

THAYZ CRISTINA BONI

**“DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE SENSOR
BIOMIMÉTICO DESCARTÁVEL PARA DETECÇÃO SELETIVA
DE HIDROQUINONA”**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Química

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Del Pilar T. Sotomayor

Instituto de Química

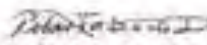
Araraquara, Agosto de 2011


THAYZ CRISTINA BONI


Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 18 de agosto de 2011.

BANCA EXAMINADORA


Profª Drª Maria Del Pilar Taboada Solomayor (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Drª Marcia Cristina Vicherski
Empresa Lupo S/A, Araraquara


Profª Drª Maria Isabel Pividori Gurgó
Universidad Autónoma de Barcelona – IAB Barcelona – España

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

“Reflexão de Lavoisier ao descobrir que lhe haviam roubado a carteira: nada se perde, tudo muda de dono.”

*“A vida é muito curta para acordar com arrependimentos.
Ame as pessoas que te tratam bem.
Ame, também, àqueles que não, só porque você pode.
Acredite que tudo acontece por uma razão.
Se tiver uma segunda chance, agarre com as duas mãos.
Se isso mudar sua vida, deixe acontecer.
Beije devagar.
Perdoe rápido.
Deus nunca disse que a vida seria fácil.
Ele simplesmente prometeu que valeria a pena.”*

DEDICATÓRIA

Primeiramente, agradeço a Deus, a quem sempre pedi proteção e sabedoria em cada etapa desta jornada. E fui atendida, ao modo Dele, mas fui atendida. Agradeço todos os dias pelas bênçãos recebidas.

A meus pais, Maria Helena e Hermes, pelo apoio e principalmente por terem tido paciência para suportar minhas lágrimas e entendido que era necessário esbravejar em alguns instantes.

A orientadora e professora Maria Del Pilar por ter me apoiado em várias decisões nestes dois anos e, mesmo que às vezes houvesse desentendimento, ela me ensinou o verdadeiro sentido de acreditar em si mesmo e de quanto um simples gesto pode ser importante na vida de quem o recebe. Obrigado.

Não posso deixar de citar meus companheiros de laboratório, Ademar, Eduardo e André. Foram inesquecíveis as trocas de informações e de pesar quando todos os nossos eletrodos resolviam não funcionar coletivamente... Nossa arte em transformar tristeza em piada foi importante para ganhar força e seguir em frente com nossas “cronos”. Agradeço também aos professores Massão, Valnice e Mauro pelo carinho e conversas sempre engraçadas no corredor.

A todos os meus alunos pelo carinho e aulas divertidas! Adoro vocês!

Agradeço especialmente a minha irmã Ana Carolina, por todos os ensinamentos enquanto companheira de laboratório e pelos finais de semana intermináveis plotando gráficos e trocando ensinamentos, além do apoio e amizade sempre vindos através das risadas, corridas e caipirinhas. Sua ajuda e

companheirismo foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho, muito obrigado. Agradeço igualmente ao meu cunhado Igor não só pelo apoio, mas também pelas risadas, treinos de corrida e caronas sempre nas horas certas. Obrigado pela sua amizade.

A meus queridos amigos Jorge, Susi, Daniara, Patrícia, Marco, João, Ademar e Pipoca, que sempre acompanhados de minha irmã, foram meus anjos da guarda em vários momentos no mestrado, que acompanharam de perto minha jornada, seja no Sakaná, no MSN, no laboratório ou em um banco qualquer do Instituto de Química... Amo vocês e é um presente ter a amizade de vocês.

A meus amigos, não menos queridos, Rose, Alana, Aroldo, Flávia, Alessandra, Dri, Sheila, João que sempre torceram por mim e mesmo um pouco distantes pela falta de tempo, sempre tinham em algum momento uma palavra amiga.

Ao Rodrigo e Ana Cristina, químicos e amigos, agradeço pelo incentivo, compreensão pelos momentos ausentes e por creditar, a mim e ao Rodolfo, a tarefa de sermos padrinhos do Rafael; é uma alegria sem igual.

Por último, queria dedicar este trabalho a pessoa que mais incentivou, aplaudiu, consolou e me deu forças todos os dias; enxugou lágrimas (muitas) inclusive. Alguém especial, presente em todos os minutos mesmo estando longe a maior parte deles. Alguém que me ensinou a sempre extrair o melhor de tudo e que é meu melhor amigo, meu porto seguro, minha motivação, meu amor: Rodolfo. Sem você eu jamais teria conseguido. Amo-te e neste ano tão especial em nossas vidas, dedico este trabalho a você, integralmente... Obrigado por tudo!

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome: Thayz Cristina Boni

Data de Nascimento: 06 de março de 1981

Naturalidade: Araraquara / SP

Nacionalidade: Brasileira

Estado Civil: Solteiro

Formação

Ensino Médio

Escola Técnica Estadual “Prof^a. Anna de Oliveira Ferraz”, com habilitação técnica em Nutrição e Dietética, no período de 1996 a 1999.

Graduação

Licenciatura em Química – Instituto de Química UNESP - Araraquara.

Período: fevereiro / 2003 a dezembro / 2008.

Pós-Graduação

Mestrado em Química, realizado no Departamento de Química Analítica do Instituto de Química (Unesp), sob orientação da Prof^a Dr^a. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor.

Titulo do Projeto: “Aplicação *in situ* de Sensor Biomimético Descartável para Hidroquinona em Sistemas Aquáticos da Região de Araraquara”.

Período: 07/2009 à 07/2011.

Disciplinas cursadas:

- Ciência dos Materiais; conceito **B**

- Métodos Potenciométricos e Espectrofotométricos Aplicados à Análise de Substâncias Orgânicas de Importância Nutricional em Medicamentos, Bebidas e Alimentos; conceito **B**
- Filmes Ferroelétricos: Síntese, Propriedades e Aplicações; conceito **A**
- Tópico Especial: Receptores e transdutores: Biossensores; conceito **A**
- Tópico Especial: Eletroquímica Ambiental; conceito **A**.

Participação em eventos científicos:

1. 32º Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 28 – 31 de maio de 2010. Águas de Lindóia – SP:
2. Semana da Química 2009, Instituto de Química UNESP Araraquara.

3. Outros:

3.1. Mini curso “cosmetologia” com carga horária de 20 horas, Semana da Química 2009, IQ-UNESP/Araraquara.

3.2. Mini curso “Biossensores” com carga horária de 12 horas, Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia.

Trabalhos apresentados em eventos científicos

a) Boni, T.C.; Sotomayor, M.D.P.T. “Determinação de hidroquinona empregando eletrodo impresso modificado com catalisador biomimético da tirosinase”. Painel. 32º Reunião Anual da SBQ, 28 a 31 de maio de 2010. Águas de Lindóia – SP.

b) Wong, A.; Boni, T.C.; Sotomayor, M.D.P.T. “Comprovação do caráter biomimético da enzima P450 pela *bis*(piridil)ftalocianina ferro(II) através da oxidação seletiva de captopril”. Painel. 32º Reunião Anual da SBQ, 28 a 31 de maio de 2010. Águas de Lindóia – SP.

c) Boni, T.C.; Sotomayor, M.D.P.T. “Sensor biomimético descartável para determinação seletiva de hidroquinona” ACEITO para apresentação ORAL no

XVIII Simpósio Brasileiro de Química Analítica. A ser realizado entre 28 de agosto e 01 de setembro de 2011.

Bolsas Recebidas

- Bolsa da Fundação para o Desenvolvimento da Unesp (Fundunesp), 2003
- Bolsa de Extensão Universitária (BEU), 2004
- Bolsa PIBIC CNPq, 2005-2006
- Bolsa BAAE II, 2008

Publicações

J.C. Bruno, T.C. Boni, A.A. Cavalheiro, M.A. Zaghete. *Structural characterization of $0.5\text{PbMg}_{1/3}\text{Nb}_{2/3}\text{O}_3-0.5\text{Ba}_x\text{Pb}_{(1-x)}\text{TiO}_3$ powders*, Materials Research Bulletin, march 2007.

