltamogramas cíclicos foram realizados na faixa de potencial de +0,0 à +1,0V, $v = 50mV.s^{-1}$. A = ausência de resposta faradaica, P = presença de resposta faradaica.

| Marcas | ΔE | i_a/i_c | R_{ct} (Ω) | $HClO_4$ | NaOH | PBS |
|---------------|------------------------------|-----------------------------|--|----------------------------|-------------|------------|
| B1 | 85 | 1,03 | 46,00 | A | A | A |
| B2 | 95 | 1,04 | 69,35 | A | A | A |
| B3 | 100 | 1,03 | 37,21 | P | A | A |
| B4 | 88 | 1,04 | 61,82 | P | A | P |
| B5 | 83 | 1,07 | 21,72 | P | A | A |
| B6 | 110 | 1,02 | 95,83 | P | P | P |
| B7 | 88 | 1,02 | 129,29 | P | P | P |
| B8 | 73 | 1,03 | 19,29 | P | A | P |
| B9 | 106 | 1,01 | 49,26 | P | A | P |
| B10 | 93 | 1,09 | 80,86 | P | A | P |

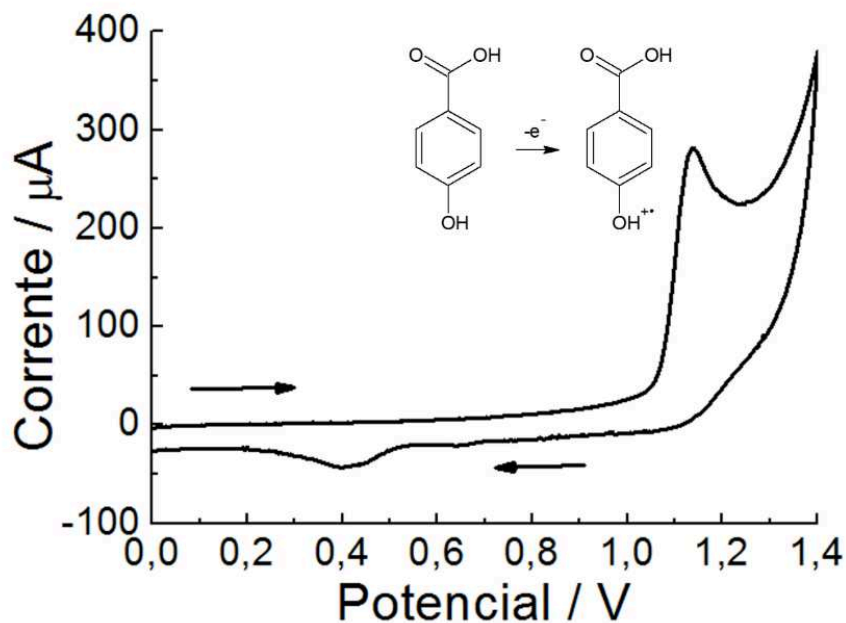
Fonte: Própria (2018)

Todas as marcas apresentaram excelente razão entre os picos de corrente. Três marcas (B3, B6 e B9) apresentaram os piores valores de ΔE o que já os descartaram previamente. Os menores valores de ΔE e mais baixos valores de R_{ct} foram obtido pela marca B8. Apenas duas marcas analisadas que não foram descartadas inicialmente apresentam ausência de resposta faradaica indesejada nas soluções do ácido, da base e do tampão (B1 e B2). As outras marcas provavelmente devido à manufatura dos materiais, apresentam contaminantes eletroquimicamente ativos na superfície do carbono que podem diminuir a seletividade e a sensibilidade do sensor, de modo especial as marcas B4, B7, B8, B9 e B10. Assim, das três marcas restantes (B1, B2 e B5), a marca B5 apresentou excelentes resultados mas a presença de resposta faradaica na solução de ácido perclórico sugeriu a presença de contaminação. Não houve restrições ao uso da marca B2 e esta pôde muito bem ser utilizada. Entretanto, devido ao seu baixo ΔE , excelente relação de corrente de pico, baixo R_{ct} , ausência de resposta eletroquímica em todas as soluções (ácido, base e tampão) juntamente pelo fato de ser uma marca conhecida na literatura (WANG; KAWDE; SAHLIN, 2000), marca B1 (Pentel, super Hi-Polymer 505C) foi escolhida para os experimentos eletroquímicos subsequentes.

5.3 Eletropolimerização do ácido 4-hidroxibenzoico

Com o conhecimento da efetividade deste tipo de eletrodo, e com a padronização nas soluções contendo KCl, $K_3Fe(CN)_6$ e $HClO_4$, o processo de polimerização do monômero 4-AHB foi iniciado. Na figura 6 está apresentado o voltamograma cíclico referente à primeira varredura do monômero em meio ácido.

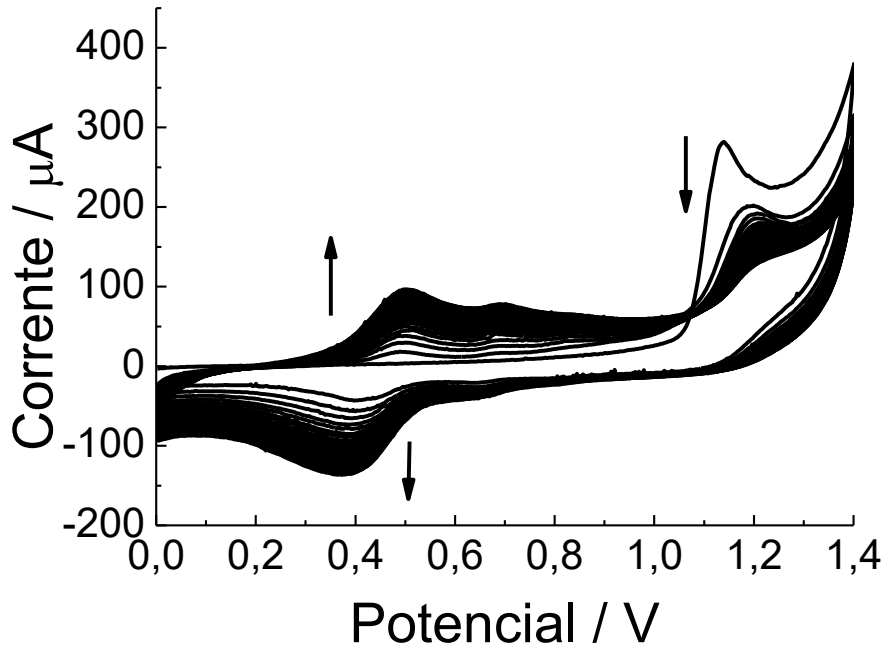
Figura 6 - Voltamograma cíclico de $HClO_4$ 0,5M contendo 4-AHB 2,5mM, $50mV.s^{-1}$ sobre ECGL.



Fonte: Própria (2018)

Observou-se o surgimento de um pico de oxidação em + 1,14V referente à remoção de um elétron do átomo de oxigênio do grupo fenol para a formação de um cátion-radical. No voltamograma reverso não há um pico de redução nessa faixa de potencial, o que indica que uma oxidação irreversível ocorreu. Isto era esperado porque o cátion-radical é um intermediário muito instável e passível de reagir quimicamente com outra estrutura em solução. No processo reverso, surgiu em potenciais menores dois picos de redução. Um pequeno pico em +0,64V e outro mais evidente em +0,40V. Provavelmente esses picos estão relacionados à redução dos possíveis oligômeros formados no acoplamento dos cátions-radicais formados, visto que tais picos não surgem se o potencial de +1,14V não for atingido. A figura 7 apresenta 100 ciclos sucessivos de varreduras de potenciais nestas mesmas condições.

Figura 7 - Voltamogramas cíclicos de HClO_4 0,5M contendo 4-AHB 2,5mM, $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, 100 ciclos sobre ECGL



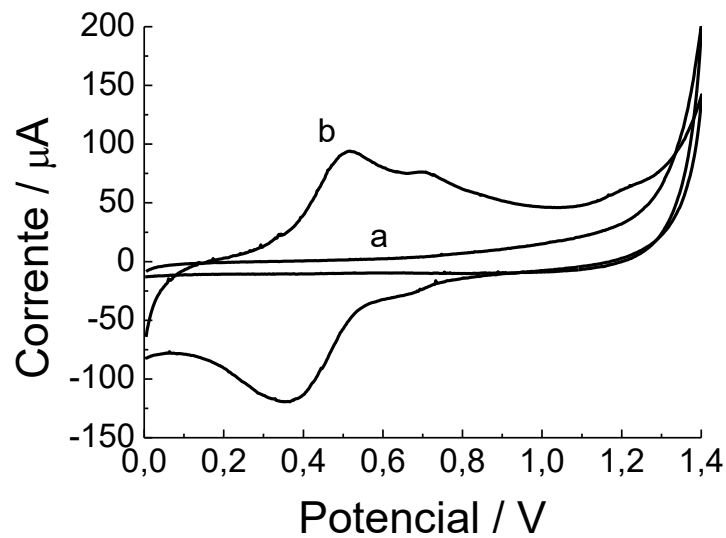
Fonte: Própria (2018)

O perfil voltamétrico é consistente com um processo de eletropolimerização. Inicialmente houve a diminuição do pico de oxidação de formação de cátion-radical. Como a concentração do monômero não foi alterada, a única explicação é a diminuição de área eletroquimicamente ativa para o processo. Isso só pode estar ocorrendo se um material está sendo depositado sobre a superfície do eletrodo, neste caso, um polímero. Há, conseqüentemente, um aumento nos valores de corrente dos picos de redução concomitantemente com o aumento dos valores de corrente dos picos de oxidação correspondentes, formando pares redox. Um par em $+0,5/+0,4\text{V}$ e outro em $+0,70/+0,64\text{V}$. Com o acoplamento de dois monômeros formando um dímero há um aumento no efeito de ressonância na estrutura o que facilita o processo de retirada de elétrons. Desta maneira explica-se o fato do potencial dos pares redox estarem em potenciais menos anódicos que o do monômero. O crescimento nesta região está relacionado diretamente com o crescimento de um material na superfície do eletrodo. Visualmente não há a percepção de alteração do eletrodo após os 100 ciclos.

5.4 Caracterização eletroquímica do poli(4-AHB)

Com o polímero sobre o ECGL, este pode então ser caracterizado, os eletrodos foram levados novamente à soluções padrões para atestar as diferenças com o eletrodo limpo, como pode ser visto na figura 8.

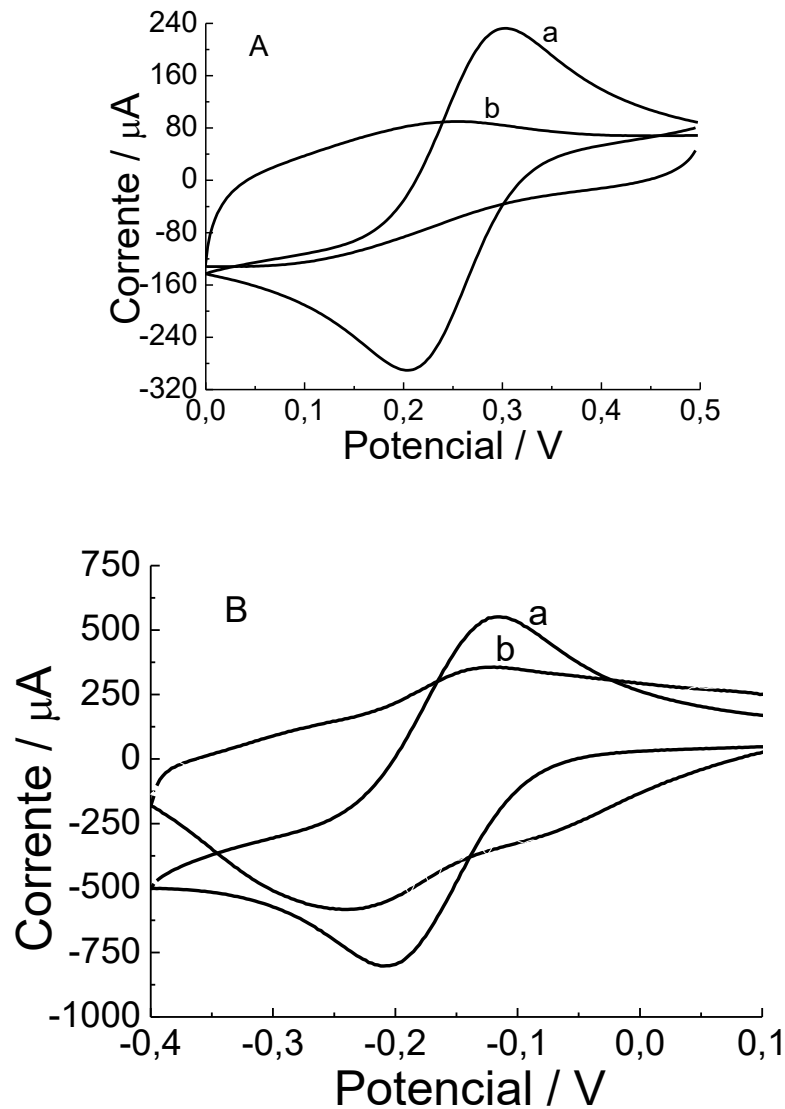
Figura 8 - Voltamogramas cíclicos de HClO_4 0,5M à $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ sobre: (a) ECGL e (b) ECGL modificado com poli(4-AHB) em.



