

# CONSTRUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO BASEADO EM ELETRODOS DE MI-NICAVIDADE COM PASTA DE CARBONO\*

CONSTRUCTION, CHARACTERIZATION AND OPTIMIZATION OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR BASED IN MINICAVITY ELECTRODES WITH CARBON PASTE

CONSTRUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS BASADOS EN ELECTRODOS DE MINICAVIDAD CON PASTA DE CARBON

Tainá Leal Lima dos Santos

Graduanda em Química Industrial pela  
Universidade Federal do Maranhão/UFMA

Paulo Roberto Brasil de Oliveira Marques

Pós-doutor em Química pela Universidade Federal de São Carlos

Gilvanda Silva Nunes

Pós-doutora em Química Analítica pela Univerisité de Perpignan

**RESUMO:** O presente estudo focou a construção de um biossensor baseado em pasta de carbono inserido em minicavidade. A proposta foi avaliar o sensor como plataforma para o desenvolvimento de eletrodos modificados com mediadores eletroanalíticos para mediação do processo catalítico de enzimas acetilcolinesterases. A pasta de carbono foi desenvolvida a partir da mistura de grafite em pó e óleo mineral, sendo inserida em uma minicavidade de 0,3 mm de diâmetro em sensor de vidro. Foi efetuada a caracterização do sensor por voltametria cíclica e de pulso diferencial em meio de tampão fosfato pH 7,2. Posteriormente o eletrodo foi modificado com TCNQ e azul de metileno, na proporção de 1% (m/m). Os sensores modificados foram avaliados por voltametria cíclica e de pulso diferencial. Foi efetuado um estudo quimiométrico para definição das melhores condições de catálise enzimática (planejamento fatorial  $2^4$ ), sendo avaliados os fatores: tipo de mediador, porcentagem de mediador, quantidade de enzima e concentração do substrato enzimática, nos níveis alto e baixo. Os picos relativos aos processos redox indicaram que o TCNQ apresentou melhores características de sinais eletroanalíticos na caracterização. O estudo quimiométrico indicou que o tipo de mediador influencia mais fortemente no sistema de catálise. O azul de metileno 1,5%, com a enzima acetilcolinesterase imobilizada (0,1 U/eletrodo), sendo catalisada por cloreto de acetilcolina (entre 1 a 2 mmol L<sup>-1</sup>) foi a melhor condição desenvolvida no estudo. As curvas analíticas iniciais indicam que o conjunto pode ser uma plataforma bastante eficiente para construção de biossensores enzimáticos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Eletrodo de minicavidade. Biossensores amperométricos. Mediadores eletroquímicos.

**ABSTRACT:** This study focused on the construction of biosensors based on carbon minicavity inserted into paste. The proposal was to evaluate the sensor as a platform for the development of electrodes modified with electroanalytical mediators to mediate the catalytic process of enzymes acetylcholinesterase. The carbon paste was developed from a mixture of powdered graphite and mineral oil were placed in a mini cavity of 0.3 mm diameter glass sensor. The characterization of the sensor was performed by cyclic voltammetry and differential pulse amid phosphate buffer pH 7.2. Thereafter, the electrode was modified with methylene blue and TCNQ at a ratio of 1% (w/w). The modified sensors were evaluated by cyclic voltammetry and differential pulse. The kind of mediator, the mediator percentage, the amount of enzyme

\* Trabalho premiado durante o XXV Encontro do SEMIC, realizado na UFMA, entre os dias 18 a 22 de novembro de 2013.  
Artigo recebido em fevereiro de  
2014 Aprovado abril de 2014

and substrate concentration of enzyme, the high and low levels: A chemometric study to define the best conditions for enzymatic catalysis ( $2^4$  factorial design) and evaluated the factors was performed. The peaks for the redox processes indicated that the TCNQ showed better characteristics of electroanalytical signal characterization. The chemometric study indicated that the type of mediator influence more strongly in catalysis system. Methylene blue 1.5%, with acetylcholinesterase immobilized enzyme (0.1 U/electrode) and is catalyzed by acetylthiocholine chloride (between 1 and 2 mmol L<sup>-1</sup>) was the best condition developed in the study. The initial calibration curves indicate that the assembly can be a very powerful platform for building enzyme biosensors.

**KEYWORDS:** Minicavity electrode. Amperometric biosensors. Electrochemical mediators.

**RESUMEN:** Esta investigación se centró en la construcción de biosensores basados en minicavidad con pasta de carbón allí insertados. I. La propuesta fue evaluar el sensor como una plataforma para el desarrollo de electrodos modificados con mediadores electroanalíticos para mediar en el proceso catalítico de las enzimas acetilcolinesterasa. La pasta de carbón se desarrolló a partir de una mezcla de grafito en polvo y aceite mineral, se colocaron en un mini cavidad de 0,3 mm de diámetro del sensor de vidrio. La caracterización del sensor se realizó mediante voltametría cíclica y el pulso diferencial en medio de tampón fosfato pH 7,2. A partir de entonces, el electrodo se modificó con azul de metileno y TCNQ en una proporción de 1 % (w/w). Los sensores modificados fueron evaluados por voltametría cíclica y de pulso diferencial. Fue realizado un estudio quimiométrico para mejor definición de las mejores condiciones de catalise enzimática, (diseño factorial  $2^4$ ) siendo evaluados los siguientes factores: tipo de mediador, el porcentaje de mediador, la cantidad de concentración de enzima y sustrato de enzima en los niveles altos y bajos. Los picos de los procesos redox indicaron que el TCNQ mostró mejores características de la caracterización de la señal electroanalítico. El estudio quimiométrico indicó que el tipo de mediador influye más fuertemente el sistema de catálisis. El azul de metileno 1,5 %, con acetilcolinesterasa inmovilizada de la enzima (0,1 U/electrodo) y catalizada por cloruro de acetiltiocolina (entre 1 y 2 mmol de L<sup>-1</sup>) fue la mejor condición desarrollado en el estudio. Las curvas de calibración iniciales indican que el conjunto puede ser una plataforma muy potente para la construcción de biosensores enzimáticos.