Atuação Profissional

- Lupo S/A – Química atuando no Controle de Qualidade da Tinturaria de Fios, desde fevereiro / 2011.
- Uniara (Centro Universitário de Araraquara) – professora assistente I no curso de Engenharia Bioenergética, desde fevereiro / 2011.
- CETEC (Centro Educacional e Tecnológico de Araraquara) – professora no curso Técnico em Química, desde julho / 2009.
- Nestlé Brasil, unidade Araçatuba /SP – Estagiária, de julho/2006 a março / 2007.

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento e aplicação de um sensor biomimético descartável com transdução amperométrica, sensível a hidroquinona (HQ). Para isto, eletrodos impressos de grafite – SPE (FS-1, Florence sensors[®]) foram modificados com um catalisador biomimético do sítio ativo da tirosinase, uma cupro-enzima. O complexo de cobre usado foi o cloreto de *tris*-2,2'-bipiridil cobre II, [Cu(dipy)₃]Cl₂. Para efeitos de comparação também foram preparados sensores empregando eletrodos de carbono vítreo convencionais (GC).

Os sensores foram preparados modificando os eletrodos SPE e GC com membrana de Nafion[®] dopada com o complexo de cobre. Para tal, foram misturados em aparelho de ultrassom, 100 µL de uma solução de complexo 5 mg mL⁻¹, preparada em dimetilformamida (DMF) com 50 µL de solução de Nafion[®] a 5 % (v/v). A seguir, 100 µL da mistura foram colocados na superfície do GC e 10 µL sobre o SPE. A resposta do sensor à base de SPE (sensor-SPE) foi otimizada usando amperometria. Obtendo-se as melhores respostas em tampão Pipes 0,01 mol L⁻¹ contendo 60 µmol L⁻¹ de H₂O₂ e aplicando potencial de -300 mV vs Ag/AgCl. Sob estas condições o sensor-SPE mostrou uma faixa de resposta entre 6,0 x 10⁻⁵ e 5,6 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, sensibilidade de 5593,6 µA L mol⁻¹, limite de detecção e quantificação de 5,4 x 10⁻⁶ e 1,80 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, respectivamente. Tratando-se de um sensor biomimético seu comportamento hiperbólico foi confirmado, e a constante aparente de Michaelis-Menten foi calculada através do gráfico de duplo recíproco obtendo-se um valor de 5,6 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, indicando uma alta afinidade do complexo pela HQ. Estudos voltamétricos também foram realizados visando à caracterização eletroquímica do sistema proposto. A seletividade do sensor foi estudada em vários compostos fenólicos e a reprodutibilidade entre diversos sensores foi avaliada como o desvio padrão relativo (RSD) da sensibilidade de suas curvas analíticas, obtendo-se um valor de 2,3%. Por outro lado, ao ser avaliado o tempo de vida do sensor observou-se que após uma semana de uso consecutivo a resposta do sensor é de 30% do valor inicialmente observado.

Contudo, ao avaliar a repetibilidade nas medidas em um mesmo dia o valor obtido para o RSD foi de apenas 3,0%, o que confere a estes sensores, confiabilidade para uso descartável, na detecção sensível, seletiva e reprodutível de HQ. Finalmente, o sensor-SPE foi satisfatoriamente aplicado na análise de HQ em cosméticos usando adição de padrão, obtendo-se erros relativos menores que 4%.

Palavras Chave: *Sensores biomiméticos, eletrodo microimpresso, hidroquinona, amperometria.*

ABSTRACT

This paper describes the development and application of a biomimetic sensor disposable with amperometric transduction, sensitive to hydroquinone (HQ). For this, printed graphite electrodes - SPE (FS-1, Florence sensors[®]) were modified with a biomimetic catalyst of the active site of tyrosinase, a cupro-enzyme. The copper complex used was the *tris*-2,2'-bipyridil cooper (II) chloride, [Cu(dipy)₃]Cl₂. For comparison were also prepared sensors employing conventional glassy carbon electrodes (GCE). The sensors were prepared by modifying the SPE and GCE electrodes with Nafion[®] membrane doped with the copper complex. For this, were mixed in an ultrasonic apparatus, 100 μL of 5 mg mL⁻¹ complex solution, prepared in dimethylformamide (DMF), with 50 μL of Nafion[®] 5% (v/v) solution. Then 100 μL of this mixture were placed on the surface of GCE and 10 μL on the SPE. The response of the SPE-based sensor (sensor-SPE) was optimized using amperometry. Obtaining the best responses in 0.01 mol L⁻¹ Pipes buffer containing 60 μmol L⁻¹ H₂O₂ and applying potential of -300 mV vs Ag/AgCl. Under these conditions the SPE-sensor showed a response range between 6.0 x 10⁻⁵ and 5.6 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, sensitivity of 5593.6 μA L mol⁻¹, limit of detection and quantification of 5.4 x 10⁻⁶ and 1.80 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, respectively. In this case, the hyperbolic behavior of the sensor response was confirmed, and the Michaelis-Menten apparent constant was calculated by the Lineweaver-Burk graph, obtained a value of 5.6 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, indicating a high affinity of the complex for the HQ. Voltammetric studies were also conducted to the electrochemical characterization of the proposed system. The selectivity of the sensor was studied in some phenolic compounds and the reproducibility in the sensors construction was evaluated as the relative standard deviation (RSD) of the sensitivity of their analytical curves, resulting in a value of 2.3%. The lifetime of the sensor was evaluated, and was observed that after a week of consecutive use, the sensor response is 30% of those initially observed. However, when evaluated the measurement repeatability on the same day, the value obtained for the RSD was only 3.0%, which gives these sensors reliability for their use in disposable devices. Finally, the sensor-SPE

has been successfully applied in the analysis of HQ in cosmetics using standard addition, obtaining relative errors less than 4%.

Keywords: *Biomimetic Sensor, screen printed electrode, hydroquinone, amperometry.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da hidroquinona (HQ).....	2
Figura 2. Complexos de cobre, conhecidos como catalisadores biomiméticos da enzima Tyr. a) $\text{Cu}(\text{dipy})\text{Cl}_2$: cloreto de bipyridina de cobre (II); b) $[\text{Cu}(\text{dipy})_2]\text{Cl}_2$: cloreto de <i>bis</i> (bipyridina) cobre (II) e c) $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2$: cloreto de <i>tris</i> (bipyridina) cobre (II).....	11
Figura 3. Esquema de um biossensor, adaptado da referência 43.....	12
Figura 4. Produção científica relacionada aos diferentes transdutores usados em biossensores de 1980 a 2011, pesquisada na base de dados SciFinder Scholar [®] , acessado em 10/06/2011.....	13
Figura 5. Esquema dos principais métodos de imobilização do elemento biológico em biossensores.....	16
Figura 6. a) Esquema de formação da membrana de Nafion [•] modificada com o complexo cloreto de <i>tris</i> -2,2'-bipyridil cobre II sobre eletrodo de carbono vítreo. Etapa 1: eletrodo limpo; etapa 2: aplicação de 100 μL de solução de Nafion [®] + complexo de cobre; etapa 3: após 24 horas de secagem em temperatura ambiente; b) Esquema de formação da membrana de Nafion [•] modificada com o complexo cloreto de <i>tris</i> -2,2'-bipyridil cobre II sobre eletrodo impresso de carbono grafite (SPE). Etapa 1: eletrodo limpo; etapa 2: aplicação de 10 μL de solução de Nafion [®] + complexo de cobre; etapa 3: após 24 horas de secagem em temperatura ambiente.	30

Figura 7. a) Eletrodo de carbono vítreo, sendo que o eletrodo de trabalho possui 4 mm de diâmetro; b) Eletrodo micro-impresso de grafite com área de 4 mm de diâmetro no eletrodo de trabalho. Ambos sem modificação; c) montagem da cela eletroquímica de três eletrodos.....31

Figura 8. Voltametria Cíclica do sensor de CV modificado somente com Nafion[®] na presença de H₂O₂ e HQ. Velocidade de varredura: 20 mV s⁻¹ e eletrólito tampão Pipes (pH 7,0) 0,01 mol L⁻¹.....34

Figura 9. Voltametria Cíclica do sensor de CV modificado com Nafion[®] dopado com o complexo [Cu(dipy)₃]Cl₂.6H₂O na presença de peróxido de hidrogênio e hidroquinona. Velocidade de varredura: 20 mV s⁻¹ sendo o eletrólito utilizado nas medidas Tampão Pipes 0,01 mol L⁻¹.....35