Fonte: Própria (2018)

É notável a diferença entre o eletrodo limpo e o eletrodo modificado, mostrando que a polimerização ocorreu sobre a superfície. O pico de oxidação referente ao monômero não está presente, o que indica que todo o monômero foi removido na etapa de lavagem. Há apenas a presença dos dois pares redox, exatamente na mesma faixa de potencial presente durante o processo de eletropolimerização. Foi também avaliado a diferença em dois pares redox comuns. Um par aniônico ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) e outro catiônico ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$), visto na figura 9.

Figura 9 – Voltamogramas cíclicos (A) $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M; (B) $Ru(NH_3)_6Cl_3$ 5,0mM + KCl 0,5M. $v = 100mV.s^{-1}$ sobre: (a) ECGL e (b) ECGL modificado com poli(4-AHB).

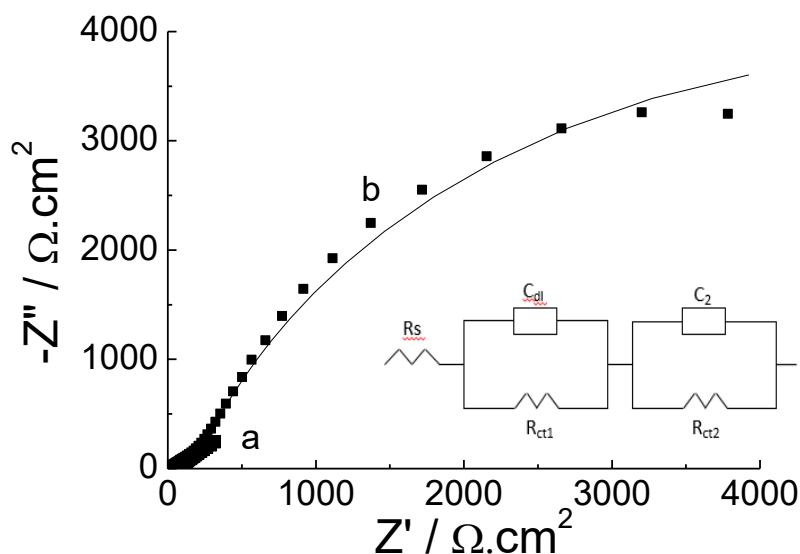


Fonte: Própria (2018)

Em ambos os casos, em soluções contendo complexos aniônicos e catiônicos houve um decréscimo nos valores de corrente e um deslocamento para maiores ΔE . Estas respostas, além de aumentar a evidência de modificação do eletrodo com um material polimérico, ainda sugerem que o material possui características passivantes, diminuindo a transferência eletrônica entre analito e eletrodo. A princípio, era esperado devido ao fato do material possivelmente apresentar grupamentos ácido carboxílico em sua composição, promovendo uma repulsão eletrostática entre o ânion ferricianeto e o ânion carboxilato (pH da solução está em torno de 7, o que é o suficiente para gerar o ânion). Esse fato impediu uma análise mais detalhada sobre a passivação do eletrodo, visto que poderia haver uma

competição entre a diminuição de transferência eletrônica e repulsão eletrostática. Porém, ao se analisar os voltamogramas com o complexo de rutênio, foi também possível observar uma diminuição nos valores de corrente. Neste caso, como o complexo é catiônico, haveria uma atração eletrostática com o polímero e possível aumento nos valores de corrente, o que não ocorreu. Desta forma, pode-se indicar que o polímero apresenta características passivantes. Mesmo assim, a diminuição dos valores de corrente em solução com o complexo de rutênio não foi tão evidente quanto na solução contendo o complexo de ferro, o que também indicou a possibilidade da presença de grupamentos ácido carboxílicos na malha polimérica. Uma análise da resistência à transferência de carga foi feita através de medidas de EIE, como mostrado na figura 10.

Figura 10 - Diagrama de Nyquist para EIE em $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M. $E = +0,250V$, $\Delta E = 10,0mV$, faixa de frequência de 10^5 à 10^2 Hz sobre: (a) ECGL e (b) ECGL modificado com poli(4-AHB). O símbolo quadrado representa os dados experimentais e a linha representa a simulação a partir do circuito equivalente proposto no inset.



Fonte: Própria (2018)

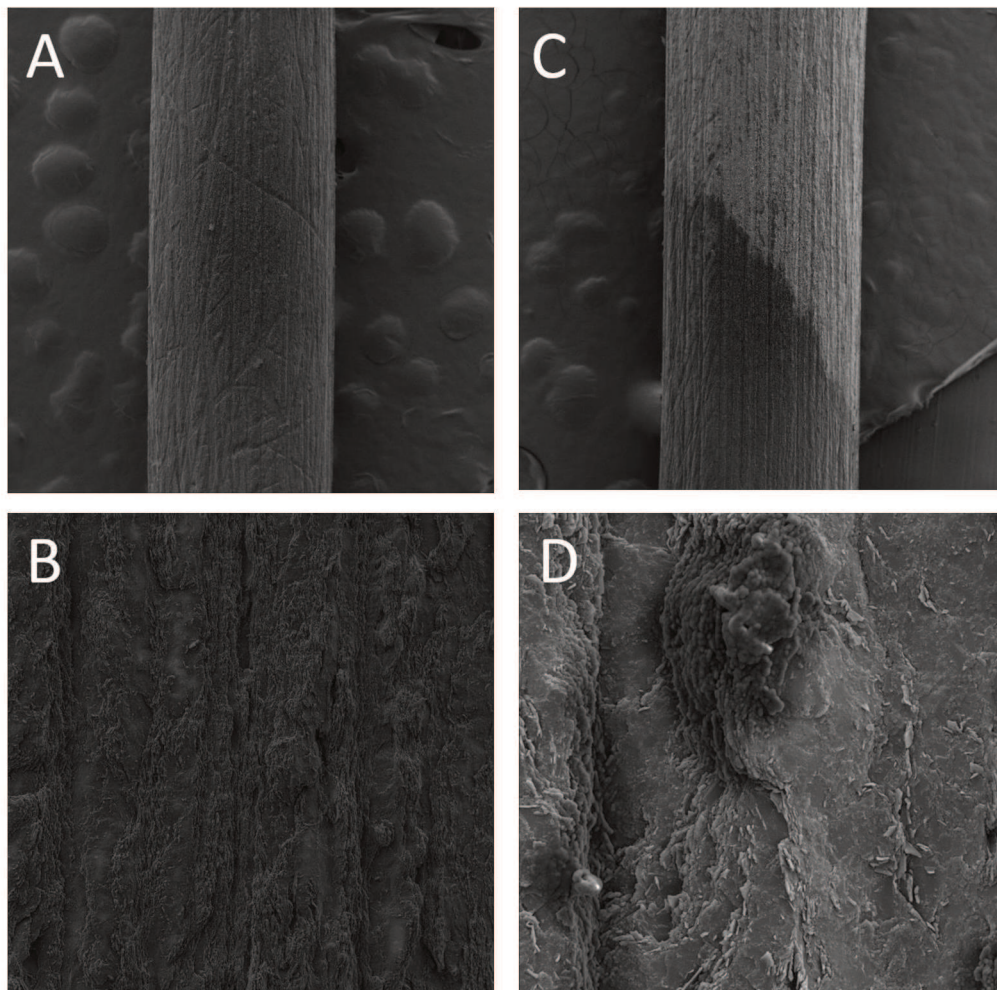
A curva em (a) representando o ECGL sem modificação é a mesma apresentada na figura 5 que ficou, em escala, quase imperceptível ao se comparar com o eletrodo modificado (b). Fica claro pelo aumento na circunferência do semi-círculo que há uma enorme diferença no eletrodo provocado pela presença do material polimérico. Com o circuito proposto, não há a região de transferência de massa, por isso a ausência do componente R_w (Warburg). Aparecem dois componentes RQ em série, o que é justificado exatamente pela presença de um material na superfície. O valor de R_{tc} subiu de $46,0\Omega$ para

197 Ω mostrando a diminuição na cinética de transferência eletrônica entre a espécie em solução e o eletrodo. A segunda resistência chamada de R_{ct2} (10,1k Ω) refere-se à resistência no transporte iônico da cadeia polimérica devido a processos de carga e descarga. O valor alto é compatível com um material altamente resistente à esta transferência, o que o classifica como não-condutor. Apesar dos outros termos terem valores característicos, a análise pela variação de resistência já é suficiente para comprovar a modificação dos eletrodos e sugerir comportamento não-condutor.

5.5 Caracterização morfológica do poli(4-AHB)

Buscando corroborar esses estudos, os eletrodos foram analisados pela técnica de MEV. As micrografias podem ser observadas na figura 11.

Figura 11 - Micrografias obtidas por MEV para (A e B) ECGL e (C e D) ECGL modificado com poli(4-AHB). Ampliação de 100x para A e C e de 5000x para B e D.



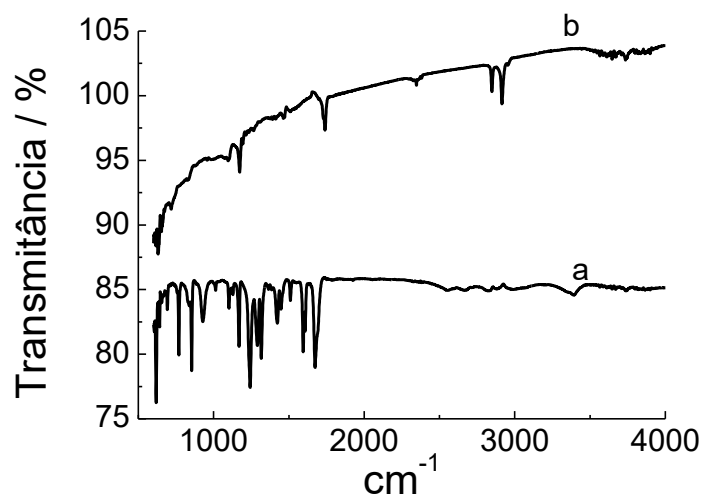
Fonte: Própria (2018)

Na figura 11, a ampliação de 100x está aqui apresentada propositalmente para mostrar em termos visuais a diferença entre o eletrodo de grafite limpo e o modificado que não é possível de ser vista em eletrodos planares. A figura 11A mostra o ECGL limpo. As ranhuras verticais são resultado do processo mecânico de polimento para remoção dos possíveis óxidos passivantes da superfície do eletrodo originalmente adquirido. A figura 11C apresenta uma região em que a parte escura é o eletrodo limpo e a parte clara é o eletrodo modificado. É possível observar microscopicamente um desnível na modificação mesmo colocando o eletrodo da forma mais linear possível na célula. A Figura 11B apresenta o eletrodo limpo numa ampliação de 5000x. É possível de se ver novamente o perfil de ranhuras verticais devido à limpeza e o aspecto mais amorfo do grafite. Na figura 11D é possível, assim como na figura 11C é possível visualizar a região do eletrodo mais clara, mostrando a modificação do eletrodo. A modificação ocorre de forma homogênea por toda a superfície e ainda com a presença de algumas saliências como se formassem “morros” sobre o eletrodo, claramente diferenças de camadas de material polimérico modificando a superfície.

5.6 Caracterização espectroscópica do poli(4-AHB)

A caracterização do material foi feita ainda por FT-IR. Tanto o monômero quanto o polímero extraído dos eletrodos de grafite foram analisados na figura 12.

Figura 12 – FT-IR de (a) 4-AHB e (b) poli(4-AHB).