**PALABRAS CLAVE:** Electrodo de minicavidad. Biosensores amperométricos. Mediadores electroquímicos.

## 1 | Introdução

Os sensores em geral são transdutores capazes de converter em sinais mensuráveis, estímulos externos resultantes de atividades físicas ou químicas (HE; TOH, 2006). São utilizados nas mais diversas áreas e, nos últimos anos, têm se destacado os sensores modificados para fins analíticos. Tal modificação é realizada de modo que atenda as características dos elementos envolvidos no desenvolvimento da análise, sendo que o nível de sensibilidade, o meio ambiente da amostra, custo, tempo de vida útil do sensor e o uso específico, são fatores determinantes quando da escolha dos tipos de componentes a serem utilizados na atividade de modificação do sensor (EGGINS, 2002). Os sensores compostos de um elemento de reconhecimento biológico em contato direto com um elemento transdutor são chamados de biossensores, que por sua vez fornecem informações analíticas específicas e quantitativas sobre a interação entre o substrato de interesse e o receptor bioquímico, que pode gerar sinais específicos, resultantes de variações do sistema, tais como, diferença na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, variação de massa, mudança de estado de oxidação, entre os quais são convertidos pelo transdutor em informações que podem ser medidas através de uma unidade processadora de sinais. Logo, o componente biológico (receptor bioquímico) é responsável por determinar o grau de seletividade ou especificidade, e ao elemento transdutor é conferida a sensibilidade do sistema (MARQUES; YAMANAKA, 2008). Assim, um biossensor combina a especificidade de um componente biológico ativo, para o analito de interesse, com a sensibilidade de um transdutor, que converte o sinal biológico em um sinal elétrico proporcional à concentração do analito. Os biossensores representam ferramentas promissoras para suplementar as técnicas existentes, devido às suas características únicas, tais como: seletividade, baixo custo de construção e estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e possibilidade de construção de equipamentos simples e portáteis (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

A parte do componente biológico que entra em contato com o analito produzindo um sinal, pode ser um receptor, enzima, organela, anticorpo, ácido nucléico, entre outros. Sendo assim, de acordo com o elemento biológico utilizado para a sua construção, os biossensores podem ser divididos em várias classes. Dentre elas, mais difundidas são: os enzimáticos, microbiológicos, os quimiorreceptores e os imunossensores. O elemento transdutor age como uma interface, medindo a mudança física ou química que ocorre na reação com o biorreceptor, transformando essa energia em um produto mensurável, como massa, carga, calor ou luz (JANATA; JOSOWICZ; DEVANEY, 1994). Os biossensores eletroquímicos, em especial os amperométricos, têm características bastante vantajosas: são simples, sensíveis, com baixo custo, permitindo a determinação de analito numa ampla faixa de concentração e requer um tratamento mínimo da amostra. Desde que surgiram os primeiros estudos sobre biossensores, estes dispositivos de análise vêm sendo cada vez mais difundidos e tem se tornado mais crescente a produção científica acerca desta importante ferramenta analítica. A abrangente aplicabilidade e o caráter multidisciplinar que envolve as mais diversas utilizações dos biossensores contribuem para maior difusão desta técnica. Dentre as áreas que fazem uso de biossensores em determinações, podemos destacar: a medicina na detecção de patógenos e monitoramento de nutrientes; a segurança, no sensoriamento remoto de bactérias no ar (MARIOTTI; MARQUES; YAMANAKA, 2009); a indústria de alimentos, na determinação de resíduos de medicamentos em carnes, além de identificar patógenos e toxinas alimentares; e no controle ambiental, no qual tem destaque a detecção de pesticidas em águas, instrumentada por biossensores enzimáticos (MARQUE; MARQUES; NUNES, 2006). Na determinação de pesticidas, as enzimas mais utilizadas para identificação de organofosforados e carbamatos, tem sido as acetilcolinesterases (AChE) (MARQUES et al., 2004). Esta utilização se deve pelo fato desses tipos de pesticidas inibem a atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE). Estes inibidores afetam as reações enzimáticas atuando no mecanismo cinético dessas

reações, podendo aumentar ou diminuir a velocidade reacional, pela modificação na estrutura dos sítios das diferentes enzimas e, conseqüentemente, alterando a atividade catalítica. Des-te modo, quando a enzima AChE é imobilizada na superfície do eletrodo, há interação com o substrato, produzindo uma espécie eletroativa. Nessa estratégia, acetiltiocolina pode substituir o substrato original da AChE, a acetilcolina. Assim, o novo substrato (acetiltiocolina) é hidrolisado da mesma forma como o substrato original, produzindo tiocolina e o ácido carboxílico correspondente (ácido acético, no caso). Os elétrons gerados durante a reação eletroquímica são coletados, e a corrente final é a medida quantitativa da atividade da enzima (NUNES et al., 2001).

## 1.1 | Mediadores eletroquímicos

Os mediadores são moléculas eletricamente ativas que são ligadas a superfície do eletrodo, agindo como pontes de transferência de elétrons entre o eletrodo e a espécie eletroativa na solução. Portanto, a imobilização em presença de um mediador eletroquímico tem como objetivo aumentar a taxa de transferência de elétrons através do eletrodo de trabalho modificado, proporcionando um potencial baixo e reduzindo a perda de atividade enzimática, obtendo sensores de elevada sensibilidade. Alguns mediadores como o tetracianoquinodimetano (TCNQ) e azul de metileno têm sido empregados na modificação de eletrodos de pasta de carbono com o objetivo de otimizar os resultados da técnica dos biossensores (PUMERA et al., 2007).

## 1.2 | Eletrodos de pasta de carbono/ Eletrodos de minicavidade

A aplicação de novos materiais na construção de biossensores, assim como o uso de distintas técnicas de imobilização de materiais biológicos, fatores estes associados aos variados tipos de monitoramento eletroanalítico, constituem uma gama de potencialidades que podem ser empregadas na área de biossensores, que se encontra em pleno desenvolvimento investigativo (PIVIDORI, 2002). A utilização de eletrodos carbono em eletroanálises, por exemplo, está em crescente expansão, este fato se deve a alguns fatores apresentados por este eletrodo: larga faixa de potencial; baixa corrente de fundo; baixo custo; inércia química e por ser adequado em análises de detecção. Entre os eletrodos fabricados com carbono estão os de: carbono vítreo, pasta, fibra, filmes ou compósitos de carbono (LI; THOSTENSON; CHOU, 2008). Os eletrodos de pasta de carbono usa pó de grafite ou pó de carbono misturado a vários ligantes orgânicos (aglutinantes), que devem ser imiscíveis em contato com soluções aquosas, quimicamente inertes e eletroativos. Entre os aglutinantes mais utilizados está o Nujol (óleo mineral). Através da possibilidade de modificação interna do material eletródico é possível a co-imobilização de enzimas, cofatores, mediadores, estabilizadores resultando numa análise sem a necessidade de adição de reagentes durante a determinação, diferenciando dos eletrodos sólidos convencionais, em que a modificação ocorre apenas na superfície (NUNES et al., 2001). Para a adição do agente modificador existem alguns métodos, o método de adição direta consiste em adicionar certa massa de modificador em certa porção de grafite ou carbono em pó e um agente aglutinante.