Figura 10. Voltametria Cíclica do sensor impresso modificado somente com Nafion[®] na presença de peróxido de hidrogênio e hidroquinona. Velocidade de varredura: 20 mV s⁻¹.....36

Figura 11. Voltametria Cíclica do sensor impresso modificado com Nafion[®] dopado com o complexo [Cu(dipy)₃]Cl₂.6H₂O na presença de peróxido de hidrogênio e hidroquinona. Velocidade de varredura: 20 mV s⁻¹.....37

Figura 12. Estudo comparativo da dependência do uso do complexo na construção do sensor micro-impresso, através da amperometria. a) Eletrodo micro-impresso modificado somente com Nafion[®]. b) Sensor à base de Nafion[®] e complexo [Cu(dipy)₃]Cl₂.6H₂O. Medidas realizadas em tampão Pipes 0,01 mol L⁻¹ contendo 60 μmol L⁻¹ de H₂O₂ e sucessivas adições de hidroquinona, aplicando potencial de -100 mV.....38

Figura 13. Influência do uso de peróxido de hidrogênio nas medidas eletroquímicas a) adição inicial de 60 μmol L⁻¹ de H₂O₂ e sucessivas adições de 39,5 μmol L⁻¹ de hidroquinona; b) somente adições de 39,5

$\mu\text{mol L}^{-1}$ de HQ. Medidas realizadas em solução tampão Pipes $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e aplicando potencial de -300 mV no SPE.....40

Figura 14. Perfil de resposta do sensor em função do pH do tampão Pipes na presença de $47 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 e HQ.....42

Figura 15. Cronoamperograma do sensor impresso modificado com Nafion[®] dopado com complexo $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Medidas realizadas nas condições otimizadas.....43

Figura 16. Curva analítica obtida através do amperograma do sensor impresso modificado com complexo $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ da Figura 15.....44

Figura 17. a) Retirada do eletrodo de trabalho de grafite do eletrodo impresso, com auxílio de uma tesoura. T: Eletrodo de trabalho de grafite. b) cela eletroquímica acoplada com eletrodos de trabalho impresso; referência Ag/AgCl e contra eletrodo de platina.....45

Figura 18. Voltametria cíclica usando eletrodo de trabalho micro-impresso de grafite acoplado a eletrodo referência externo de Ag|AgCl, KCl_{sat} e contra eletrodo de Pt.....46

Figura 19. Amperograma do sensor impresso isolado do SPE e acoplado a eletrodo de referência externo.....47

Figura 20. Curva analítica obtida através do amperograma do sensor impresso de trabalho isolado do conjunto de SPEs, e modificado com complexo $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$48

Figura 21. Perfil da variação da resposta do sensor impresso de grafite à base de membrana de Nafion[®] dopada com Dipy 1:3 acoplado a eletrodos

de referência e contra-eletrodo externos, em um período de sete dias de uso consecutivos.....50

Figura 22. Perfil amperométrico completo (até saturação). Potencial aplicado de -300 mV e adição inicial de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e sucessivas adições de $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HQ.....51

Figura 23. Gráfico da curva de Michaelis-Menten obtido a partir da cronoamperometria da Figura 22.....52

Figura 24. Gráfico do duplo recíproco, que permitiu calcular o valor da constante aparente de Michaelis-Menten, do sensor para hidroquinona...53

Figura 25. Fórmulas estruturais dos compostos a) catecol; b) resorcinol; c) *p*-aminofenol; d) paracetamol; e) 3,5-diclorofenol.....54

Figura 26. Perfil da seletividade do sensor: a) resposta para HQ e b) resposta para *p*-aminofenol (*p*-AMF). Na figura inserida mostra-se amplificada a resposta para *p*-AMF. Medidas realizadas em potencial de -300 mV em solução tampão pipes contendo $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 e sucessivas adições de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de analito.....55

Figura 27. Voltamogramas cíclicos registrados em diferentes velocidades de varredura obtidos com o sensor impresso de grafite modificado com o complexo $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Medidas realizadas em solução tampão Pipes $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona. A velocidade de varredura para o branco, adição de H_2O_2 $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ e primeira adição de HQ $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ foi de 2 mV s^{-1} ; após a adição de HQ foi aumentada a velocidade de varredura (v), seguindo a ordem de 5 a 1000 mV s^{-1} 57

Figura 28. Voltamogramas cíclicos registrados na velocidade de varredura de 2 mV s^{-1} , indicando o pico de redução usado para a construção do gráfico da Figura 29.....58

Figura 29. Variação da corrente de pico catódica (i_{pc}) vs $v^{1/2}$ no sensor micro-impresso modificado com o complexo $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Gráfico obtido a partir do Gráfico ilustrado na Figura 27.....59

Figura 30. Amperometria obtida para a análise por adição de padrão da amostra magistral analisada. Na cela de medida $[\text{H}_2\text{O}_2] = [\text{HQ}]_{\text{AM}} = [\text{HQ}]_{\text{P}} = 3,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 61

Figura 31. Curva analítica da adição de padrão para a amostra magistral, preparada conforme solicitação dos autores deste trabalho.....61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características relevantes dos materiais utilizados como elemento de reconhecimento na construção de biossensores [43]15
- Tabela 2.** Procedimentos de imobilização de biomoléculas na superfície de sensores [43-45].....17
- Tabela 3.** Valores obtidos por Análise Elementar das quantidades em percentagem de Cobre, Carbono, Nitrogênio e Hidrogênio para o complexo $[\text{Cu}(\text{Dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$33
- Tabela 4.** Dados avaliados na escolha dos parâmetros para realização das medidas eletroquímicas. Medidas realizadas em soluções tampão $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de diversos pH, contendo $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ e aplicando potencial aplicado de -300 mV nos SPE.....41
- Tabela 5.** Compostos fenólicos utilizados nos testes de seletividade em meio de tampão Pipes $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) aplicando potencial de -300 mV55
- Tabela 6.** Resultados obtidos em diferentes amostras cosméticas contendo Hidroquinona a 2% para cada 50 g de creme. Valor nominal de 1 g HQ / 50 g CREME.....62

Lista de Esquemas

Esquema 1. Ciclo catalítico da enzima tirosinase na *orto*-hidroxilação de fenóis e na oxidação de difenóis. T, tirosina e D, DOPA em suas formas ligadas [12].....7

Esquema 2. Mecanismo das reações nos eletrodos modificados pelas enzimas para a determinação de compostos fenólicos. E_{red} e E_{ox} são as formas reduzida e oxidada, respectivamente, das enzimas; CF = composto fenólico.....9

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Gráfico de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco).....	26
--	----

Lista de Abreviaturas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

$\text{Cu}(\text{dipy})\text{Cl}_2$ - *cloreto de bipyridina de cobre (II)*

$[\text{Cu}(\text{dipy})_2]\text{Cl}_2$ - *cloreto de bis(bipyridina) cobre (II)*

$[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2$ - *cloreto de tris(bipyridina) cobre (II)*

CV – Carbono Vítreo

[C] – Concentração molar

Dipy – dipiridina

Dipy 1:3 - *cloreto de tris(bipyridina) cobre (II)*

DMF – Dimetilformamida

DOPA – Diidroxifenilalanina

EPA – Agência de Proteção Ambiental Americana

EU – União Européia

HQ – Hidroquinona

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

(m/m) – relação massa / massa

MM – Massa Molecular

m_{HQ} - massa de Hidroquinona

m_{creme} - massa de amostra cosmética

PEEK – PoliEtherEtherKetone

RSD – Desvio Padrão Relativo

SPE – Screen Printed Electrode

Tyr – Tirosinase

V – Volume

σ – Título (m/m)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. A Tirosinase	6
1.2. Biossensores e Sensores Biomiméticos	11
1.2.1. Mimetização de sistemas biológicos enzimáticos.....	17
1.2.2. Constante de Michaelis-Menten	22
2. Objetivo	27
3. Parte experimental	28
3.1. Reagentes.....	28
3.2. Preparação do complexo cloreto de <i>tris</i> -2,2'-bipiridil cobre(II).....	29
3.3. Construção dos sensores.....	29
3.4. Medidas eletroquímicas	31
3.5. Preparação das amostras cosméticas contendo HQ.....	32
4. Resultados e Discussão.....	33
4.1. Caracterização do complexo sintetizado	33
4.2. Influência do complexo na modificação das superfícies eletródicas.....	33
4.2.1. Estudos eletroquímicos realizados com o sensor impresso: dependência do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	39
4.3. Otimização da resposta do sensor impresso modificado com complexo de cobre Dipy 1:3	40
4.4. Perfil de resposta do sensor impresso modificado com complexo de cobre Dipy 1:3.....	42
4.4.1. Uso do eletrodo impresso (SPE) acoplado a eletrodos de referência e contra-eletrodo externos	44