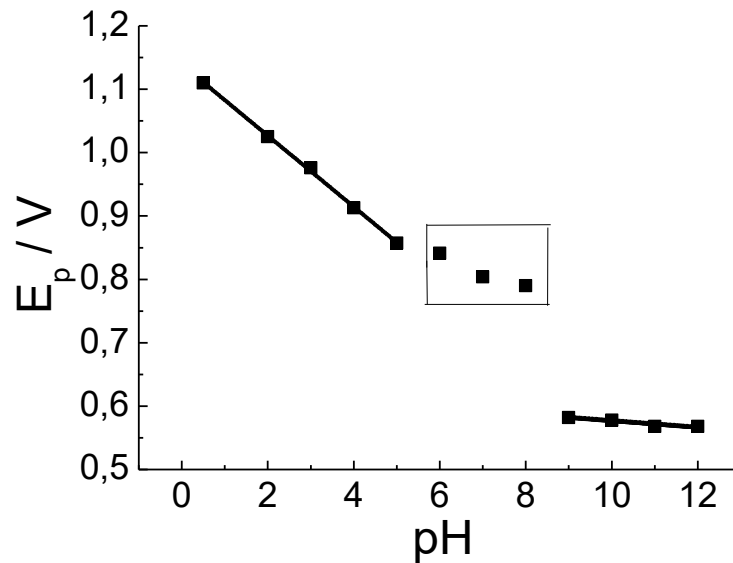


A pouca quantidade de material obtida foi a responsável pelos pequenos sinais de transmitância observados na figura 12. Mesmo assim, informações importantes podem ser feitas. A banda mais característica para ácidos carboxílicos apareceu na região entre $1730 - 1700\text{cm}^{-1}$ relativo ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ da carboxila. A conjugação, assim como é feito para o ácido benzoico, moveu a banda para absorções em frequências menores. A banda a aproximadamente 1690cm^{-1} representou este estiramento. A banda em $\sim 1240\text{cm}^{-1}$ é relacionada ao estiramento de $\text{C}-\text{O}$ e a banda de baixa intensidade a 900cm^{-1} refere-se à vibração fora do plano de $\text{O}-\text{H}$. Os dois dubletes em $\sim 1400\text{cm}^{-1}$ e 1600cm^{-1} são relacionadas aos estiramentos de $\text{C}=\text{C}$ de aromáticos. O polímero extraído apresenta menos bandas, porém bem características. A banda a 1740cm^{-1} referente ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ persiste, provando que o grupamento ácido carboxílico está presente e provavelmente não participa do mecanismo da reação. A banda a $\sim 1170\text{cm}^{-1}$ foi relacionada ao estiramento $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ de aril éteres, deslocado para maiores frequências devido ao aumento no caráter de dupla ligação, que a fortaleceu. Isto prova que a eletropolimerização, como já sugerido, se iniciou pelo átomo de oxigênio do fenol. Esta análise está comprovada pela literatura (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

5.7 Oxidação do 4-AHB em diferentes pHs

Para dar início a uma proposta de mecanismo que possa contemplar o grupo ácido carboxílico mantido inalterado e iniciando pelo átomo de oxigênio do fenol foi realizado mais um experimento. A solução do monômero foi preparada em tampão Britton-Robinson (BR) e o pH foi alterado de 2 à 12. A primeira varredura em cada valor de pH foi registrada e o gráfico de potencial de pico pelo pH foi montado, como visto na figura 13.

Figura 13 – Perfil de potencial de pico *versus* pH obtidos de voltamogramas cíclicos em soluções de tampão BR 0,4M contendo 4-AHB 5,0mM, 50mV.s⁻¹. Primeiro ponto, pH 0,5 foi obtido do voltamograma realizado em HClO₄.



Fonte: Própria (2018)

Como representado na figura 13, houve um deslocamento de potencial de pico para valores menos anódicos à medida que o valor de pH aumenta até o pH 9. Isso significa uma dependência com o pH do meio na oxidação do monômero. A partir do pH 9 não houve alteração do pH o que resulta numa independência com o pH do meio a partir desse valor.

A equação linear obtida entre os valores de pH 0,5 e 5 (equação 1) e a equação linear obtida entre os valores de pH 9 e 12 (equação 2) foram:

$$E_p(\text{V}) = -0,05614 \text{ pH} + 1,139 \quad R = 0,99872 \quad \text{Equação 1}$$

$$E_p(\text{V}) = -0,0052 \text{ pH} + 0,628 \quad R = 0,83421 \quad \text{Equação 2}$$

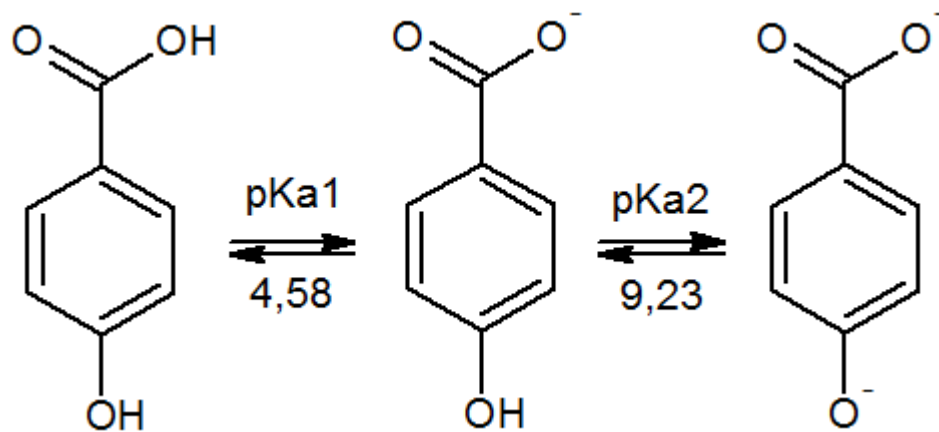
A inclinação da primeira equação apresentou valor muito próximo ao valor previsto na equação de Nernst (equação 3):

$$E_p = E^\circ - 0,0592 \text{ (H}^+/\text{n)} \text{ pH} \quad \text{Equação 3}$$

O valor de 0,056 está muito próximo de 0,059. Isso indicou, nesse caso, que o mesmo número de elétrons e prótons estão envolvidos no processo de oxidação (COMPTON; BANKS, 2007). Já a segunda inclinação da equação 2 apresentou um valor

muito baixo, indicando que o processo deve estar ocorrendo apenas com transferência de elétrons. Os valores obtidos em soluções de pH 6, 7 e 8 não foram utilizados. Acima de pH 5 e abaixo de pH 9 foi detectada uma instabilidade no preparo das soluções. Pouquíssima quantidade de solução básica alterava consideravelmente o valor de pH. Mesmo repetindo os experimentos várias vezes, as respostas flutuavam em valores diversos e, assim, não sendo confiáveis. Os valores adicionados na figura 13 foram os valores mais próximos de um sistema apresentável. A figura 14 seguinte apresenta os dois valores de pKa do 4-AHB (FERREIRA et al., 2011) e explica parte desses resultados.

Figura 14 – Estruturas do 4-AHB e respectivos valores de pKa.



Fonte: Própria (2018)

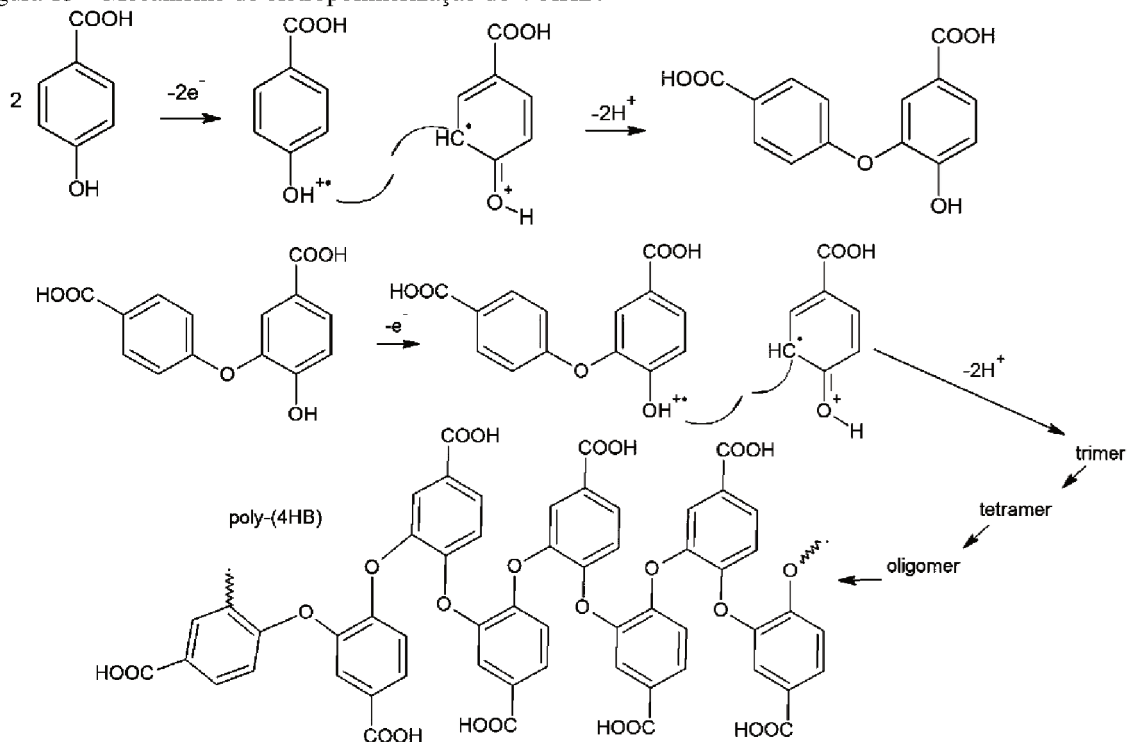
Em soluções preparadas abaixo do primeiro pKa os dois grupos funcionais estão protonados, tanto o ácido carboxílico, quanto a hidroxila do fenol. No valor aproximado de 4,58 há um equilíbrio entre ácido carboxílico e ânion carboxilato. Acima desse valor o ânion prevalece. Embora o fato deste ânion pouco contribuir para o efeito de ressonância do anel, de alguma forma há uma instabilidade estrutural, pois exatamente entre os dois valores de pKa, foi constatado dificuldades no preparo das soluções. Uma possível interação de hidrogênio entre o ânion carboxilato de uma molécula com a hidroxila do fenol de outra pode levar a esse desequilíbrio. Em soluções em que o valor de pH igual ao segundo pKa de 9,23, há agora um equilíbrio entre o fenol e o ânion fenóxido. Acima desse valor o ânion prevalece. Em soluções alcalinas (acima de pH 9) ambos os grupos estão desprotonados, o que explica a independência da oxidação do monômero em relação ao pH visto que não há mais próton disponível para a reação. Apesar de não apresentado na figura 13, os valores de corrente de pico tiveram oscilações durante toda a variação de pH. Apenas a partir do pH 9

houve um aumento significativo e constante, tendo o pico máximo em pH 12. Isso também é explicado devido ao aumento do efeito de ressonância no anel aromático devido à presença do ânion fenóxido ao contrário do fenol, o que facilita a remoção do elétron da estrutura (menor potencial e maior corrente).

5.8 Mecanismo de eletropolimerização do 4-AHB

Com esses dados em mãos, sabendo que o eletrodo foi modificado, que o grupo ácido carboxílico não participou da reação de eletropolimerização e estava livre na malha polimérica, e que houve a participação do mesmo número de elétrons e prótons no processo, foi proposto um mecanismo de polimerização para o 4-AHB, apresentado na figura 15.

Figura 15 – Mecanismo de eletropolimerização do 4-AHB.