Após a adição das substâncias que compõem a pasta, esta deve ser homogeneizada. A mistura obtida é pressionada firmemente dentro de uma seringa, pistão induzido (tubo cilíndrico de politetrafluoretileno) ou um corpo cilíndrico de PVC para moldar o eletrodo. Também pode ser utilizada uma matriz de compactação dentro de uma prensa manual. Os eletrodos de pasta de carbono oferecem facilidade de renovação e modificação da superfície, baixo ruído, baixo custo, e uma baixa contribuição da corrente de fundo (não farádica). A composição da pasta afeta fortemente a reatividade do eletrodo, pois, o aumento no conteúdo de ligante provoca uma diminuição na taxa de transferência de elétrons. Na ausência do ligante, o eletrodo de grafite ou de carbono seco

produz uma taxa de transferência de elétrons muito rápida que se aproxima das superfícies metálicas (CALIXTO, 2008). O eletrodo de minicavidade de contato sólido preenchida com de pasta de carbono apresenta área de trabalho relativamente reduzida, que possibilita uma economia de material, maior facilidade de compactação da pasta e principalmente apresentar estabilidade e reprodutibilidade de respostas nas medidas eletroquímicas, especialmente na melhoria do conta-to elétrico. Além disso, esses eletrodos apresentam todas as vantagens dos microeletrodos: seu reduzido tamanho permite seu uso em sistemas que os eletrodos de tamanho convencional não acessam. A mistura das técnicas de construção de biossensores de microcavidade constituído de pasta de carbono e modificado com enzimas colinesterases ainda não foi relatada na literatura e pode constituir uma nova plataforma para os biossensores.

Neste trabalho, objetivou-se o desenvolvimento inicial de um sensor de pasta de carbono a partir de um eletrodo de minicavidade que foi modificado com enzimas colinesterases. O eletrodo foi preparado a partir de estudos com a pasta, que foi previamente modificada com mediado-res eletroanalíticos e depois foi imobilizada a enzima acetilcolinesterases e o sinal de catálise foi avaliado. Um estudo quimiométrico foi efetuado para estabelecer os parâmetros de otimização das modificações realizadas.

## 2 | Materiais e reagentes

### 2.1 | Soluções e reagentes

As soluções estoques das enzimas foram preparadas diretamente nos frascos *ependorf* (1 mL) com NaCl 0,9% (m/v), previamente preparado, e armazenadas a uma temperatura aproximada de  $-18^{\circ}\text{C}$ , em freezer. A partir da diluição destas, em tampão fosfato (PBS)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH = 7,2, as demais soluções de trabalho foram preparadas, e pequenas alíquotas foram acondicionadas em frasco *ependorf* e armazenadas em temperatura inferior a  $10^{\circ}\text{C}$ , em refrigerador. O substrato cloreto de acetilticolina (ATChCl)  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , proveniente da Merck, foi preparado em tampão fosfato (PBS)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH = 7,2 e armazenado em refrigerador. Os reagentes tetracina-noquinodimetano (TCNQ) e azul de metileno foram provenientes da Merck.

### 2.2 | Equipamentos

Todas as medidas eletroquímicas usando os biossensores foram feitas em um potenciostato/galvanostato (Micro-AUTOLAB Tipo III, da marca Methrom, do NARP/UFMA). Foi utilizado o sistema montado de três eletrodos, sendo: trabalho (pasta de carbono em minicavidade), referência (Ag/AgCl) e auxiliar (fio de platina). A cela de trabalho foi um béquer de 10 mL. A solução tampão fosfato pH 7,2 foi utilizada como eletrólito.

## 3 | Metodologia

### 3.1 | Construção do sensor

O eletrodo de minicavidade foi adquirido com o Prof. Dr. Cecílio Sadao, da UNESP de Araraquara. A minicavidade apresenta 0,3 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade, dispostos em um tubo alcalino de vidro de 6 mm de diâmetro. A pasta de carbono foi feita a partir da mistura de pó de grafite e óleo mineral comercial na proporção (5:1, m/m). A mistura foi trabalhada em vidro de relógio e posteriormente adicionada à minicavidade. O eletrodo de pasta de carbono assim preparado foi polido em papel vegetal e lavado com água destilada, estando pronto para uso. Quando necessário todo o material foi removido por meio de ultrassom em acetona, a fim de que o eletrodo fosse novamente montado para posteriores medidas.

### 3.2 | Processos de incorporação do mediador eletroanalítico

Foram estudados os mediadores tetracianoquinodimetano (TCNQ) e azul de metileno como modificadores da pasta de carbono. O objetivo inicial foi avaliar o comportamento eletroanalíticos destes compostos visando à construção futura de biossensores mediados. Os compostos foram adicionados à pasta de carbono, durante o processo de preparo da mesma, em proporções defini-das, sendo o sinal eletroanalítico avaliado pelas técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e cronoamperometria.

### 3.3 | Imobilização enzimática

A enzima acetilcolinesterase foi imobilizada sobre a superfície do eletrodo por gotejamento de 50 µl de solução de imobilização (náfion 0,1% e enzima), sendo o conjunto deixado em repouso, por 16h, a 4º C. Posteriormente o biossensor assim preparado foi avaliado com relação à catálise enzimática do seu substrato cloreto de acetiltiocolina, em meio de eletrólito tampão fosfato pH 7,2, sendo selecionados os melhores parâmetros eletroanalíticos.

### 3.4 | Estudo quimiométrico

Foi realizado um estudo quimiométrico, com base num planejamento fatorial envolvendo dois níveis e quatro fatores. O objetivo foi avaliar as melhores condições de preparo do biossensor de minicavidade. Como fatores, foram estudados o tipo de mediador, a porcentagem de mediador, a quantidade de enzima e a concentração do substrato. A Tabela 1 apresenta os dados iniciais de preparo do planejamento. Como resposta, foi analisada a diferença de sinal de corrente crono-amperométrica de catálise enzimática, no potencial do mediador específico. Para avaliação dos dados foi utilizado o programa computacional MINITAB® 13.0.

**Tabela 1** - Planejamento fatorial 2<sup>4</sup>. Avaliação das melhores condições de catálise enzimática do biossensor de minicavidade.