4.4.1.1. Parâmetros analíticos do sensor-SPE acoplado a eletrodo de referência externo	48
4.5. Caracterização do perfil biomimético do sensor impresso à base de Nafion® dopado com Dipy 1:3: Estudos de biomimeticidade	50
4.5.1. Cálculo da constante aparente de Michaelis-Menten (K_{MM}^{app}).....	50
4.5.2. Seletividade do sensor.....	53
4.5.3. Caracterização do sistema sensor através de estudos voltamétrico.....	56
4.6. Aplicação do sensor em amostras farmacêuticas.....	60
5. Conclusões e perspectivas futuras.....	63
Referências Bibliográficas	64

1. Introdução

O aumento na utilização de produtos químicos e seu uso inadvertido, verificado nas últimas décadas, tem sido a causa de problemas ambientais de maneira generalizada, em praticamente todos os países. A proteção ambiental vem adquirindo grande importância na sociedade contemporânea, que tem cobrado mecanismos de controle dos processos de contaminação ambiental [1]. Assim sendo, o controle destes poluentes ambientais vem sendo cada vez mais aprimorado, recorrendo-se às tecnologias simples e de baixo custo para facilitar sua detecção e controle a fim de preservar o meio ambiente.

Compostos aromáticos pertencem a um grupo tóxico de poluentes ambientais descartados no processo de muitas indústrias, tais como refinarias de óleo e indústrias químicas. Alguns destes componentes, como catecóis, fenóis, hidroquinonas e resorcinol, são listados como os principais poluentes do meio ambiente pelas agências de proteção ambiental de vários países [2]. Dentre esses poluentes ambientais, destaca-se a Hidroquinona (HQ), um composto fenólico considerado poluente ambiental pela União Européia (EU) e Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) [3].

Pellier e Caventou, em 1820, *apud* referência Frizon [4] foram os primeiros a isolarem a hidroquinona, que hoje se tornou um dos mais utilizados agentes redutores orgânicos, importante em vários processos biológicos e industriais, como na produção de carvão e fabricação de papel.

A hidroquinona, também chamada de benzeno-1,4-diol, 1,4-dihidroxibenzeno, ou ainda quinol, é um composto orgânico do tipo fenólico e apresenta a fórmula molecular $C_6H_4(OH)_2$. A fórmula estrutural da hidroquinona, como observado na Figura 1, possui dois grupos hidroxila ligados a um anel benzênico na posição para. A temperatura de 15 °C e sob pressão ambiente, apresenta-se na forma de um sólido cristalino de cor branca, inodoro, sabor adocicado e solúvel em água (1/17), etanol (1/4), éter (1/17), clorofórmio (1/51), glicerina (1/1) m/v. O ponto de fusão deste cristal está entre 172 e 174° C, o ponto de ebulição é de aproximadamente 287 °C e estável em soluções ácidas [4].

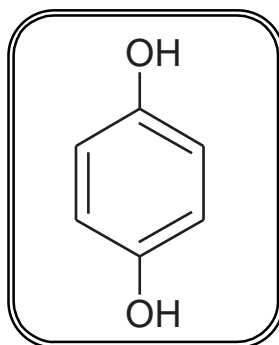
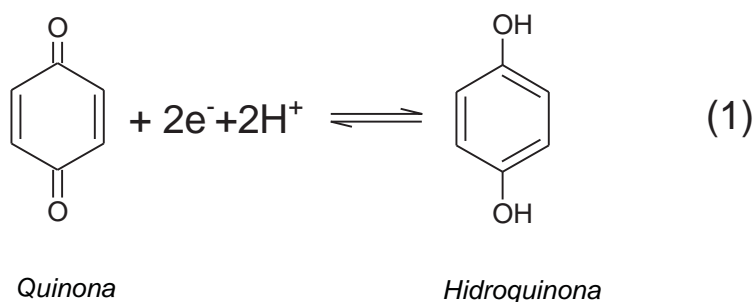


Figura 1. Estrutura molecular da hidroquinona (HQ)

A hidroquinona pode ser submetida a oxidação, sendo convertida no composto *p*-benzoquinona, $C_6H_4O_2$, frequentemente chamado *p*-quinona ou simplesmente quinona. A redução da quinona reverte esta reação novamente à hidroquinona, conforme mostrado na reação 1.



Alguns compostos bioquímicos na natureza que têm o tipo de estrutura hidroquinônica ou quinônica, tais como a coenzima Q, também podem sofrer similares interconversões redox. Seus grupos hidroxila são ácidos fracos; assim sendo, a hidroquinona pode perder um H^+ em uma das hidroxilas para formar um íon monofenolato ou perder ambos H^+ para formar um íon difenolato. O sal difenolato de sódio da hidroquinona é usado como um alternativo co-mônômero na produção do polímero PEEK, *Poli-Ether-Ether-Ketone*.

A hidroquinona é um composto com variedade de usos, principalmente associados com sua ação redutora. É o principal componente na maioria dos reveladores fotográficos onde, com o composto metol, reduz haletos de prata a

prata elementar. Também é muito utilizada como inibidor de reações de polimerização de ácido acrílico.

HQ também é usada como uma matéria prima de herbicidas, anti-oxidantes para borracha e corantes. Pode ser encontrada em vários alimentos, em madeiras, fumo de tabaco, no alcatrão da hulha, óleo cru, dentre outros. É utilizada industrialmente em vários processos, sendo encontrada naturalmente em vegetais, frutas, café, chá, cerveja e vinho.

Pode também ser encontrada em diferentes formulações farmacêuticas nas formas de solução, cremes e géis, estabilizada com antioxidantes [4] em aplicação tópica de clareamento da pele, pois reduz manchas na pele sem predisposição a causar dermatites. Este uso é banido em alguns países, como a França, por causa de riscos de câncer. Sua ação cosmética para clareamento da pele é baseada em que a hidroquinona atua nas células produtoras de melanina, os melanócitos, bloqueando a produção e aumentando a degradação dos melanossomos, os corpúsculos intra-celulares que armazenam a melanina. A hidroquinona também bloqueia a ação da enzima tirosinase, que tem participação na formação da melanina [5].

As metodologias de análise propostas para detecção de hidroquinona (HQ) em amostras comerciais ou de interesse ambiental remetem a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectroscopia de absorção ultravioleta sendo que estes métodos geram grandes volumes de resíduos e consomem tempo para serem realizados. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), indica a cromatografia de camada delgada para identificação da HQ e seu doseamento através cromatografia líquida de fase reversa com detecção UV para amostras comerciais, de acordo com o publicado no Diário da República em 1997 [6]. O método cromatográfico é complicado e geralmente leva muito tempo para uma única análise por causa de medidas adicionais para o pré-tratamento e separação antes da detecção do sinal [3].

Desta forma, novas metodologias para detecção de Hidroquinona ainda são necessárias, com o objetivo de minimizar custos e tempo de análise, assim como obter análises que, além de seletivas e sensíveis, sejam simples e rápidas, sendo que estas últimas características não são apresentadas pelos métodos sugeridos pelas agências responsáveis.

Dentro desta abordagem, novas tecnologias para detecção deste poluente ambiental estão sendo elaboradas, baseadas no uso de biossensores amperométricos [1,2] baseados principalmente na enzima tirosinase (polifenol oxidase, *EC 1.14.18.1*), a qual têm se mostrado adequadas para atender os requisitos de baixo custo, facilidade de execução e rápida resposta.

Entretanto, o uso de enzimas está sendo substituído pelo uso de catalisadores biomiméticos na tentativa de contornar problemas de estabilidade dos biossensores em ambientes adversos às enzimas, nos quais esses materiais biológicos perdem sua atividade frente ao substrato [7-12].