Fonte: Própria (2018)

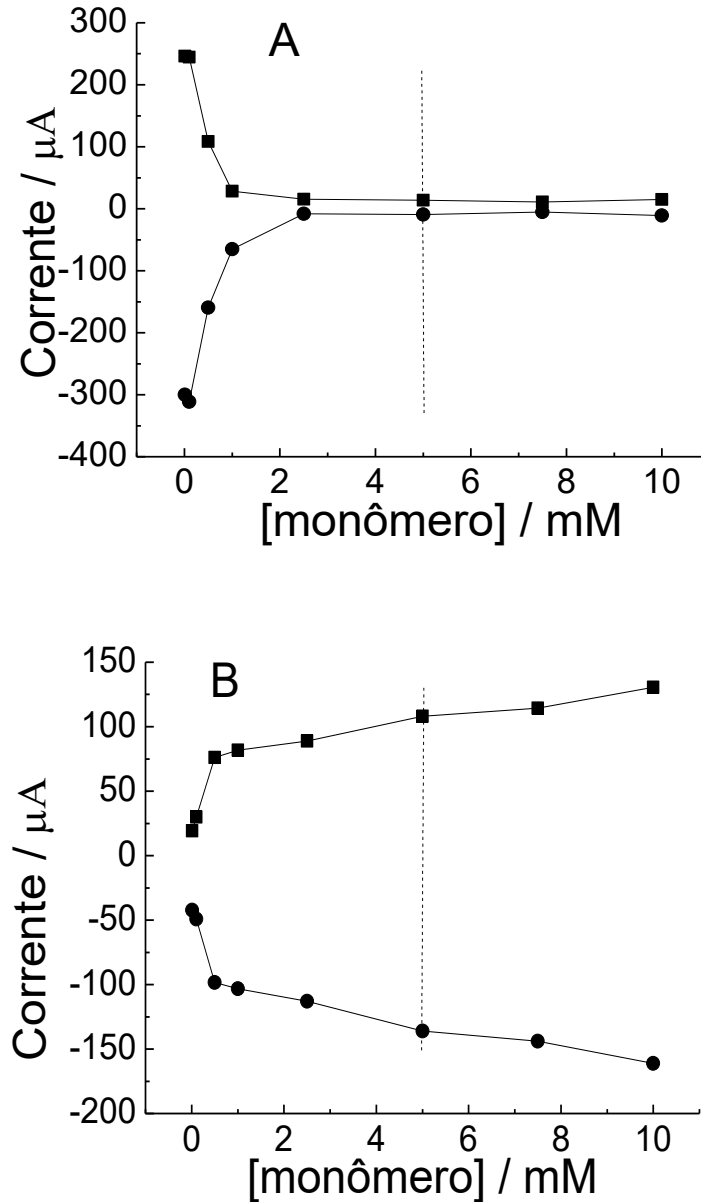
Como as atividades desenvolvidas são realizadas em meio ácido, ambos os grupos funcionais estão protonados. A primeira etapa da reação é a remoção de 1 elétron de cada monômero formando um cátion-radical. O anel aromático possui um substituinte doador de elétrons por ressonância (hidroxila do fenol) e um grupo retirador de elétrons (carboxila). Embora por efeito indutivo o grupo hidroxila também seja um retirador de elétrons, o efeito

de ressonância sobressai. Desta forma, o grupo hidroxila do fenol é um grupo *orto-para* dirigente. Como a posição *para* convenientemente está ocupada pelo grupo carboxilato, a única forma de ressonância mais estável é exatamente ao carbono vizinho à hidroxila do fenol. Desta forma, duas estruturas com cátions-radicais reagiram entre si, liberando dois prótons e formando um dímero. Assim, a primeira parte do mecanismo envolveu dois prótons e dois elétrons. A formação de um dímero comprovou a irreversibilidade do pico de oxidação mais anódico apresentada no primeiro ciclo de eletropolimerização. Como a reação química seguida da etapa eletroquímica, foi muito rápida, o cátion-radical formado não permaneceu tempo o suficiente para ser reduzido. O aumento do número de formas de ressonância na estrutura gerada favoreceu a diminuição do potencial redox, o que implicou no surgimento dos pares redox em potenciais menos anódicos na subsequente polimerização. O processo se iniciou novamente com a remoção de 1 elétron do dímero seguido do acoplamento com um novo cátion-radical monomérico gerando um trímero. Por consequência foi formado um tetrâmero, um oligômero até, enfim, ser formado o polímero. Pode-se observar que o polímero atendeu o observado nos experimentos de caracterização com a presença dos grupos ácidos carboxílicos, exatamente os grupos necessários para o acoplamento com materiais biológicos como antígenos, anticorpos e enzimas.

5.9 Otimização da eletropolimerização do 4-AHB

Nosso grupo de pesquisa já utilizou a técnica de eletropolimerização para várias estruturas (ALVES et al.; 2018; CORRÊA et al., 2018; CRUZ et al, 2017; ALVES et al., 2016; PARAÍSO et al., 2014). Porém não houve uma preocupação com alguns parâmetros de otimização. A mesma concentração do monômero, do eletrólito suporte e, principalmente, do número de varreduras foram realizadas sem se preocupar se esses valores seriam os ideais para formar o polímero. Aqui neste trabalho foi realizado estas três otimizações. Como parâmetro de análise, utilizamos os picos de corrente anódicos e catódicos obtidos em solução de $K_3Fe(CN)_6$ e do $HClO_4$ (somente o pico menos anódico, que apresentou maiores alterações). O primeiro a ser realizado foi a concentração do monômero apresentado na figura 16.

Figura 16 - Perfil de pico de corrente anódica (—■—) e catódica (—●—) *versus* concentração do monômero. Dados obtidos a partir de voltamogramas cíclicos de: (A) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5,0mM + KCl 0,5M, $v = 100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ e (B) HClO_4 0,5M, $v = 50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Polimerizações feitas com 30 varreduras em solução de HClO_4 0,5M contendo diferentes concentrações de 4-AHB.

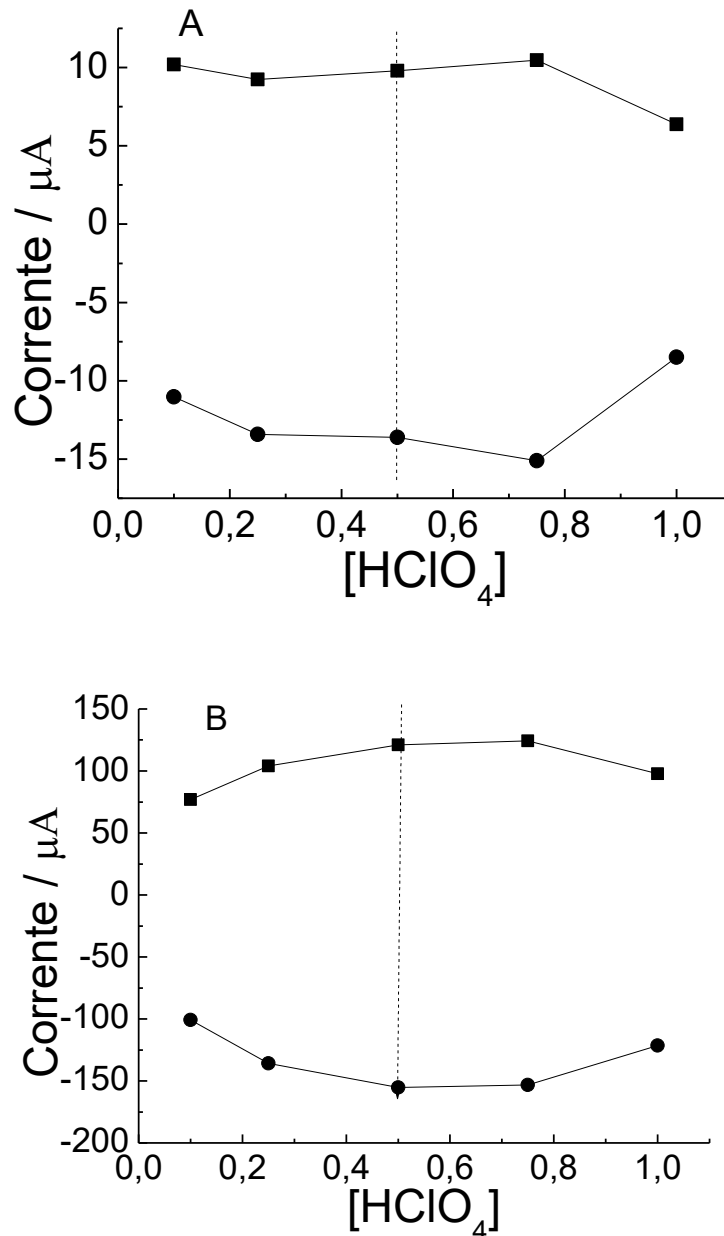


Fonte: Própria (2018)

Pode-se observar que em concentrações muito baixas ($< 1 \times 10^{-4}$ M) praticamente não houve modificação no eletrodo. Ao chegar na escala de mM houve uma alteração significativa em ambos os perfis. A partir de 2,5mM não houve praticamente mais modificação visível, utilizando $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e apenas um leve acréscimo de corrente até 10mM no gráfico a partir do HClO_4 . Desse modo, para garantir que a modificação esteja

sendo feita com maior eficiência possível, foi escolhido manter a concentração de 5,0mM. Os gráficos a seguir referem-se à alteração da concentração do eletrólito suporte.

Figura 17 - Perfil de pico de corrente anódica (—■—) e catódica (—●—) *versus* concentração do eletrólito suporte. Dados obtidos a partir de voltamogramas cíclicos em: (A) $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M, $v = 100mV.s^{-1}$ e (B) $HClO_4$ 0,5M, $v = 50mV.s^{-1}$. Polimerizações feitas com 30 varreduras em solução de 4-AHB 5,0mM contendo diferentes concentrações de $HClO_4$.

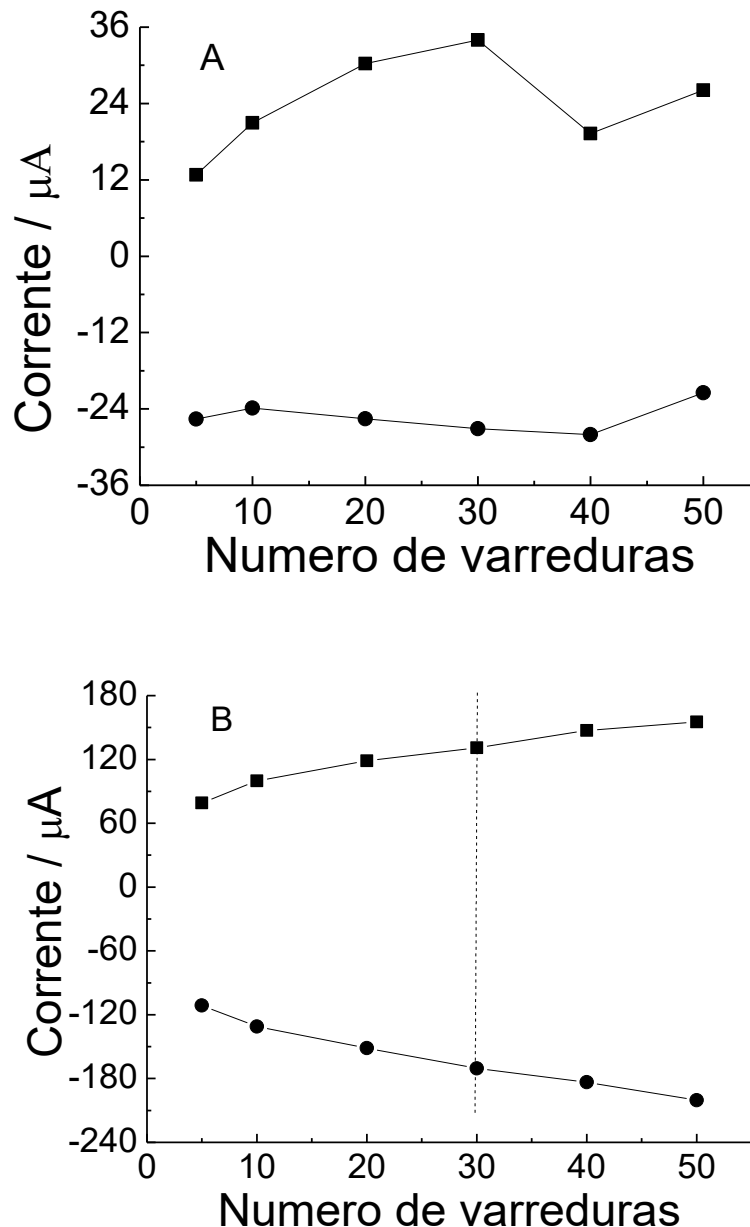


Fonte: Própria (2018)

Neste caso, pode-se observar que praticamente não houve alteração na resposta obtida a partir do ferricianeto. Todas as concentrações de $HClO_4$ promoveram um

decréscimo nos valores de corrente. Porém um máximo foi observado a partir das respostas em ácido perclórico à 0,5M. Como esse valor corresponde exatamente com uma quantidade de 100 vezes a mais do que o analito, o que é indicado em experimentos eletroquímicos controlados por difusão e não migração (PACHECO et al., 2013), esta concentração foi escolhida. Os últimos perfis gráficos foram obtidos alterando o número de ciclos como pode ser visto na figura 18.