Nível	FATORES				RESPOSTA
	Tipo de mediador	Mediador / %	Quantidade de enzima / U	Concentração do substrato / m mol L <sup>-1</sup>	
+	Azul de metileno	5	1	10	Δi/ A
-	TCNQ	1	0,1	1	

Fonte: Elaborado pelos autores

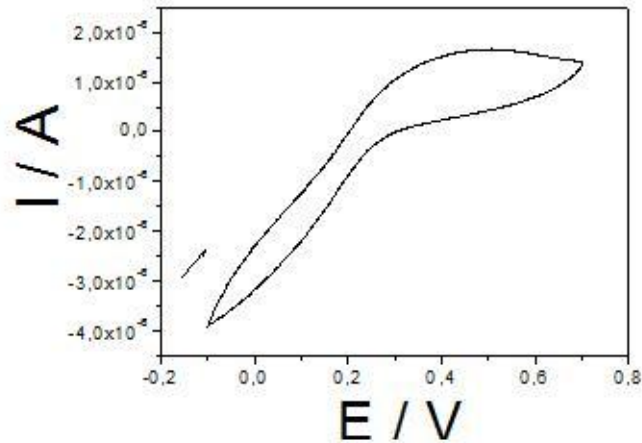
## 4 | Resultados e discussões

### 4.1 | Caracterização do sensor de pasta em minicavidade

O voltamograma da figura 1 apresenta o comportamento de eletrodo de pasta de carbono em minicavidade em ferricianeto de potássio, em eletrólito tampão fosfato pH 7,2. Não foi observado o comportamento esperado convencional de dois picos bem definidos dos processos redox do composto ferricianeto, provavelmente pela diferença de diâmetro em um eletrodo comercial e um

eletrodo de minicavidade, cuja área de trabalho eletródica é muito pequena, podendo ter comportamento semelhante aos microeletrodos, que apresentam um voltamograma bem característico que se assemelha a este obtido, ou seja, com forma sigmoideal, com baixa/média histerese. O que define este comportamento é justamente a diminuição da área de trabalho em função da difusão do material sobre a mesma.

**Figura 1** - Voltamograma cíclico de ferricianeto de potássio em tampão fosfato pH 7,2. Eletrodo de pasta de carbono em minicavidade.

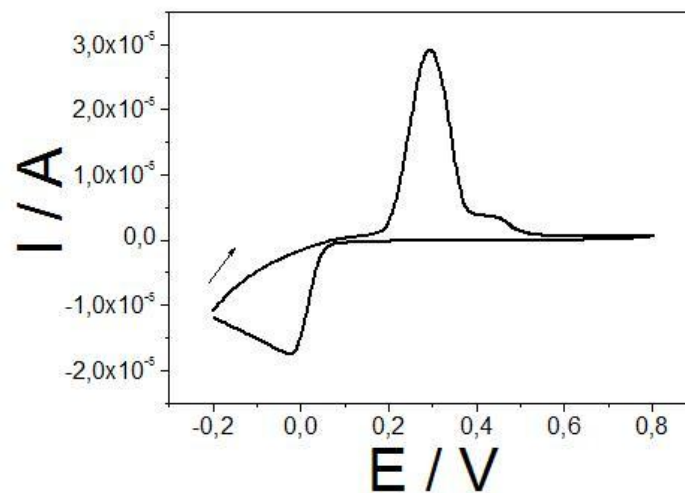


Fonte: Elaborado pelos autores

#### 4.2 | Caracterização do sensor de pasta em minicavidade modificado com mediadores TCNQ e azul de metileno

Posteriormente o eletrodo foi modificado com os mediadores TCNQ e azul de metileno, na porcentagem de 1% da pasta de carbono/óleo mineral. Este conjunto foi caracterizado por volta-metria cíclica e de pulso diferencial. A figura 2 apresenta o voltamograma cíclico para o sistema eletródico modificado com TCNQ em tampão fosfato. O comportamento apresenta pico anódico em aproximadamente + 300 mV e pico catódico próximo de 0,0 mV.

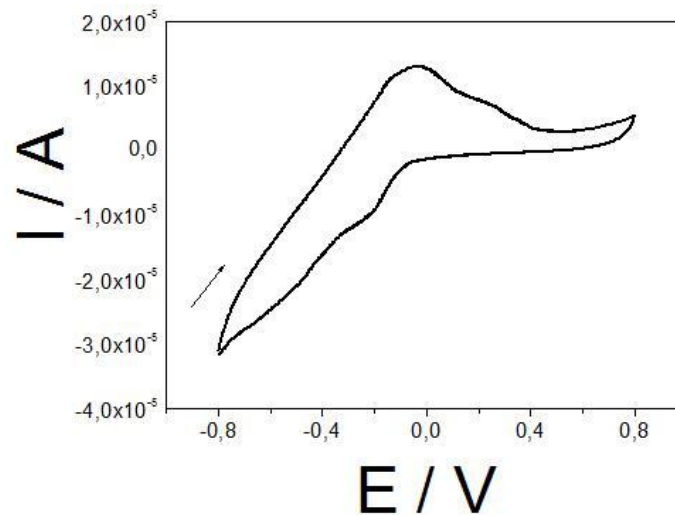
**Figura 2** - Voltamograma cíclico de ferricianeto de potássio em tampão fosfato pH 7,2. eletrodo de pasta de carbono em minicavidade/TCNQ em minicavidade.



Fonte: Elaborado pelos autores

A figura 3 mostra o comportamento para o eletrodo modificado com azul de metileno em tampão fosfato. Foi denotado um pico anódico próximo de 0,0 mV. O alargamento do pico indica complicações cinéticas no processo redox do azul de metileno na superfície de grafite.

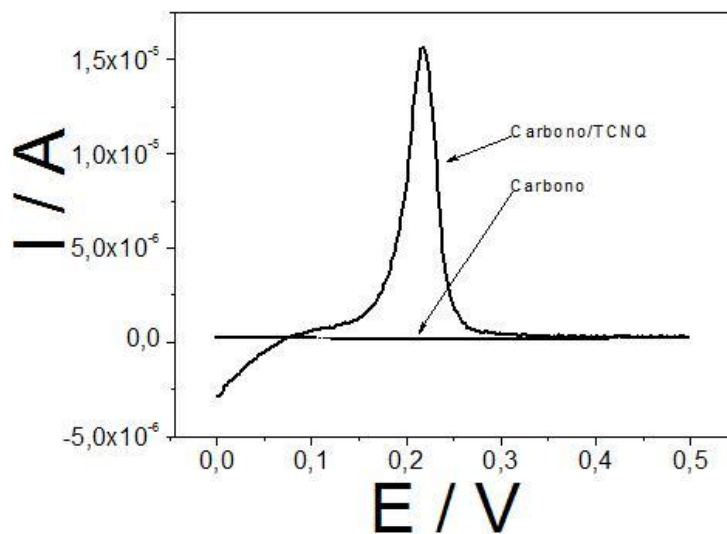
**Figura 3** - Voltamograma cíclico em tampão fosfato pH 7,2. Eletrodo de pasta de carbono/azul de metileno em minicavidade.