Por outro lado, nos biossensores amperométricos enzimáticos uma das principais preocupações na construção destes sensores sempre se centralizou na velocidade de transferência de elétrons desde o sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo [13-14]. Neste sentido, alguns grupos de pesquisa têm trabalhado no intuito de otimizar a transferência de elétrons nos biossensores, partindo-se do pressuposto que uma transferência de elétrons mais eficiente é possível, através da diminuição ou remoção da camada protetora de proteínas ao redor do sítio ativo da enzima, sem perda da seletividade e ao mesmo tempo ganhando na sensibilidade dos sensores construídos [15-19]. Assim, “biossensores” amperométricos construídos sem a necessidade de imobilizar a enzima como um todo, apenas imobilizando adequadamente substâncias com estrutura análoga à do sítio ativo de metalo-enzimas na superfície dos eletrodos, mostra-se um procedimento eficiente e promissor.

Desenvolvendo uma nova classe de dispositivos amperométricos, chamados de sensores biomiméticos [18-19], cujos objetivos são, além de promover o aumento na transferência eletrônica no sistema *eletrodo/sítio ativo (catalisador biomimético)/substrato* visando aumentar a sensibilidade, são facilitar a construção, aumentar a estabilidade dos “biossensores” obtidos com esta estratégia de construção, e principalmente torná-los realmente práticos para aplicações por longos períodos de tempo, pois se espera que sejam mais estáveis sob condições de mudanças bruscas de temperatura, pH e composição da solução, as quais frequentemente desnaturam ou inativam as enzimas, principalmente em casos de amostras agressivas, como os efluentes industriais e amostras ambientais.

Estratégias para a construção dos sensores biomiméticos estão baseadas na estrutura do sítio ativo da enzima tomada como modelo e no mecanismo enzimático da reação que será catalisada. Dentre os avanços científicos que podem ser empregados no desenvolvimento dos sensores biomiméticos, destaca-se a química biomimética de enzimas artificiais [20-23], que está relacionada com os mecanismos de reconhecimento de substratos enzimáticos, através de compostos sintetizados e/ou modificados em laboratório [23-28]. A condição para que um composto seja considerado uma enzima artificial é apenas que este composto execute os mesmos processos catalíticos realizados pela enzima, porém não necessariamente seguindo o mesmo caminho. Sendo assim, a química biomimética permite incluir e/ou desenvolver compostos ainda mais simples do que as extraordinárias estruturas moleculares descritas na literatura [28], desde que efetuem processos altamente eficientes e seletivos. Neste sentido, tem sido incluídos no desenvolvimento dos sensores biomiméticos macromoléculas como porfirinas e ftalocianinas [7-9] e complexos simples de metais de transição [10-12], os quais têm sido considerados catalisadores biomiméticos eficientes para determinação de vários substratos enzimáticos importantes.

Juntamente ao desenvolvimento dos sensores biomiméticos, outro ponto a ser considerado é a importância de oferecer dispositivos com maior robustez, metodologias mais simplificadas e adaptações quanto ao tamanho e arranjo de eletrodos, que facilitem a análise de campo, ou mesmo, a coleta do analito de interesse no próprio eletrodo para análise posterior. Dentro deste contexto, o desenvolvimento de eletrodos impressos "*screen-printed electrode*" (SPE) tem atendido a demanda deste mercado, oferecendo um sistema completo de eletrodos projetados com grande simplicidade e economia. Ou seja, alguns destes eletrodos são projetados na forma de um único sistema contendo um arranjo de eletrodos, onde eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência são impressos no mesmo suporte, conforme mostrado na Figura 7b. São considerados dispositivos de baixo custo e funcionais, permitindo sua comercialização na forma de eletrodos descartáveis. Como consequência, têm mostrado alta versatilidade de aplicações tanto na forma de eletrodo convencional quanto na forma de eletrodo modificado [29]. As inúmeras possibilidades de confecção de eletrodos com tamanhos cada vez mais

diferenciados têm contribuído significativamente para o interesse despertado por estes tipos de sensores nas áreas industrial, ambiental, farmacêutica, clínica médica e outras. Por outro lado, a possibilidade de adicionar espécies na superfície eletrodica de trabalho, visando alterar a natureza físico-química da interface eletrodo de trabalho/solução, tem contribuído para melhorar a seletividade e sensibilidade desses dispositivos. Desta forma a tecnologia “*Screen printing*” se torna uma ferramenta versátil para a produção barata, fácil e reprodutível de biossensores descartáveis [30].

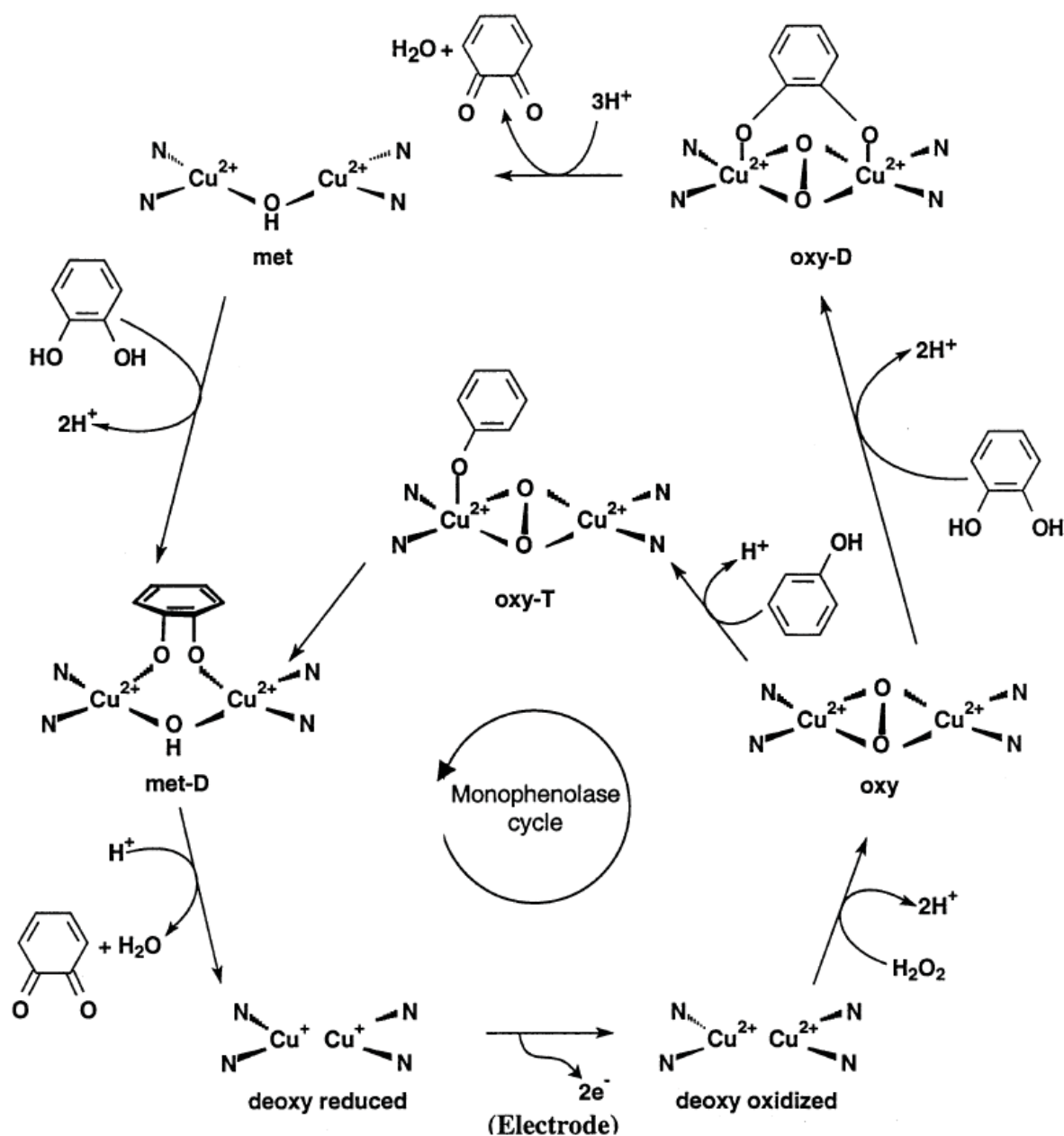
Baseado neste contexto, o presente trabalho mostra a construção de um sensor amperométrico utilizando-se eletrodos impressos (SPE) modificados com um catalisador biomimético da Tirosinase (Tyr), uma enzima multicúprica [31] amplamente difundida na natureza e que catalisa a oxidação de fenóis e difenóis em animais e em plantas.