Figura 18 - Perfil de pico de corrente anódica (—■—) e catódica (—●—) versus número de varreduras. Dados obtidos a partir de voltamogramas cíclicos em: (A) $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M, $v = 100mV.s^{-1}$ e (B) $HClO_4$ 0,5M, $v = 50mV.s^{-1}$. Polimerizações feitas em solução de 4-AHB 5,0mM contendo $HClO_4$ 0,5M com diferentes números de ciclos.

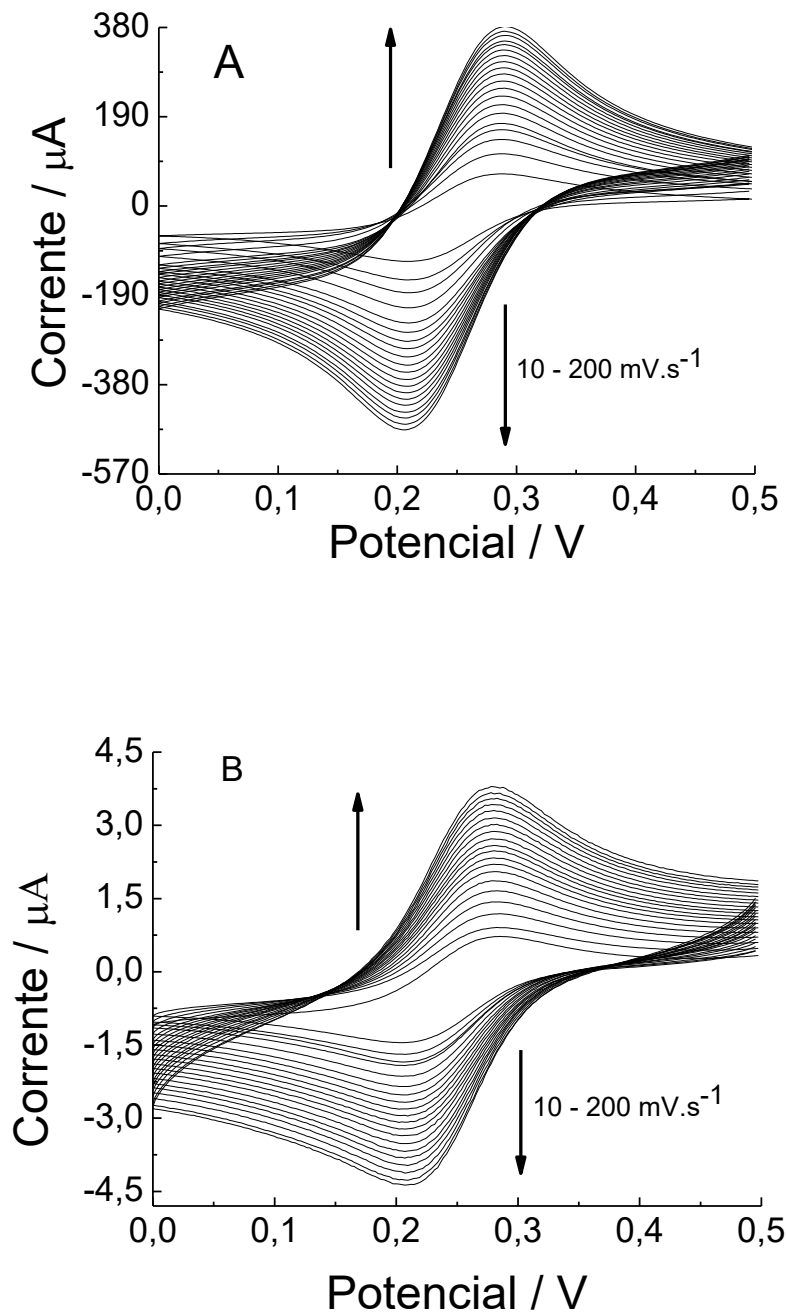


Inicialmente é visível que não houve a necessidade de um número exaustivo de varreduras para modificação do eletrodo (como é o caso de 100 varreduras que foi muito utilizado). Cerca de 30 varreduras foi o suficiente para se ter uma boa modificação, visto que pouca alteração foi observada no gráfico obtido em $K_3Fe(CN)_6$ e com uma tendência a estabilidade à partir do gráfico obtido em $HClO_4$.

5.10 ECGL de menor área geométrica isolado com resina

Para utilizar o sistema otimizado e caracterizado para construção de um biossensor, modificações no eletrodo de trabalho são necessárias. Isso porque o processo de desenvolvimento do biossensor consiste na etapa crucial de imobilização de material biológico sobre o eletrodo. Dificilmente, ao gotejar, o material diluído em tampão conseguirá cobrir a superfície do eletrodo cilíndrico sem perda de material. Imergir o eletrodo em solução é uma alternativa, porém inviável pelo tempo de contato necessário para que a biomolécula seja fixada no eletrodo (cerca de 24 horas). Desta forma foi estudada diferentes formas de utilização do ECGL. Um dos sistemas apresentados no procedimento experimental refere-se ao ECGL resinado utilizando uma área geométrica menor do que o dos outros estudos. Para garantir similaridade nas respostas eletroquímicas, foram utilizadas soluções padrão de ferricianeto de potássio e, através de medidas de VC foram comparados os eletrodos sem utilização de resina (ECGL) e com resina (ECGLr). A figura 19 mostra experimentos alterando a velocidade de varredura de potenciais com os dois eletrodos.

Figura 19 - Voltamogramas cíclicos em $K_3Fe(CN)_6$ 5,0 M + KCl 0,5M sobre: (A) ECGL e (B) ECGLr. As setas indicam o sentido do crescimento com o aumento da velocidade de varredura.



Fonte: Própria (2018)

É possível observar que ocorreu um aumento de corrente à medida que a velocidade de varredura aumento como é previsto para sistemas reversíveis, que é o caso do $K_3Fe(CN)_6$ sobre um eletrodo não modificado. Mesmo com uma área pequena foi possível de se observar o mesmo comportamento. Apesar de pequeno, o eletrodo não é considerado um microeletrodo, pois o perfil de picos permanece. Uma das maneiras de se afirmar que um

microeletrodo está sendo utilizado é através do perfil voltamétrico em ferricianeto. Assim como em sistemas sob agitação (convecção), não há a saturação do eletrodo com as espécies em solução. Desta forma, o perfil voltamétrico ao invés de gerar gráficos na forma de picos geraria gráficos de forma sigmoidal, o que não ocorreu.

Mais análises podem ser feitas a partir desta. A figura 20 mostra o perfil com a raiz de velocidade de varredura pelo valor de corrente de pico, a figura 21 mostra o perfil do log do pico de corrente pelo log de velocidade de varredura e a tabela 2 apresenta o resumo dos dados obtidos.

Figura 20 - Perfil de corrente de pico *versus* raiz da velocidade de varredura. Dados obtidos de voltamogramas cíclicos em: $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M sobre: (A) ECGL e (B) ECGLr, (—■—) picos anódicos e (—○—) picos catódicos.

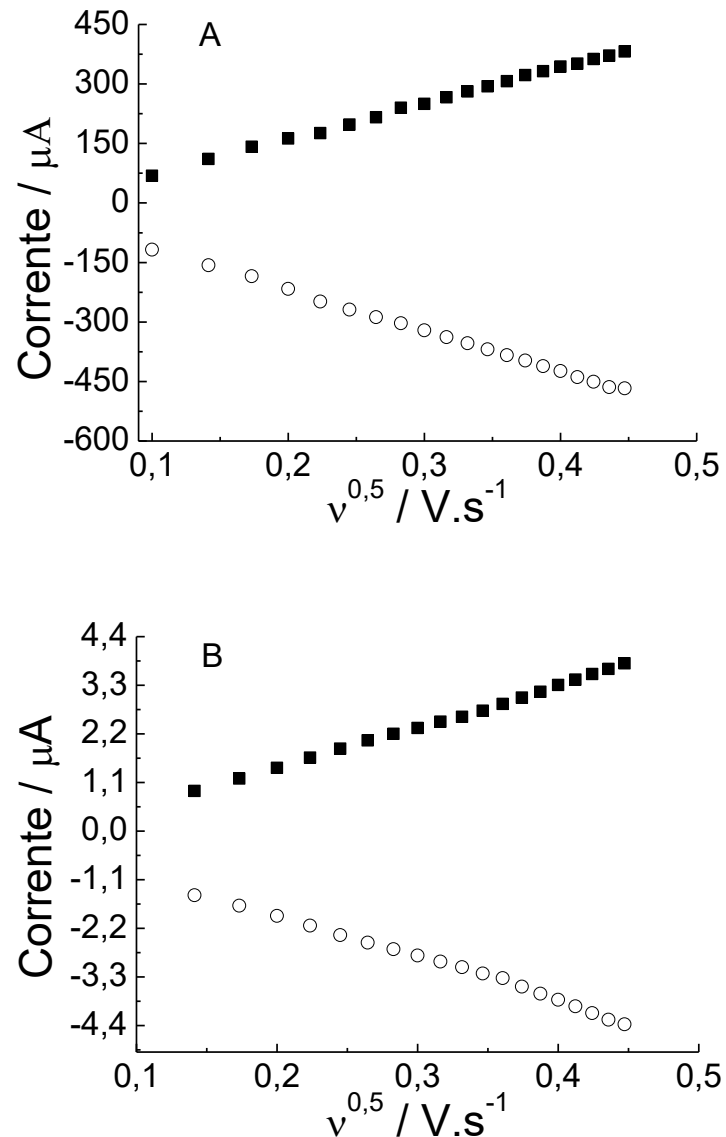
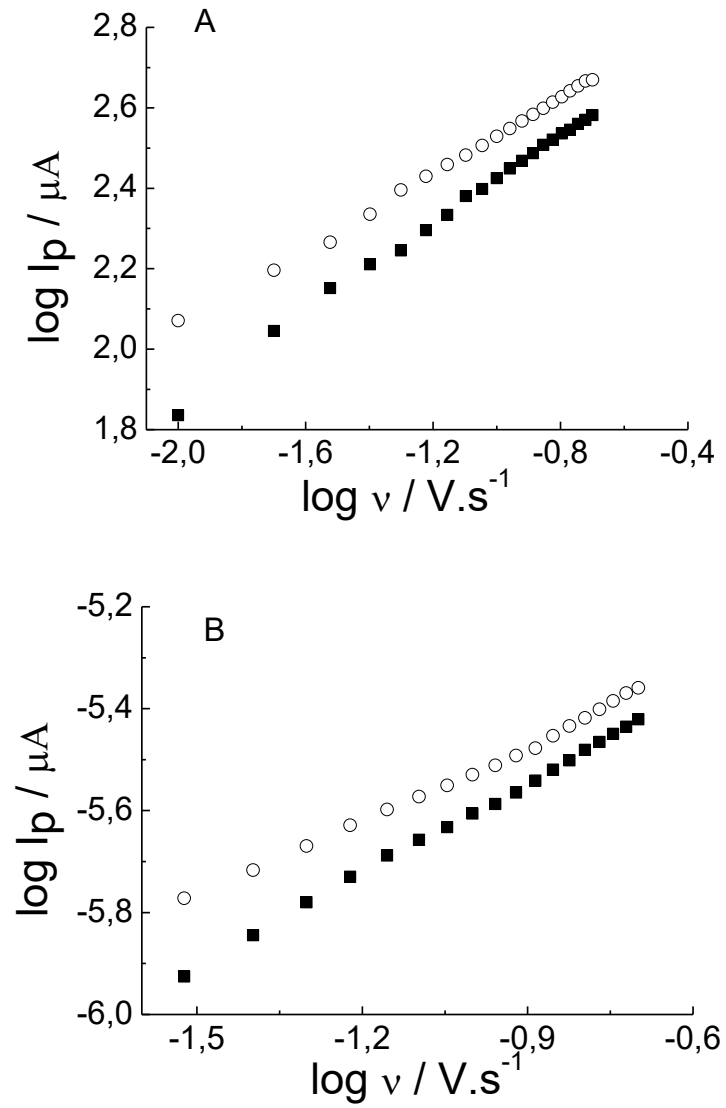


Figura 21 - Perfil de log da corrente de pico *versus* log da velocidade de varredura. Dados obtidos de voltamogramas cíclicos em $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl0,5 M, sobre: (A) ECGL e (B) ECGLr (—■—) picos anódicos e (—○—) picos catódicos.