**Fonte:** Elaborado pelos autores

As figuras 4 e 5 apresentam os voltamogramas de pulso diferencial para as duas modificações efetuadas. Para o sistema modificado com TCNQ (figura 5), o eletrodo apresentou pico de oxidação em potencial de +216 mV e corrente de pico anódica de 15  $\mu$ A. O pico foi obtido de forma bem definida, evidenciando que o modificador foi bem inserido na pasta de carbono. Para o sistema com azul de metileno (figura 6), o pico de oxidação foi denotado em potencial de -175 mV, com corrente de pico em torno de 7,7  $\mu$ A.

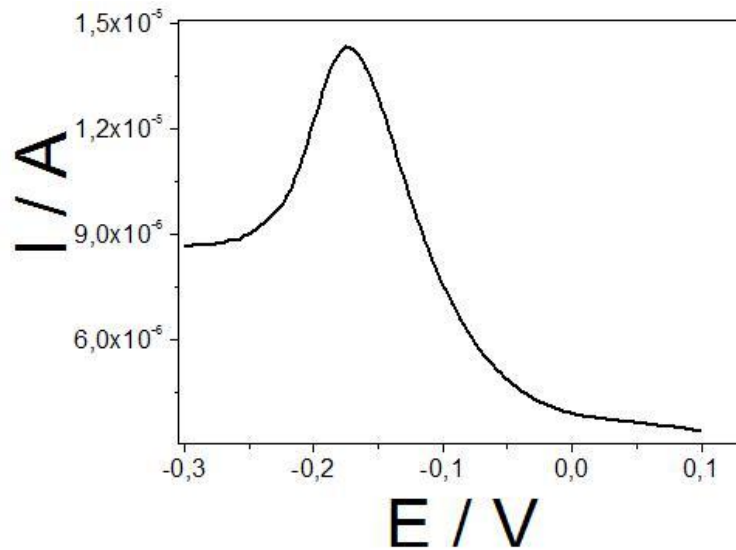
**Figura 4** - Voltamograma de pulso diferencial em tampão fosfato pH 7,2. Eletrodo de pasta de carbono em minicavidade, sem modificação e com modificação com TCNQ.



**Fonte:** Elaborado pelos autores



**Figura 5** - Voltamograma de pulso diferencial em tampão fosfato pH 7,2. Eletrodo de pasta de carbono em minicavidade, com modificação com azul de metileno.



Fonte: Elaborado pelos autores

### 4.3 | Ensaio quimiométrico: planejamento experimental

**Tabela 2** - Planejamento fatorial 2<sup>4</sup>, fatores, níveis e respostas obtidas para n=2.

EXPERIMENTOS	FATORES				RESPOSTA		
	A	B	C	D	n 1	n 2	Média
1	+	-	+	+	1,522 x10 <sup>-6</sup>	1,564 x10 <sup>-6</sup>	1,54E-06
2	+	-	+	-	1,552 x10 <sup>-6</sup>	1,473 x10 <sup>-6</sup>	1,51E-06
3	+	-	-	-	1,575 x10 <sup>-6</sup>	1,568 x10 <sup>-6</sup>	1,57E-06
4	+	-	-	+	1,521 x10 <sup>-6</sup>	1,553 x10 <sup>-6</sup>	1,54E-06
5	+	+	+	+	-1,630 x10 <sup>-6</sup>	-1,703 x10 <sup>-6</sup>	-1,67E-06
6	+	+	+	-	-6,050 x10 <sup>-7</sup>	-7,130 x10 <sup>-7</sup>	-6,59E-07
7	+	+	-	-	-9,370 x10 <sup>-7</sup>	-1,040 x10 <sup>-6</sup>	-9,89E-07
8	+	+	-	+	-9,310 x10 <sup>-7</sup>	-9,850 x10 <sup>-7</sup>	-9,58E-07
9	-	+	+	+	-4,950x10 <sup>-8</sup>	-1,930x10 <sup>-8</sup>	-3,44E-08
10	-	+	+	-	-3,960x10 <sup>-7</sup>	-2,908x10 <sup>-7</sup>	-3,43E-07
11	-	+	-	-	-7,238x10 <sup>-7</sup>	-3,127x10 <sup>-7</sup>	-5,18E-07
12	-	+	-	+	9,830x10 <sup>-9</sup>	5,634x10 <sup>-8</sup>	3,31E-08
13	-	-	+	+	2,813x10 <sup>-7</sup>	3,090x10 <sup>-7</sup>	2,95E-07
14	-	-	+	-	2,468x10 <sup>-7</sup>	2,633x10 <sup>-7</sup>	2,55E-07
15	-	-	-	-	3,050x10 <sup>-7</sup>	3,107x10 <sup>-7</sup>	3,08E-07
16	-	-	-	+	3,039x10 <sup>-7</sup>	3,293x10 <sup>-7</sup>	3,17E-07

O estudo teve como base a avaliação do sinal de corrente obtido antes e após a modificação do eletrodo de pasta com os mediadores. O sinal de corrente foi obtido pela técnica de cronoamperometria, em potenciais específicos dos relativos modificadores, definidos nas etapas anteriores de caracterização, com 120s de potencial aplicado ao sistema. A tabela 2 apresenta o estudo efetuado em suas condições de fatores, níveis e respostas. A partir deste ensaio, vários gráficos de avaliação foram