1.1. A Tirosinase

É conhecido que uma das mais estudadas enzimas oxigenase multicúpricas é a tirosinase (Tyr) [monofenol, diidroxifenilalanina (DOPA): dioxigênio oxidoreductase, EC 1.14.18.1] [32], uma vez que esta enzima é amplamente encontrada na natureza. Por exemplo, a Tyr humana é responsável pela geração do pigmento encontrado em estruturas como o cabelo e pele e também na melanina do epitélio pigmentar da retina do olho [33]. Tirosinases (polifenoloxidase, EC 1.14.18.1.) são enzimas tetraméricas, com uma massa molar na ordem de 120 kDa e com dois sítios ativos por molécula. Cada um destes sítios consiste em dois átomos de cobre coordenados com histidinas [34-35].

Em meio aeróbico a Tyr catalisa a *orto* hidroxilação de monofenóis (atividade monofenolase) e também participa na transferência de dois elétrons na oxidação de *o*-difenois para *o*-quinonas (atividade catecolase) [35,36,37]. No sítio ativo da Tyr, os centros de cobre estão rodeados por átomos de nitrogênio, e suas formas estáveis *oxi* podem ser geradas a partir de Cu_2^{2+} mais O_2 ou de Cu_2^{4+} mais H_2O_2 [37]. Os processos catalíticos para a *orto*-hidroxilação de monofenóis e a oxidação de *o*-difenois para *o*-quinonas pela Tyr, a partir de

Cu_2^{4+} mais H_2O_2 , são mostrados no Esquema 1 [36,38,39]. Faça lista de esquema tb



Esquema 1. Ciclo catalítico da enzima tirosinase na *orto*-hidroxilação de fenóis e na oxidação de difenóis. T, tirosina e D, DOPA em suas formas ligadas [12].

No ciclo monofenolase, primeiramente o sítio ativo deve ser oxigenado para gerar as espécies oxi; na presença do substrato e após uma sequência de trocas de prótons resultam na inserção de oxigênio no anel fenólico e da doação de elétrons aos átomos de cobre cedidos pela *o*-quinona, resultam uma

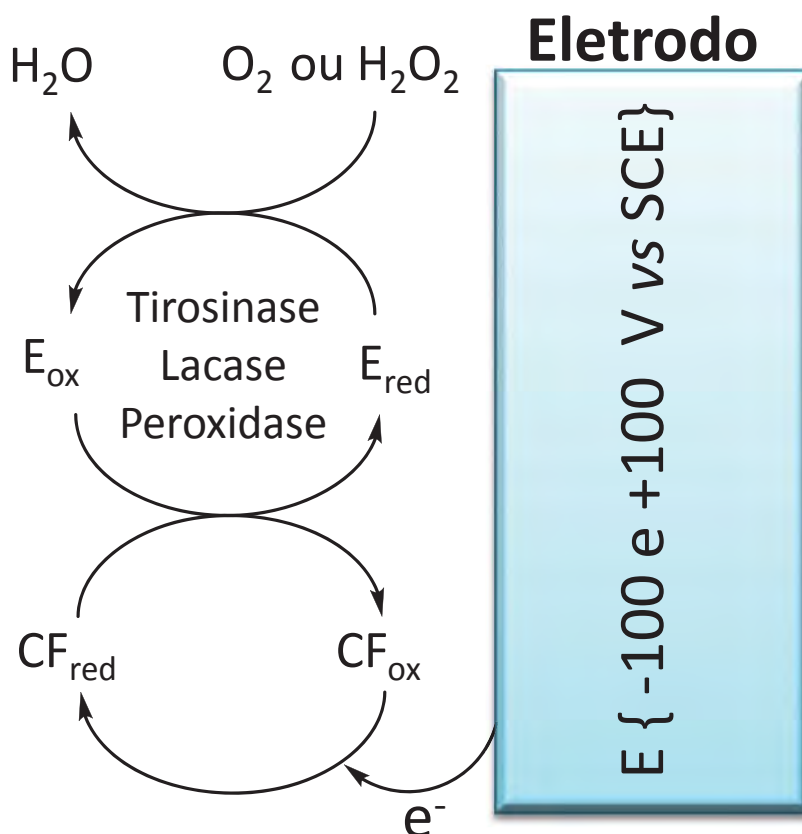
molécula de água e a forma deoxi reduzida, a qual é novamente oxidada para regenerar a forma deoxi Cu_2^{4+} original, com o auxílio de um agente oxidante ou pela aplicação de um potencial adequado, a fim de ligar uma nova molécula de H_2O_2 . [12,37]

No ciclo envolvendo a oxidação do catecol, a coordenação do substrato catecólico aos dois átomos de cobre, aos quais o peroxo está coordenado, resulta na degradação do complexo de cobre (na enzima) com transferência de elétrons do catecol para o oxigênio, resultando na correspondente *o*-quinona e uma molécula de água. A quinona deixa os átomos de cobre do sítio ativo no estado oxidado (Cu^{2+}) e a enzima na forma *met*. Neste estado, a enzima não pode ligar-se a O_2 ou H_2O_2 , portanto, ele está inativo para substratos fenólicos. Por outro lado, a forma *met* da enzima é capaz de coordenar uma outra molécula de substrato catecólico e oxidá-lo para *o*-quinona através da doação de elétrons para os átomos de cobre, regenerando a forma deoxi-reduzida (Cu_2^{2+}) [12].

Assim, para o desenvolvimento de um sensor biomimético para detecção de compostos fenólicos o uso da Tyr como enzima modelo é bastante atrativo. Fenóis podem ser determinados amperometricamente através de uma oxidação eletroquímica direta. Entretanto, este procedimento possui uma série de desvantagens, principalmente, devido a uma alta sobretensão. O alto potencial aplicado provoca uma grande corrente de fundo, e conseqüentemente, um alto nível de ruído. Além disto, nas oxidações diretas de fenóis, um grande número de reações paralelas podem ocorrer levando, principalmente, a formação de produtos poliméricos que passivam a superfície do eletrodo. Biossensores amperométricos podem minimizar estes obstáculos na determinação de fenóis, uma vez que operam com um baixo potencial aplicado em relação a um eletrodo de referência, onde se mede a corrente gerada pela reação biocatalisada de oxidação ou redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo, que de um modo geral, processam-se em potenciais ao redor de 0 mV. Nesse potencial, a contribuição de espécies interferentes (facilmente oxidadas ou reduzidas) é minimizada. [1]

As enzimas redox tirosinase, lacase e peroxidase são as mais utilizadas para a construção de biossensores amperométricos para fenóis. Apesar de estas enzimas possuírem diferentes mecanismos de ação, suas atuações em

biossensores amperométricos para a detecção de compostos fenólicos têm sido esquematizadas como uma sequência de reações similares, conforme mostra o Esquema 2 [34,40].



Esquema 2. Mecanismo das reações nos eletrodos modificados pelas enzimas para a determinação de compostos fenólicos. E_{red} e E_{ox} são as formas reduzida e oxidada, respectivamente, das enzimas; CF = composto fenólico [1].