Fonte: Própria (2018)

Tabela 2 - Parâmetros obtidos à partir dos resultados apresentados nas figuras 20 e 21.

| | ECGL | ECGLr |
|--|--|---|
| Equação linear obtida da Figura 20 (oxidação) | $i(\mu\text{A}) = 9,02291 \times 10^{-4} v^{0,5} (\text{V} \cdot \text{s}^{-1}) - 1,938 \times 10^{-5}$ R = 0,99891 | $i(\mu\text{A}) = 9,33966 \times 10^{-6} v^{0,5} (\text{V} \cdot \text{s}^{-1}) - 4,4474 \times 10^{-5}$ R = 0,99812 |
| Equação linear obtida da Figura 20 (redução) | $i(\mu\text{A}) = -0,00103 v^{0,5} (\text{V} \cdot \text{s}^{-1}) - 1,30711 \times 10^{-5}$ R = 0,99918 | $i(\mu\text{A}) = -9,54987 \times 10^{-6} v^{0,5} (\text{V} \cdot \text{s}^{-1}) + 1,318 \times 10^{-9}$ R = 0,99411 |
| Área geométrica | 0,2891 cm ² | 0,00636 cm ² |
| Área efetiva* | 0,256 cm ² | 0,00242 cm ² |
| Equação linear obtida da Figura 21 (oxidação) | $\text{Log } i(\mu\text{A}) = 0,5584 \text{ log } v (\text{V} \cdot \text{s}^{-1}) + 2,98087$ R = 0,99715 | $\text{Log } i(\mu\text{A}) = 0,50806 \text{ log } v (\text{V} \cdot \text{s}^{-1}) - 4,99723$ R = 0,99867 |
| Equação linear obtida da Figura 21 (redução) | $\text{Log } i(\mu\text{A}) = 0,47268 \text{ log } v (\text{V} \cdot \text{s}^{-1}) + 3,0029$ R = 0,99863 | $\text{Log } i(\mu\text{A}) = 0,484447 \text{ log } v (\text{V} \cdot \text{s}^{-1}) - 5,0355$ R = 0,99477 |

Fonte: Própria (2018)

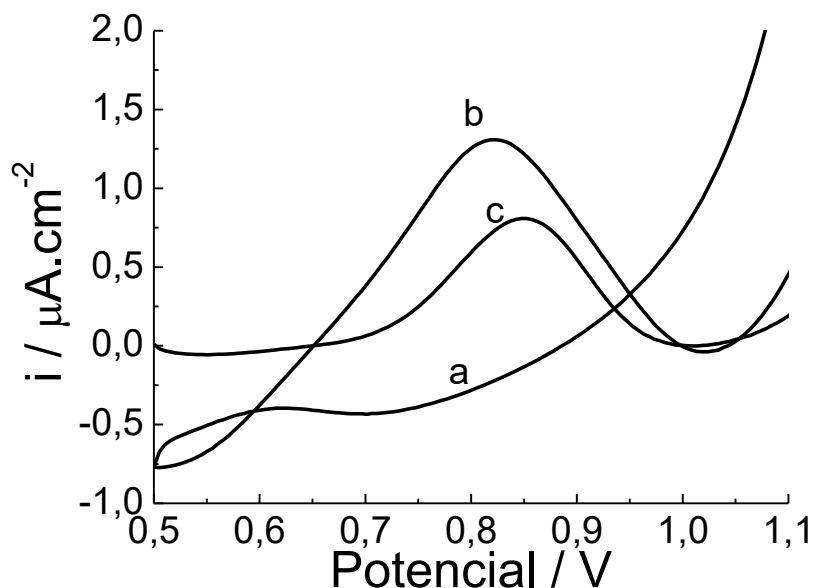
Pelo apresentado na figura 20 e na tabela 2, os dois sistemas são lineares com a raiz quadrada da velocidade de varredura, o que caracteriza que sistemas difusionais estão ocorrendo na superfície do eletrodo. Caso o contrário, processos adsorptivos estariam ocorrendo, o que não é o caso de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em eletrodos de carbono grafite. Desta maneira, utilizando a equação de Randles-Sevcik em que: $i_p = 2,686 \times 10^5 \times n^{3/2} \times A \times D^{1/2} \times C_o \times v^{1/2}$, sendo $n = 1$, $D = 7,45 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $C_o = 5,0 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ e A é a área do eletrodo; pôde-se estimar também para sistemas reversíveis, a área efetiva dos eletrodos. Observa-se valores menores do que os valores geométricos. Como esta é apenas uma estimativa, os valores reais não podem ser confirmados com certeza. O processo difusional é efetivamente comprovado pelos valores de inclinação obtidos a partir dos dados da figura 21. Valores de inclinação próximos de 0,5 significa presença de processos controlados por difusão. Valores próximos a 1 são indicativos de processos controlados por adsorção e valores entre 0,5 e 1 são processos mistos (difusão e adsorção). Como apresentado na figura 21, os sistemas (tanto oxidação e redução) são lineares e apresentam inclinações muito próximas dos valores de 0,5 (para ambos os eletrodos). Assim sendo, o eletrodo com menor área superficial

(ECGLr) apresenta os mesmos processos em solução padrão e pode ser utilizado para o efetivo desenvolvimento dos biossensores. Devido aos baixos valores de corrente obtidos, os valores de densidade de corrente ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) serão utilizados, inclusive a fim de comparação com os ECGL.

5.11 Detecção de 4-nitrofenol com sistema resinado

Desta forma, ECGLr foram modificados com 30 varreduras em solução de HClO_4 0,5M contendo 4-AHB 5,0mM. Após limpeza em solução contendo somente o eletrólito suporte, o eletrodo passou por uma linha de base no tampão TRIS, 0,1M, pH 9,0. Após lavagem foi imerso em solução contendo EDC 0,05M e NHS 0,016M por 1 hora para ativação dos grupos ácido carboxílico do polímero. Após esse tempo foi gotejado 1,4 μL da solução estoque de enzima sobre os eletrodos. Após 30 minutos os eletrodos foram lavados em solução tampão TRIS e imediatamente levados à uma cela eletroquímica contendo o mesmo tampão com o substrato 4-nitrofenilfosfato 1,0mM. A figura 22 mostra as VPD de detecção da oxidação do produto da reação enzimática, o composto 4-nitrofenol na forma de 4-nitrofenóxido (em função do valor de pH da solução alcalina).

Figura 22 - Voltamogramas de pulso diferencial em tampão TRIS 0,1M, pH 9,0, $v = 10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ de (a) linha de base de ECGLr/poli(4-AHB), (b) ECGLr/FAL e (c) ECGLr/poli(4-AHB)/EDC/NHS/FAL.



É possível observar que a presença de polímero não acarreta no aparecimento de alguma resposta faradaica na região de oxidação do 4-nitrofenol em tampão TRIS, o que permite utilizar o eletrodo para a modificação com a enzima. Dois eletrodos foram modificados com enzima. Um da maneira descrita acima com polímero, EDC/NHS e enzima (curva c da figura 22) e outro somente gotejando enzima sobre ECGLr limpo, apenas após passar a linha de base (curva b da figura 22). Observa-se que, em ambos os casos, foi possível detectar o 4-nitrofenol pelo pico de oxidação em região característica do mesmo. Porém, mesmo sabendo que há a possibilidade de interação da enzima com eletrodo de grafite limpo por algum tipo de adsorção, a alta resposta de corrente observada foi inicialmente inesperada. O que foi útil para procurarmos explicações é a intensa coloração amarelada na solução devido à formação do 4-nitrofenóxido. O problema pode estar sendo exatamente na resina. A figura 23 mostra a fotografia dos ECGLr após a realização dos experimentos.

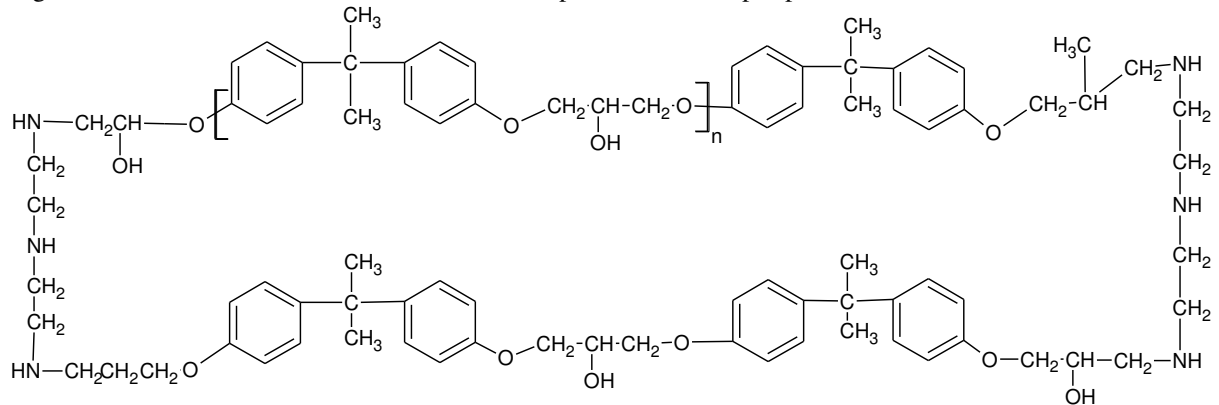
Figura 23 - Imagem da superfície dos eletrodos resinados. À esquerda, biossensor antes e, à direita, biossensor após a detecção do produto 4-nitrofenol.



Fonte: Própria (2018)

Observa-se claramente a mudança na coloração após a detecção. Não somente ocorreu uma interação entre o produto da catálise enzimática 4-nitrofenol com a resina, como é bem possível (pela dificuldade de gotejamento exatamente em cima do eletrodo de grafite sem que ocorra espalhamento da gota) de ter ocorrido interação entre a resina e a enzima. A estrutura abaixo (MILAGRES, 2015) que representa a possível resina Araldite® ajuda a explicar a dificuldade da sua utilização para este sistema.

Figura 24 - Possível estrutura da resina Araldite® após a mistura do pré-polímero com o endurecedor.



Fonte: Própria, adaptada de MILAGRES, 2015

A enzima é uma proteína quaternária apresentando aminoácidos em sua estrutura. A resina epóxi possui grupos funcionais amino, hidroxila, éteres aromáticos que podem, em alguma extensão, permitir que ocorra um determinado tipo de interação com a biomolécula, além da interação com o produto fenóxido gerado em meio alcalino. Isto dificulta a reprodutibilidade do sistema, visto que não foi conseguida mais de uma resposta de corrente na mesma região e impede os pesquisadores de confirmar se a enzima está sendo imobilizada sobre o eletrodo ou sobre a resina. Desta forma, descartou-se o uso de resina e procurou-se outro tipo de montagem para o biossensor para que fosse permitido utilizar somente a área de uma das extremidades.

5.12 ECGL de menor área geométrica isolado com esmalte

Para solucionar o problema encontrado com o ECGLr, a outra forma de isolamento da superfície do eletrodo foi com esmaltes gerando o eletrodo esmaltado (ECGLe). Seguindo-se o procedimento mostrado no procedimento experimental, o mesmo estudo de velocidade de varredura feito para o ECGLr foi realizado para o ECGLe, como pode ser visto na figura 25 e tabela 3.

Figura 25 - (A) Voltamogramas cíclicos de ECGL esmaltado de $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M. As setas indicam o sentido do crescimento com o aumento da velocidade de varredura; (B) Perfil de corrente de pico *versus* raiz da velocidade de varredura e (C) Perfil de log de corrente de pico *versus* log da velocidade de varredura. Dados obtidos de voltamogramas cíclicos presentes em (A), (—■—) picos anódicos e (—○—) picos catódicos.