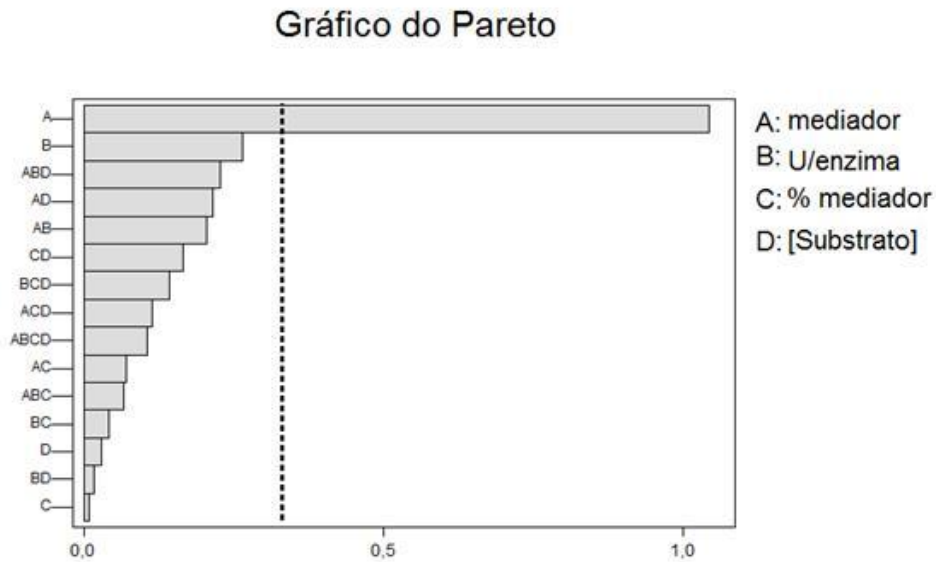
obtidos a partir do software A=tipo de mediador, B=% de mediador na pasta, C=quantidade de enzima / U no MI-NITAB, sendo avaliados eletrodo, D=concentração do substrato, + = nível alto, - = nível baixo.

quais os fatores seriam **Fonte:** Elaborado pelos autores

os mais significativos, ou seja, que a partir da variação poderiam causar um maior efeito na resposta eletroanalítica obtida.

A figura 6 apresenta o gráfico do Pareto. De acordo com esse gráfico, o fator que apresentou mais influência nos sistemas foi o tipo de mediador (fator A) eletroanalítico utilizado, pois o fator ficou além da linha tracejada limítrofe. Os demais fatores e a associação entre eles não apresentaram tanta influência no sistema.

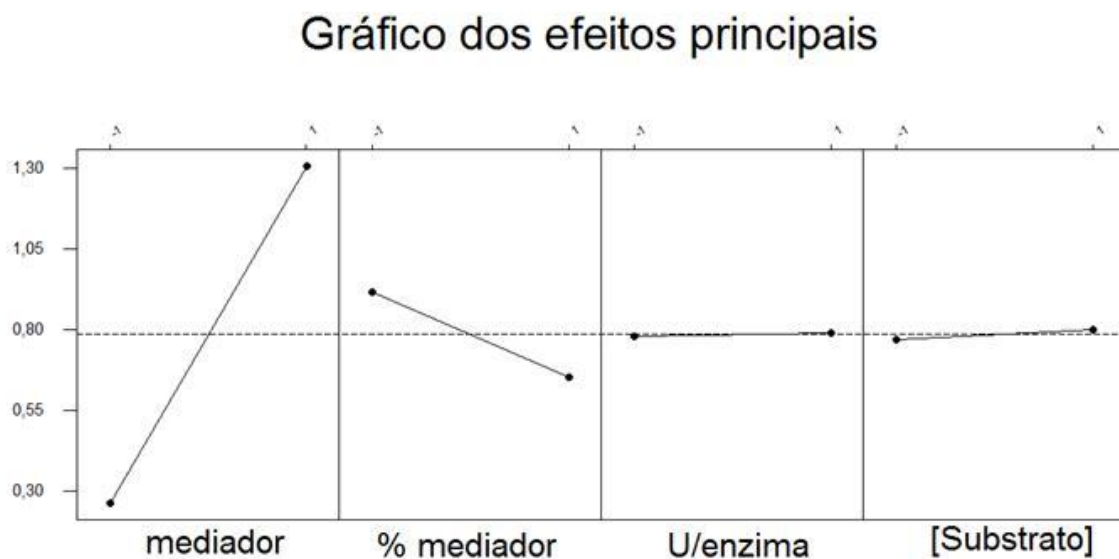
Figura 6 - Gráfico do Pareto. O fator A (tipo de mediador) tem a maior influência no sistema.



Fonte: Elaborado pelos autores

Pelo gráfico dos efeitos principais (figura 7), pode se perceber que o tipo de mediador também foi evidenciado como o que mais influencia nas respostas, pois foi o que apresentou maior inclinação, o que demonstra uma maior variabilidade de resposta analítica. A porcentagem de mediador também pode ser destacada.

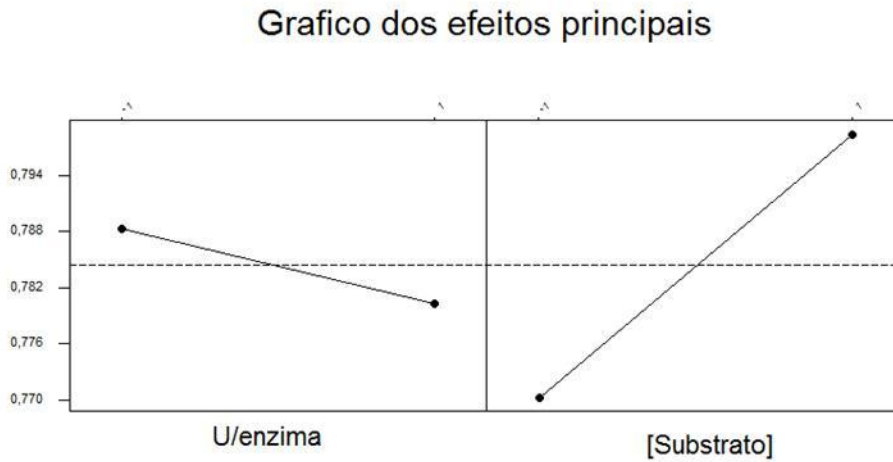
Figura 7 - Gráfico dos efeitos principais. O fator A (tipo de mediador) tem a maior influência no sistema.



Fonte: Elaborado pelos autores

Quando se compara somente a questão da catálise, ou seja, o efeito da quantidade de enzima e da concentração do substrato, este último pode ser considerado como o de maior efeito na resposta do sistema (figura 8).