As moléculas de enzima na superfície do eletrodo são oxidadas pelo oxigênio (no caso da tirosinase e lacase) ou peróxido de hidrogênio (no caso da peroxidase), sendo em seguida reduzida por compostos fenólicos. Durante esta última reação, os fenóis são basicamente convertidos em quinonas e/ou radicais livres, e esses produtos, usualmente eletroativos, podem ser reduzidos na superfície do eletrodo em potenciais próximos de 0 V vs ECS (Eletrodo de Calomelano Saturado). A corrente de redução medida é proporcional à concentração do composto fenólico na solução. A detecção do consumo de O_2

ou H_2O_2 é outra possibilidade de se monitorar a concentração dos compostos fenólicos. Entretanto, o método de detecção dos fenóis baseado na redução dos produtos gerados pelas reações enzimáticas apresenta vantagens tais como: simplicidade de construção e manuseio; proteção do eletrodo contra o acúmulo de produtos poliméricos secundários sobre sua superfície (passivação), que usualmente são observados durante oxidação eletroquímica direta de fenóis; amplificação da resposta como uma consequência da redução de quinonas e/ou radicais fenoxi ao composto fenólico inicial [34,40]

Como descrito anteriormente as enzimas tirosinases estão amplamente distribuídas na natureza. A tirosinase obtida a partir de cogumelo é a utilizada na maioria dos estudos com biossensores amperométricos. Esta enzima existe em múltiplas formas, distribuídas diferencialmente em várias partes do cogumelo, podendo apresentar diferentes características cinéticas e termodinâmicas [41].

A maioria das investigações com biossensores amperométricos foram inicialmente otimizadas utilizando-se compostos puros. As análises de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental foram favorecidas à medida que os biossensores desenvolvidos conseguiram melhores sensibilidade e estabilidade. Atualmente, a literatura mostra o emprego com sucesso, destes biossensores em análise de fenóis em águas de rio, análise de águas superficiais e efluentes industriais [1,40], mas poucos trabalhos têm sido relatados na aplicação em formulações cosméticas.

No intuito de mimetizar o sítio ativo da Tyr, moléculas que contenham cobre rodeado por átomos de nitrogênio poderão ser avaliadas na construção de sensores biomiméticos, visando obter uma melhora em relação aos biossensores já construídos e reportados na literatura. Pensando nisto, complexos simples de cobre e dipiridina em diferentes proporções deste ligante (Figura 2), têm demonstrado ser catalisadores biomiméticos da Tyr [11]. Assim, neste trabalho de mestrado, o complexo 2c foi utilizado na construção de sensores biomiméticos descartáveis visando à detecção e quantificação sensível e seletiva de hidroquinona, como uma alternativa aos biossensores enzimáticos já reportados na literatura.

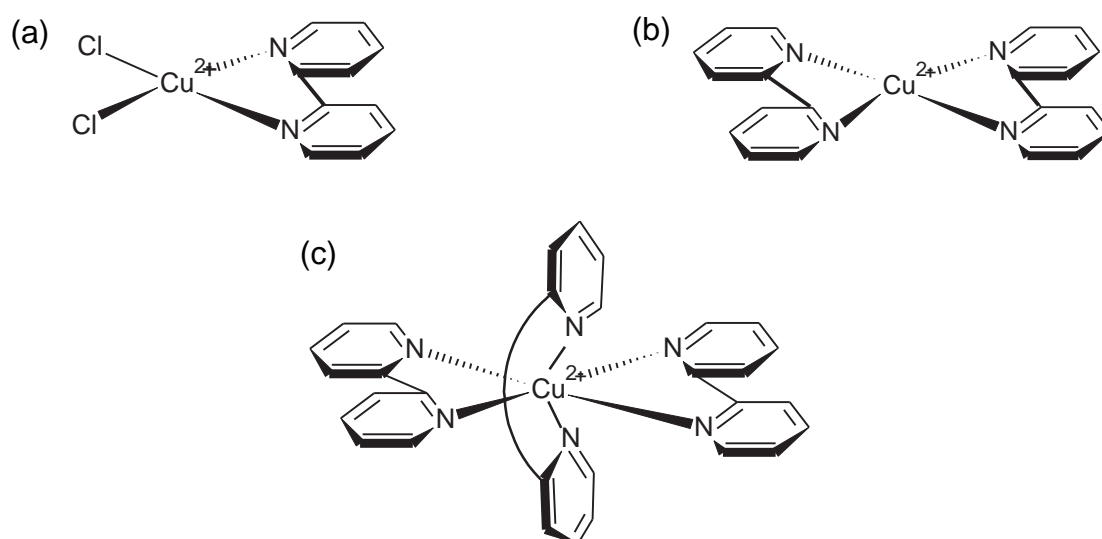


Figura 2. Complexos de cobre, conhecidos como catalisadores biomiméticos da enzima Tyr. a) $\text{Cu}(\text{dipy})\text{Cl}_2$: cloreto de biperidina de cobre (II); b) $[\text{Cu}(\text{dipy})_2]\text{Cl}_2$: cloreto de *bis*(biperidina) cobre (II) e c) $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2$: cloreto de *tris*(biperidina) cobre (II).

1.2. Biossensores e Sensores Biomiméticos

Nas últimas décadas as ciências analíticas têm experimentado um avanço relacionado à capacidade de obtenção de informações químicas em diversos sistemas, proporcionando um elevado desenvolvimento analítico, resultando na automação, miniaturização e simplificação destes objetos em estudo [1,41]. Neste contexto, os biossensores têm adquirido primordial importância devido à possibilidade de avaliação de processos sintéticos ou biológicos, além do entendimento destes processos [42]. Desta forma, estes dispositivos têm sido usados em diferentes áreas de aplicação, destacando-se os vários setores da indústria, como as de alimentos, farmacêuticas e clínicas e na agricultura, devido ao fato destes ramos de atividade necessitar de métodos analíticos rápidos, exatos e confiáveis na determinação das espécies de interesse. Além disso, os biossensores possibilitam análises com monitoramento contínuo, *in vivo* e em tempo real, apresentando-se como substituintes potenciais das técnicas analíticas destrutivas ou que exijam

elevadas quantidades de amostras, aumentando sua potencialidade para o uso comercial.

Os biossensores podem ser definidos como um subgrupo de sensores químicos capazes de proporcionar informação analítica quantitativa ou semi-quantitativa, usando um elemento de reconhecimento biológico (como enzimas, anticorpos, proteínas ou microrganismos) [41] ou biomimético (catalisadores redox, polímeros molecularmente impressos, aptâmeros, etc.) em contato a transdutores (eletroquímicos, ópticos, térmicos, etc.), conforme apresentado na Figura 3. A descrição sistemática de um biossensor inclui cinco características principais: (i) a espécie a ser analisada, (ii) o princípio de leitura do transdutor, (iii) o modelo físico ou (bio)químico do sistema, (iv) a aplicação e (v) a tecnologia e materiais que deverá ser usada para a fabricação do sensor [43].

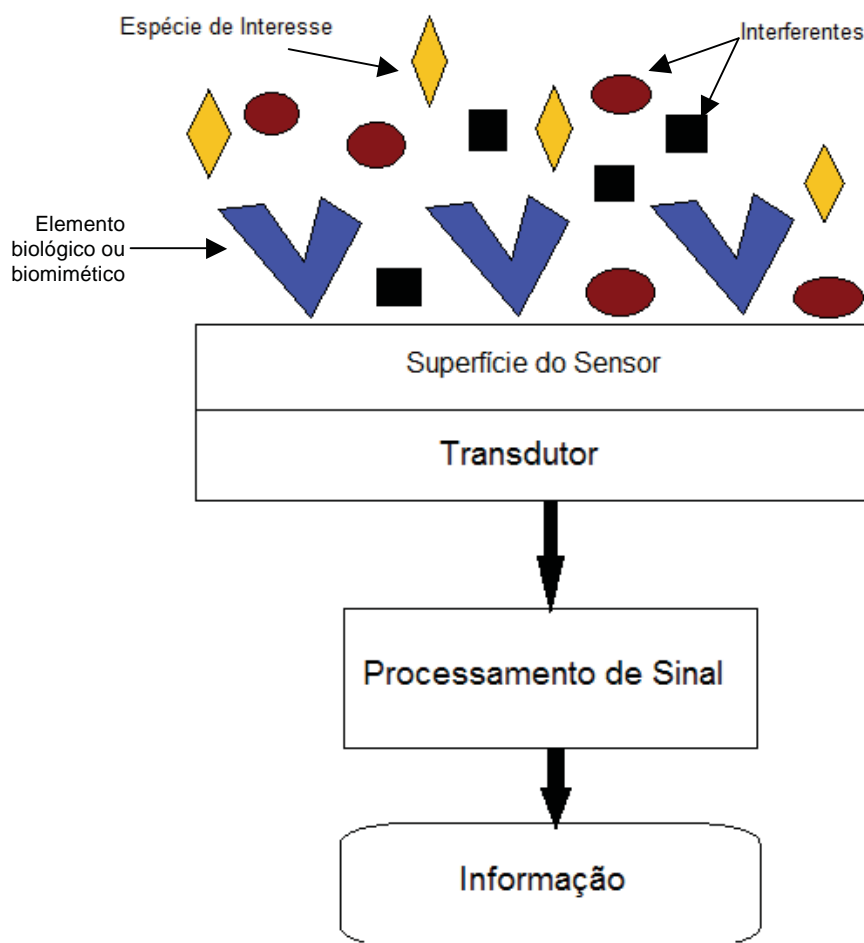


Figura 3. Esquema de um biossensor, adaptado da referência 43.