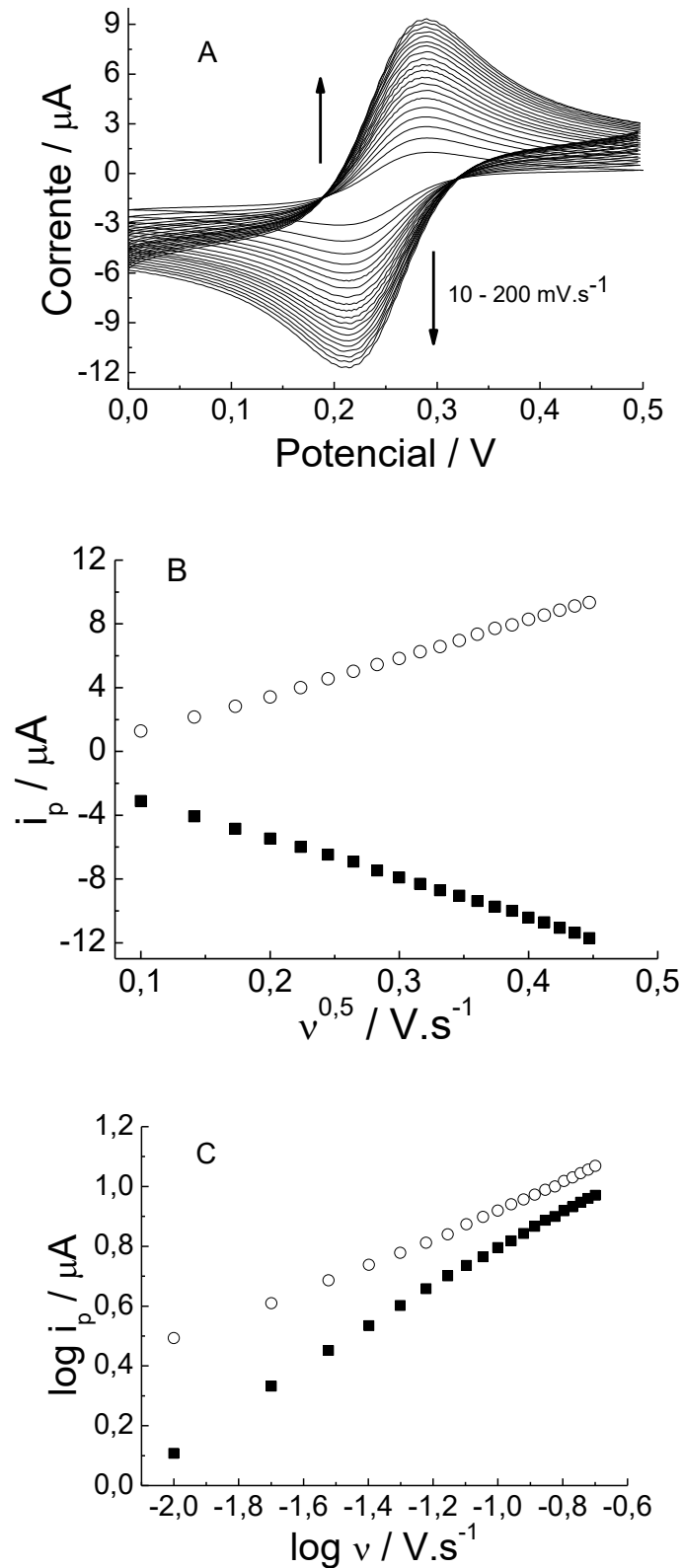


Tabela 3 - Parâmetros obtidos dos resultados apresentados na figura 25.

| | |
|-----------------|--|
| Equação linear | $i(\mu\text{A}) = 23,70682v^{0,5}(\text{V}\cdot\text{s}^{-1}) - 1,23702$ $R = 0,99949$ |
| Equação linear | $i(\mu\text{A}) = -24,73106v^{0,5}(\text{V}\cdot\text{s}^{-1}) - 51227$ $R = 0,99912$ |
| Área geométrica | 0,00630 cm ² |
| Área efetiva | 0,00620 cm ² |
| Equação linear | $\log i(\mu\text{A}) = +0,55437 \log v(\text{V}\cdot\text{s}^{-1}) + 1,44339$ $R = 0,99788$ |
| Equação linear | $\log i(\mu\text{A}) = +0,44891 \log v(\text{V}\cdot\text{s}^{-1}) + 1,37115$ $R = 0,99748$ |

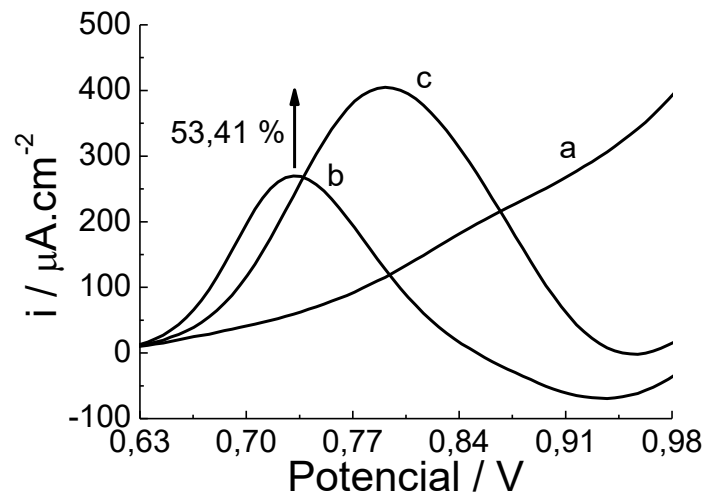
Fonte: Própria (2018)

Praticamente o mesmo perfil obtido para o ECGLr foi obtido para o ECGLe. Com ótimas linearidades em $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. O processo foi controlado por difusão e não por adsorção. Interessante nesse caso é que a área efetiva quase se igualou com a área geométrica. Aparentemente, o processo de resinagem do eletrodo não foi tão eficiente quanta a utilização do esmalte de certa forma não permitindo o acesso total à área do eletrodo mesmo após a limpeza mecânica.

5.13 Detecção de 4-nitrofenol com sistema esmaltado

Assim, sendo o ECGLe, comparado ao ECGL, o processo de montagem do biossensor enzimático foi realizado sobre a superfície do ECGLe. A detecção do produto da reação, 4-nitrofenol foi realizada, como mostrado na figura 26.

Figura 26 - Voltamogramas de pulso diferencial em tampão TRIS 0,1 M, pH 9,0, $v = 10\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ de: (a) linha de base de ECGLe/poli(4-AHB), (b) ECGLe/FAL e (c) ECGLe/poli(4-AHB)/EDC/NHS/FAL.



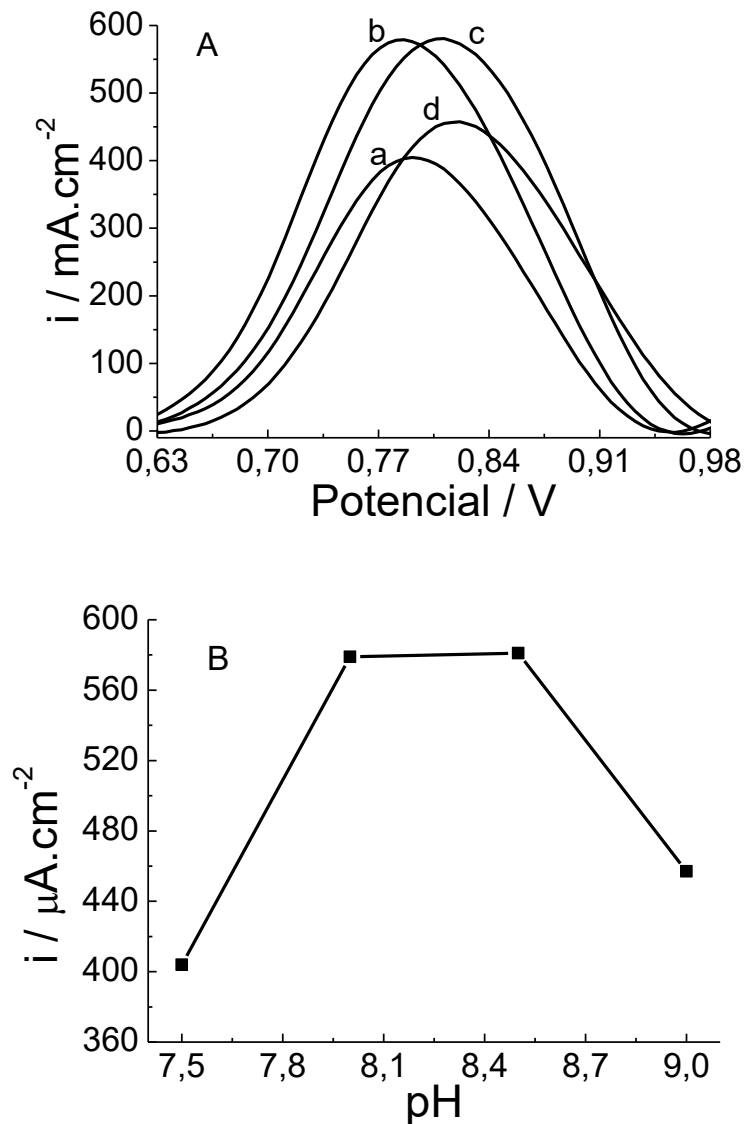
Fonte: Própria (2018)

Neste caso, utilizando ECGLe observa-se respostas mais condizentes do que para o ECGLr. A linha de base feita em tampão TRIS continua com a ausência de respostas faradaicas. Houve resposta de oxidação do 4-nitrofenol sobre ECGLe/FAL, porém com um aumento de mais de 50% de resposta quando comparado com ECGLe/poli(4-AHB)/EDC/NHS/FAL. Isto mostra que o sistema esmaltado supera o sistema resinado e que a presença de grupos ativos ácido carboxílicos promoveram maior interação com a enzima devido às ligações covalentes realizadas com os grupos amino da mesma, formando fortes ligações amidas. Deste modo, com mais enzima imobilizada foi possível de se detectar maior quantidade de 4-nitrofenol.

5.14 Detecção do 4-nitrofenol em diferentes pHs

Comprovado o funcionamento do biossensor com o ECGLe, foi feito ainda o estudo de variação do pH da solução de detecção, como mostrado na figura 27.

Figura 27 - (A) voltamogramas de pulso diferencial em solução tampão TRIS 0,1 M, pH 7,5 (a), 8,0 (b), 8,5 (c) e 9,0 (d), $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ sobre ECGLe/poli(4-AHB)/EDC/NHS/FAL. Solução. (B) perfil de corrente de pico *versus* pH.



Fonte: Própria (2018)

Pode-se observar que, apesar do fabricante indicar que o pH 9,0 é o melhor para experimentos, os melhores resultados provêm dos valores de pH entre 8,0 e 8,5. Isso porque os experimentos sugeridos pelo fabricante são de ordem espectrofotométrica com enzima em solução. A presença de enzima imobilizada sobre eletrodo modificado com polímero e detecção eletroquímica pode provocar algumas alterações, como observado.

Apesar de inicial, o sistema se mostrou promissor para o desenvolvimento do biossensor. A imobilização da enzima e a detecção do composto padrão 4-nitrofenol é apenas o primeiro passo para detecção de produtos de catálise enzimática a partir de

pesticidas organofosforados. Além disso, o sistema ainda pode ser utilizado para detecção de enzima em solução, permitindo, assim, a identificação de quantidades alteradas da mesma em sistemas biológicos para averiguação de disfunções, principalmente ósseas e hepáticas.

Este trabalho apresenta como perspectivas futuras, a comprovação da eficiência do sistema esmaltado, a otimização dos parâmetros de detecção como pH da solução, tempo de contato do eletrodo com a enzima, concentração do substrato e demais parâmetros analíticos.

6 CONCLUSÃO

Foi possível neste trabalho promover a eletropolimerização do ácido 4-hidroxibenzóico sobre eletrodos de carbono grafite de lapiseira. A marca Pentel, dureza HB, tipo super hi-polymer 505C se destacou dentre as outras 10 marcas testadas para fins eletroquímicos, e foi utilizada em todo o trabalho.

Foi possível caracterizar o material na superfície do eletrodo através de experimentos eletroquímicos, como a diminuição nos valores de corrente em soluções de ferricianeto de potássio e cloreto de hexaminorutênio, indicando a presença de um material com características não-condutoras. EIE reforçou esta análise com valores altos de resistência à transferência de carga entre polímero e solução.

A caracterização eletroquímica também foi realizada em solução contendo apenas o ácido perclórico, no que foi possível de se observar a ausência de picos da região de oxidação do monômero, o que sugere sua ausência no eletrodo e a presença dos dois pares redox presentes em potenciais menos anódicos durante o processo de eletropolimerização.

Micrografias obtidas por MEV mostram um material homogêneo recobrindo todo o eletrodo e com camadas sugerindo uma grande modificação. Os espectros de infravermelho sugerem a presença dos grupos ácido carboxílicos no polímero além da formação de acoplamentos pelo átomo de oxigênio da hidroxila do grupo fenol, o que nos levou a uma proposta de um mecanismo de polimerização.

Os parâmetros de otimização foram feitos e chegou-se a uma concentração ótima do monômero de 5,0mM, concentração do eletrólito suporte de 0,5M e um número de

varreduras máximo de 30. Essas otimizações foram testadas em dois eletrodos montados de formas diferentes: utilizando resina e esmalte.

Apenas o sistema esmaltado promoveu respostas eletroquímicas confiáveis. A resina, de alguma forma está interagindo com a enzima imobilizada, além da dificuldade e tempo gasto para sua montagem. Foi possível, com o sistema esmaltado de identificar o produto da reação enzimática, 4-nitrofenol, que se mostrou eficiente mesmo contra medidas feitas em eletrodos sem modificação.