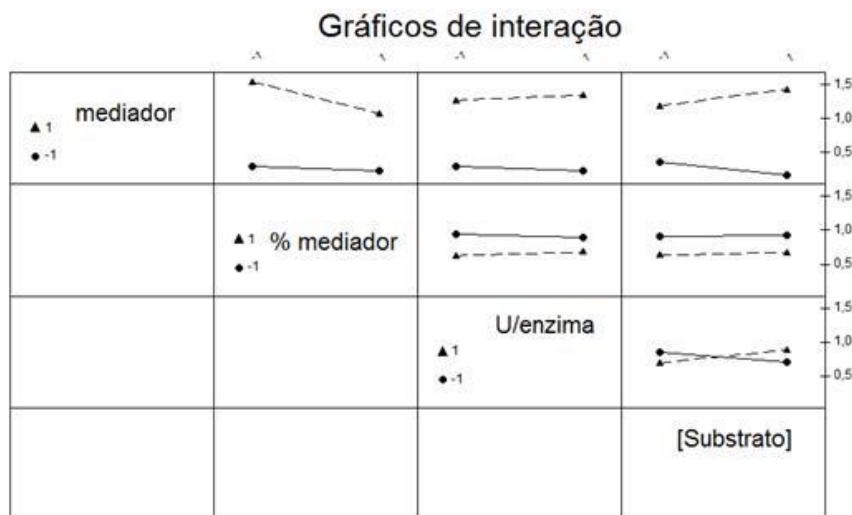
**Figura 8** - Gráfico dos efeitos principais para os fatores C e D. O fator D (concentração do substrato) tem a maior influência no sistema.



Fonte: Elaborado pelos autores

Observando-se as interações entre os fatores, a figura 9 evidencia que o tipo de mediador e a quantidade de mediador podem interagir para produzir os maiores efeitos. Observa-se que o tipo de mediador sempre causa efeitos mais pronunciados quando associado aos outros efeitos.

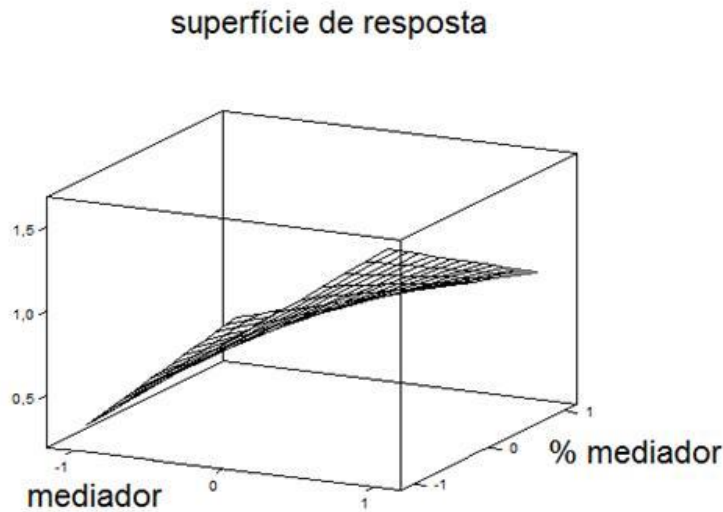
**Figura 9** - Gráfico das interações entre os efeitos.



Fonte: Elaborado pelos autores

Na figura 10, a superfície de resposta resultante da análise dos dados em comparação entre o fator mediador e o fator % de mediador indicou que o mediador azul de metileno e, baixas concentrações resultam em melhores respostas do sistema.

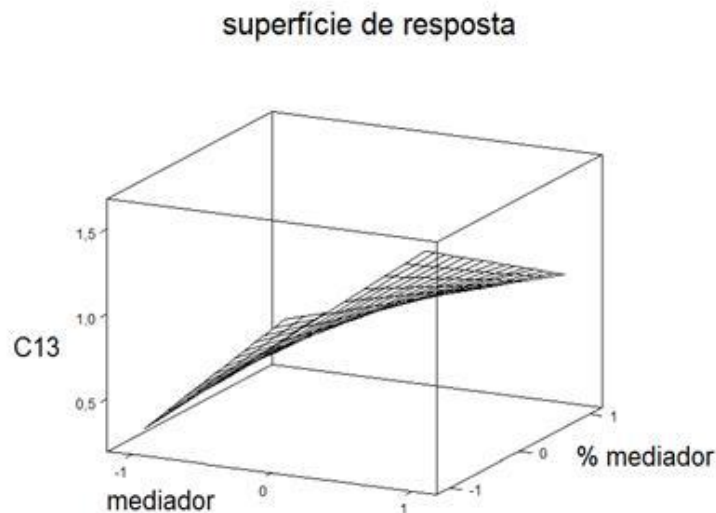
Figura 10 - Gráfico da superfície de resposta entre os efeitos “mediador” e “% mediador”.



Fonte: Elaborado pelos autores

Na figura 11, a superfície de resposta resultante da análise dos dados em comparação entre o fator “U/enzima” e o “[substrato]” indicou que uma baixa quantidade de enzima aliada a uma concentração mais elevada de substrato leva a valores mais elevados de respostas. Concentrando todos os resultados do estudo quimiométrico, definiu-se como melhores condições de trabalho as que seguem: mediador = azul de metileno, porcentagem de mediador = 1,5%, concentração de substrato = 10 mmol L<sup>-1</sup>, U/AChE = 0,1U/eletrodo.

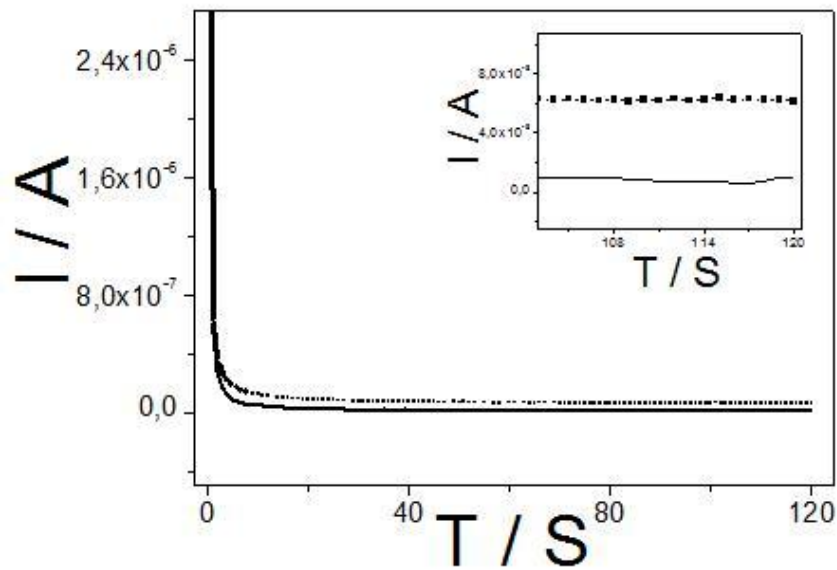
Figura 11 - Gráfico da superfície de resposta entre os efeitos U/enzima e [substrato].



Fonte: Elaborado pelos autores

A figura 12 apresenta os cronoamperogramas para o biossensor assim desenvolvido. A diferença de sinal entre o biossensor na presença e na ausência de substrato enzimático em solução de eletrólito demonstra que os procedimentos de catálise se processaram de maneira eficiente.

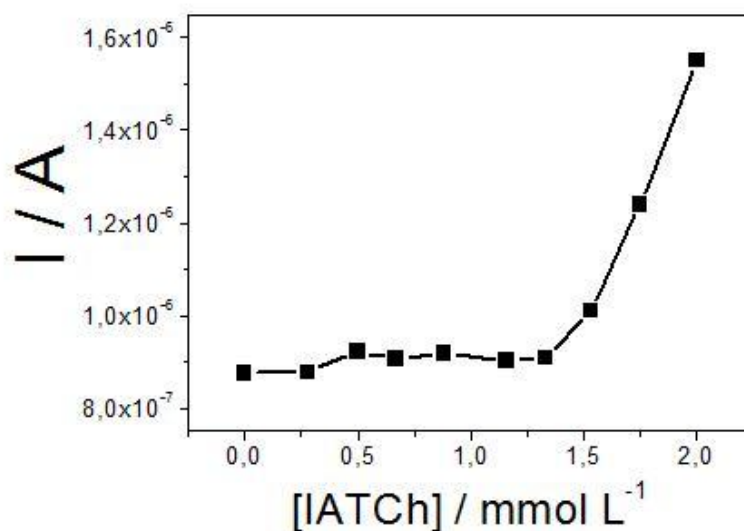
**Figura 12** - Cronoamperograma em tampão fosfato pH 7,2. Eletrodo de pasta de carbono em minicavidade, modificado com azul de metileno 1,5%, com enzima AChE imobilizada (0,1 U) em ausência (—) e presença (-----) de substrato cloreto de acetilcolina 2 mmol L<sup>-1</sup>.



Fonte: Elaborado pelos autores

A partir das condições estabelecidas, efetuou-se um estudo da definição da faixa de linearidade do sistema biossensor, concentração de substrato. A figura 13 apresenta a curva de relação entre a quantidade de substrato e o sinal de corrente obtido.

**Figura 13** - Investigação de linearidade. Relação entre a concentração de substrato e o sinal de corrente obtido.



Fonte: Elaborado pelos autores

Observa-se que a região entre 1 e 2 mmol L<sup>-1</sup> de substrato é a que possibilita trabalhar de forma linear. Os estudos de inibição do biossensor com o pesticidas foram iniciados, e ainda estão em fase de otimização.

## 5 | Considerações finais

O eletrodo de minicavidade foi de prático uso para inserir pasta de carbono e construir sensores eletródicos. O sinal eletroanalítico obtido na caracterização diferenciou um pouco do sinal de eletrodos convencionais, provavelmente devido ao diâmetro milimétrico da cavidade, o que leva a um comportamento parecido com o de microeletrodos. As modificações com mediadores foram efetuadas de modo fácil e rápido, obtendo-se sinais eletroanalíticos que confirmam a modificação. O comportamento voltamétrico do mediador TCNQ foi bem mais definido do que o do azul de metileno, porém o estudo quimiométrico evidenciou que o azul de metileno, presente em baixas porcentagens pode levar a melhores valores de sinal de corrente em uma catálise entre a enzima imobilizada e o substrato em solução. Os estudos iniciais indicam que a região linear de trabalho está entre 1 e 2 mmol L<sup>-1</sup> de substrato utilizado. Desta forma, o eletrodo de minicavidade pode ser aplicado para construção de biossensores enzimáticos.

## Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FAPEMA.

## Referências

- CALIXTO, Carolina M. F. Desenvolvimento e aplicação de eletrodos compósitos à base de grafite e Aradite®. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- EGGINS, B. R. Chemical sensors and biosensors. New York: Wiley, 2002.
- FERREIRA, A. A. P. et al. Eletrodo de pasta de carbono em minicavidade de contato sólido. *Eclética Química*, v. 36, n. 2, 2011.
- HE, L.; TOH, C. S. Recent advances in analytical chemistry: a material approach. *Analytica Chimica Acta*, v. 556, n. 1, p. 1-15, 2006.
- JANATA, J.; JOSOWICZ, M.; DEVANEY, M. Chemical sensors. *Analytical Chemistry*, v. 66, n. 2, p. 207-228, 1994.
- LI, C.; THOSTENSON, E. T.; CHOU, T. Sensors and actuators based on carbon nanotubes and their composites: a review. *Composites Science and Technology*, v. 68, n. 6, p. 1227-1249, 2008.
- MARIOTTI, M. P.; MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores amperométricos. In: *Biossensores Eletroquímicos*. Monte Alto: Letra Boreal, 2009. v.1. p. 45-56.
- MARQUES, P. R. B. O. et al. Comparative investigation between acetylcholinesterase obtained from commercial sources and genetically modified *Drosophila melanogaster* application in amperometric biosensors for methamidophos pesticide detection. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 20, n. 4, p.825-832, 2004.
- MARQUES, P. R. B. O., YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p.1791-1799, 2008.
- MARQUES, P. R. B. O.; MARQUES, C. V. V. C. O.; NUNES, G. S. Biossensor amperométrico para detecção screening de inseticidas carbamatos em águas de abastecimento. *Pesticidas (UFPR)*, v. 16, p.81-92, 2006.
- NUNES, G. S. et al. Acetylcholine enzyme sensor for determining methamidophos insecticide evaluation of some genetically modified acetylcholinesterases from *Drosophila melanogaster*. *Analytica Chimica Acta*, v. 434, p.1-8, 2001.
- PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*, v. 25, p. 1012-1021, 2002.
- PIVIDORI, M. I. Nuevos biossensores amperométricos: diseño y construcción. 2002. 505 f. Tese (Doutorado em Ciências Químicas) - Universidade Autônoma de Barcelona, Belaterra, 2002.
- PUMERA, M. et al. Electrochemical nanobiosensors. *Sensors and Actuators B*, v. 123, n. 2, p. 1195-1205, 2007.