O biossensor em desenvolvimento poderá ser utilizado no futuro para detecção de pesticidas organofosforados além da detecção da própria enzima, mostrando a versatilidade do sistema para a área de exatas, de saúde e da terra.

REFERÊNCIAS

AKYILMAZ, E.; TUREMIS, M. An inhibition type alkaline phosphatase biosensor for amperometric determination of caffeine. **Electrochimica acta**, v. 55, n. 18, p. 5195-5199, 2010.

ALVES, L.M. **Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção de glutamato**. 2014. 67 f. Dissertação de mestrado – Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

ALVES, M.deF.; CORRÊA, R.A.M. de S.; CRUZ, F.S. da; FRANCO, D.L.; FERREIRA, L.F. Electrochemical enzymatic fenitrothion sensor based on a tyrosinase/poly(2-hydroxybenzamide)-modified graphite electrode. **Analytical biochemistry**, v. 553, p. 15-23, 2018.

ALVES, R.F.; SILVA, A.G.da; FERREIRA, L.F.; FRANCO, D.L. Synthesis and characterization of a material derived from 4-mercaptobenzoic acid: a novel platform for oligonucleotide immobilization. **Talanta**, v. 165, p. 69-75, 2016.

ARAÚJO, L.A.A.L. de; RAMALHO, L.N.Z.; ZUCOLOTO, S.; BAGNAO V.S.; SILVA JUNIOR O.deC. Estudo da fosfatase alcalina em ratos cirróticos hepatectomizados após aplicação de laser. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 16, n. 1, p. 16-17, 2001.

AYDEMIR, E.; BAYRAK, O. F.; SAHIN, F.; ATALAY, B.; KOSE, G.T.; OZEN, M.; SEVLI. S.; DALAN, A.B.; YALVAC, M.E., DOQRULUK,T., TÜRE, U. Characterization of cancer stem-like cells in chordoma: Laboratory Investigation. **Journal of Neurosurgery**, v. 116, n. 4, p. 810-820, 2012.

AYDEMIR, N.; MALMSTRÖMA, J.; TRAVAS-SEJDICA, J. Conducting polymer based electrochemical biosensors . **Physical chemistry chemical physics**, v. 18, n. 12, p. 8264-8277, 2016.

BARBOZA, H.T.G.; NASCIMENTO, X.P.R.; FREITAS-SILVA, O.; SOARES, A.G.; DACOSTA, J.B.N. Compostos organofosforados e seu papel na agricultura. **Revista virtual de química**, v. 10, n. 1, p. 172-193, 2018.

CALIL, S.S.; SILVA, P.R.Q. **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade**. Disponível em:

<<http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>>. Acesso em 30 out. 2018.

CHU, H.; WEI, X.; WU, M.; YAN, J.; TUNCO, Y. An electrochemiluminescent biosensor based on polypyrrole immobilized uricase for ultrasensitive uric acid detection. **Sensors and actuators b: chemical**, v. 163, n. 1, p. 247-252, 2012.

COMPTON, R.G.; BANKS, C.E. **Understanding voltammetry**. 1 ed. London: World Scientific, 2007. 384 p.

CORRÊA, R.A.M.S.; CRUZ F.S.da; SANTOS, C.C.; PIMENTA, T.C.; FRANCO, D.L.; FERREIRA, L.F. Optimization and application of electrochemical transducer for detection of specific oligonucleotide sequence for mycobacterium tuberculosis. **Biosensors**, v. 8, n. 3, p. 84, 2018.

CRUZ, F.S.da; PAULA, F.deS.; FRANCO, D.L.; SANTOS, W.T.P.dos; FERREIRA, L.F. Electrochemical detection of uric acid using graphite screenprinted electrodes modified with prussian blue/ poly(4-aminosalicylic acid)/uricase. **Journal of electroanalytical chemistry**, v. 806, p. 172-179, 2017.

CUNDY, T.; REID, I.R. Paget's disease of bone. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 12, p. 970-975, 2012.

DEIRDRE, A.K. Liver and biliary disease in childhood. **Medicine**, v. 43, n. 11, p. 631-635, 2015.

EMAM, A.A.; MOUSA, S.G.; AHMED, K.Y; AL-AZAB, A A. Inflammatory Biomarkers in Patients with Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism. **Medical Principles and Practice**, v. 21, n. 3, p. 249-253, 2012.

ENSAFI, A.A.; KHODDAMI, E.; REZAEI, B. Aptamer@Au-o-phenylenediamine modified pencil graphite electrode: a new selective electrochemical impedance biosensor for the determination of insulin. **Colloids and surfaces b: biointerfaces**, v. 159, p. 47-53, 2017.

FERREIRA, L.F.; SOUZA, L.M.; FRANCO, D.L. ; CASTRO, A.C.H.; OLIVEIRA, A.A.; BOODTS, J.F.C.; G.BRITO-MADURRO, A.; MADURRO, J.M. Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid. **Materials chemistry and physics**, v. 129, n. 1-2, p. 46-52, 2011.

FRANCO, D.L. **Eletropolimerização de aminofenóis para desenvolvimento de biossensores eletroquímicos aplicados à detecção de gene específico para câncer de próstata**. 2007. 92 f. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

FRANCO, D.L.; AFONSO, A.S.; VIEIRA, S.N.; FERREIRA, L.F.; GONÇALVES, R.A.; BRITO-MADURRO, A.G.; MADURRO, J.M. Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: electric and morphologic properties. **Materials chemistry and physics**, v. 107, p. 404–409, 2008.

FURSTENAU, C.R. **Participação da Sinalização Purinérgica na Hipertensão Arterial Induzida por L-NAME**. 2010. 172 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

GIMÉNEZ-GÓMEZ, P.; GUTIÉRREZ-CAPITÁN, M.; CAPDEVILA, F.; PUIG-PUJOL, A.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C.; JIMÉNEZ-JORQUERA, C. Monitoring of malolactic fermentation in wine using an electrochemical bienzymatic biosensor for l-lactate with long term stability. **Analytica chimica acta**, v. 905, p. 126–133, 2016.

HATTORI, S.; YAMAMOTO, K.; TESHIMA, S.; KAWAMURA, Y. **Alkaline phosphatase** United States Patent 5821095, 1998.

HERVÁS PÉREZ, J.P.; LÓPEZ-RUIZ, B.; LÓPEZ-CABARCOS, E. Synthesis and characterization of microparticles based on poly-methacrylic acid with glucose oxidase for biosensor applications. **Talanta**, v. 149, p. 310-318, 2016.

HUY, N.L.; THUY, N.T.M.; BINH, N.H.; HINH, N.N.; TRANG, M.T.; CHINH, H.D.; NGOC, P.T.; PHUC, N.X.; ANH, N.V.; LAM, T.D. Covalent immobilization of cholesterol oxidase and poly(styrene-co-acrylic acid) magnetic microspheres on polyaniline films for amperometric cholesterol biosensing. **Analytical methods**, v. 5, n. 6, p. 1392-1398, 2013.

IZADI, Z.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; ENSAFI, A.A.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Fabrication of an electrochemical dna-based biosensor for *bacillus cereus* detection in milk and infant formula. **Biosensors and bioelectronic**, v. 80, p. 582-589, 2016.

JĘDRYCHOWSKA, A. ; MALECHA, K.; CABAJA, J.; SOŁODUCHO, J. Laccase biosensor based on low temperature co-fired ceramics for the permanent monitoring of water solutions. **Electrochimica acta**, v. 165, p. 372-382, 2015

MARQUES, P.R.B.O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

MILAGRES, K.I. **Formulação e caracterização de uma resina epóxi com memória de forma**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ciência dos Materiais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, 2015.

NAGATA, Y.; IMANISHI, Y.; ISHII, A.; KURAJOH, M.; MOTOYAMA, K.; MORIOKA, T.; NAKA, H.; MORI, K.; MIKI, T.; EMOTO, M.; INABA, M. Evaluation of bone markers in hypophosphatemic rickets/osteomalacia. **Endocrine**, v. 40, n. 2, p. 315–317, 2011.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de lehniger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1336 p.

NEZHADALI, A.; MEHRI, L.; SHADMEHRI, R. Determination of methimazole based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite sensor. **Materials science and engineering: C**, v. 85, p. 225-232, 2018.

PACHECO, W.F.; SEMAAN, F.S.; ALMEIDA, V.G.K.; RITTA, A.G.S.L.; AUCÉLIO, R.Q. Voltametrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista virtual de química**, v. 5, n. 3, p. 516-537, 2013.

PARAÍSO, L.F.; PAULA, L.F.de; FRANCO, D.L.; MADURRO, J.M.; BRITO-MADURRO, A.G. Bioelectrochemical detection of alanine aminotransferase for molecular diagnostic of the liver disease . **International journal of electrochemical science** v. 9, p. 1286 - 1297, 2014.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry**. 3 ed. USA: Fort Worth Harcourt College, 2001. 649 p.

POHANKA, M. Piezoelectric biosensor for the determination of tumor necrosis factor alpha. **Talanta**, v. 178, p. 970-973, 2018.

PRADELA-FILHO, L.A.; ARAÚJO, D.A.G.; TAKEUCHI, R.M.; SANTOS, A.L. Nail polish and carbon powder: an attractive mixture to prepare paper-based electrodes. **Electrochimica acta**, v. 258, p. 786-792, 2017.

RASHIDA, M.; IQBAL, J. Inhibition of alkaline phosphatase: an emerging new drug target. **Mini-reviews in medicinal chemistry**, v. 15, n. 1, p. 41-51, 2015.

RIBEIRO, F.W.P.; LUCAS, F.W.deS.H.; MASCARO, L.; MORAIS, S.; CASCIANO, P.N.daS.; LIMA-NETO, P.de; CORREIA, A.N. Electroanalysis of formetanate hydrochloride by a cobalt phthalocyanine functionalized multiwalled carbon nanotubes

modified electrode: characterization and application in fruits. **Electrochimica acta**, v. 194, p. 187-198, 2016.

SHIRAKAWA, H.; LOUIS, E.J.; MACDIARMID, A.G.; CHIANG, C.K.; HEEGER, A.J. Synthesis of electrically conducting organic polymers halogen derivatives of polyacetylene. **Journal of the chemical society, Chemical Communications**, v. 16, p. 578, 1977.

SILVA, M.P.da. **Determinação de pesticidas organofosforados através de método enzimático**. 2011. 140f. Tese (Doutorado) – Doutorado em ciências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Spectrometric identification of organic compounds also viewed**. 7 ed. USA: Wiley & Sons, 2005. 502 p

SOYLEMEZ, S.; KANIKB, F.E.; NURIOGLU, A.G.; AKPINAR, H.; TOPPARE, L.A novel conducting copolymer: investigation of its matrix properties for cholesterol biosensor applications. **Sensors and actuators b: chemical**, v. 182, p. 322–329, 2013.

TORRINHA, Á.; AMORIM, C.G.; MONTENEGRO, M.C.B.S.M.; ARAÚJO, A.N. Biosensing based on pencil graphite electrodes. **Talanta**, v. 190, p. 235-247, 2018.

UPADHYAY, L.S.B.; VERMA, N. Alkaline phosphatase inhibition based conductometric biosensor for phosphate estimation in biological fluids. **Biosensors and bioelectronics**, v. 68, p. 611-616, 2015.

WANG, J. Electrochemical Glucose Biosensors. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 2, p. 814-825, 2008.

WANG, J.; KAWDE, A.; SAHLIN, E. Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA. **The analyst**, v. 125, n. 1, p. 5-7, 2000.

WANG, J.; PAMIDI, P.V.A. Sol-gel-derived gold composite electrodes. *Analytical chemistry*, v. 69, n. 21, p. 4490–4494, 1997.

WEN, G.; WEN, X.; SHUANG, S.; CHOI, M.M.F. Whole-cell biosensor for determination of methanol. **Sensors and actuators b: chemical**, v. 201, p. 586-591, 2014.

WILKINS, E.; CARTER, M.; VOSS, J.; IVNITSKI, D. A quantitative determination of organophosphate pesticides in organic solvents. **Electrochemistry communications**, v. 2, n. 11, p. 786-790, 2000.

ZHANG, H.; RUAN, J.; LIU, W.; JIANG, X.; DU, T.; JIANG, H.; ALBERTO, P.; GOTTSCHALK, K.E.; WANG, X. . Monitoring dynamic release of intracellular hydrogen peroxide through a microelectrode based enzymatic biosensor. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 410, n. 18, p. 4509-4517, 2018.