Dentre as partes que constituem os biossensores, o processador de sinal eletrônico é provavelmente a parte menos dependente do tipo de sensor e é somente uma consequência do rápido desenvolvimento no campo da eletrônica. O sinal físico-químico proveniente do sistema de reconhecimento biológico/biomimético é convertido em um sinal mensurável pelo transdutor. As características do transdutor de sinal determinam o custo do instrumento, do sensor e as limitações físicas. [43] Diferentes transdutores têm sido empregados, tal como observado na Figura 4, na qual pode ser verificado que os eletroquímicos são os mais utilizados, seguidos pelos transdutores ópticos, cujo uso tem crescido bastante atualmente.

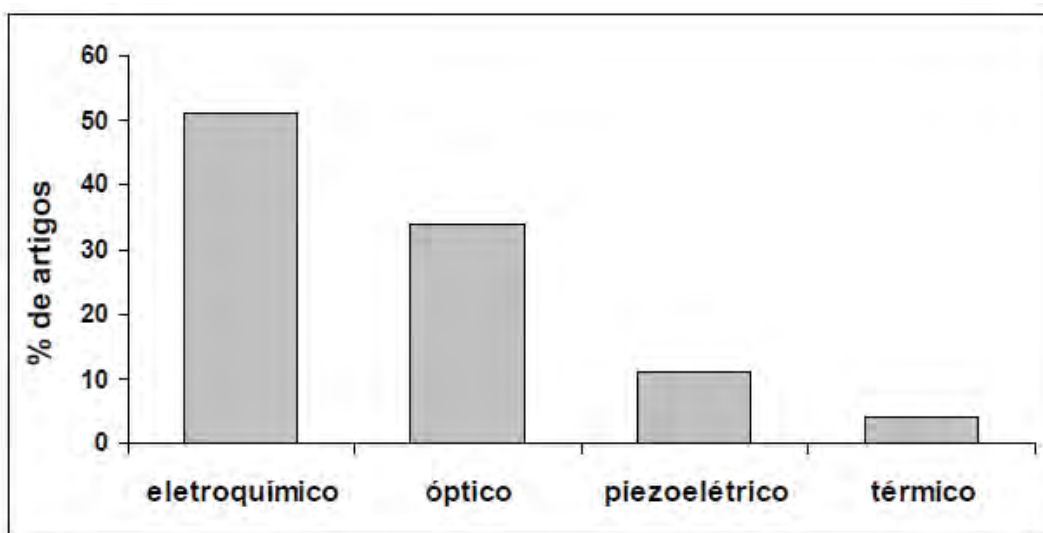


Figura 4. Produção científica relacionada aos diferentes transdutores usados em biossensores de 1980 a 2011, pesquisada na base de dados SciFinder Scholar®, acessado em 10/06/2011.

O sistema de reconhecimento biológico transforma as informações do domínio bioquímico, gerando sinais químicos ou físicos com sensibilidade definida. O principal propósito deste sistema é proporcionar ao sensor um elevado grau de seletividade para uma determinada espécie de interesse analítico. Os elementos biológicos mais regularmente empregados são as enzimas, que podem ser utilizadas na sua forma purificada, estarem presentes em microrganismos ou em porções de tecido animal ou vegetal. As enzimas são catalisadores biológicos usados em reações com um substrato específico, porém com maior reversibilidade do complexo enzima-substrato formado. Os

anticorpos são a segunda classe de elementos biológicos mais utilizados no desenvolvimento de biossensores. Porém, seu modo de ação é diferente daquele encontrado nas enzimas, pois eles se ligam especificamente com o antígeno correspondente, mas, na maioria das vezes, sem nenhum efeito catalítico. Devido à alta força da ligação que ocorre entre os anticorpos e os antígenos, os imunossensores são capazes de proporcionar alta sensibilidade para seus biossensores, mais comumente conhecidos como imunossensores. Os ácidos nucleicos também são utilizados como elementos de reconhecimento, mas em menor frequência, por serem difíceis de isolar. Eles podem operar seletivamente devido às características dos pares de bases nitrogenadas, são conhecidos também como genossensores. E, bem menos utilizados, existem os chamados receptores, que são proteínas que se situam na membrana plasmática de bicamadas lipídicas e possuem propriedades específicas de reconhecimento. As vantagens e desvantagens de cada elemento de reconhecimento biológico estão descritas na Tabela 1.

Entretanto, apesar da altíssima seletividade oferecida pela natureza nos sistemas biológicos, podem ser apontadas algumas desvantagens a respeito de sua fragilidade, tanto em relação às condições de armazenagem em função do tempo, quanto ao tipo de imobilização na superfície do transdutor, que associados ao alto custo de obtenção destes materiais torna estes sistemas pouco viáveis para aplicações em condições extremas de pH, temperatura, por longos períodos de tempo e para fabricação em massa, salvo algumas exceções como é o caso dos biossensores para glicose.

Desta forma, alguns materiais abióticos são atualmente empregados e classificados como elementos de reconhecimento de “biossensores”, pois possuem a capacidade de mimetizar os sistemas biológicos [44]. Dentre estes materiais de origem biomimética podem-se destacar os catalisadores biomiméticos, polímeros molecularmente impressos e aptâmeros, os quais têm permitido obter sensores biomiméticos mais robustos para aplicações realmente práticas em meio adversos às condições de funcionamento dos sistemas biológicos.

Tabela 1. Características relevantes dos materiais utilizados como elemento de reconhecimento na construção de biossensores [43].

Elemento de Reconhecimento	Vantagens	Desvantagens
Enzimas	<ul style="list-style-type: none"> - formam complexos estáveis com a espécie de interesse - são bastante seletivas - possuem resposta rápida e a catálise pode ser facilmente monitorada 	<ul style="list-style-type: none"> - podem perder a atividade por imobilização - são estáveis por período relativamente curto de tempo - as medidas devem ser feitas em soluções com pH limitado
Anticorpos (Ab)	<ul style="list-style-type: none"> - são altamente seletivos - são bastante sensíveis - a ligação com o antígeno (Ag) é muito estável 	<ul style="list-style-type: none"> - não possuem efeito catalítico e seu monitoramento é indireto - o imunocomplexo Ag-Ab formado é irreversível na maioria das vezes - Nem sempre existe o Ab ou Ag necessário e tem que ser produzido e purificado antes do desenvolvimento do sensor
Ácidos Nucléicos	<ul style="list-style-type: none"> - são bastante específicos 	<ul style="list-style-type: none"> - por gerarem baixa resposta, na maioria das vezes há necessidade do uso de marcadores - É necessária a produção da porção da fita de DNA ou RNA para imobilizar no sensor.
Receptores	<ul style="list-style-type: none"> - muito utilizados em análises específicas 	<ul style="list-style-type: none"> - biossensores difíceis de construir - possuem custo muito elevado - são difíceis de isolar

Para permitir o uso contínuo dos (bio)sensores, é essencial uma incorporação estável dos elementos de reconhecimento e esta tem sido uma etapa crítica no desenvolvimento destes dispositivos analíticos. Isso porque os

(bio)componentes, quando imobilizados, precisam reter a maior parte de sua atividade biológica, para que o biossensor possa apresentar sensibilidade e seletividade significativas para o composto alvo. Existem várias técnicas para a imobilização das biomoléculas, porém as mais comuns são a ligação covalente, a ligação covalente cruzada, a oclusão em gel e a adsorção física (Figura 5). Todos esses métodos possuem numerosas variantes e se faz necessário selecionar o método mais apropriado para cada caso em particular, considerando-se o tipo de aplicação que será realizada e o transdutor utilizado [43-45].

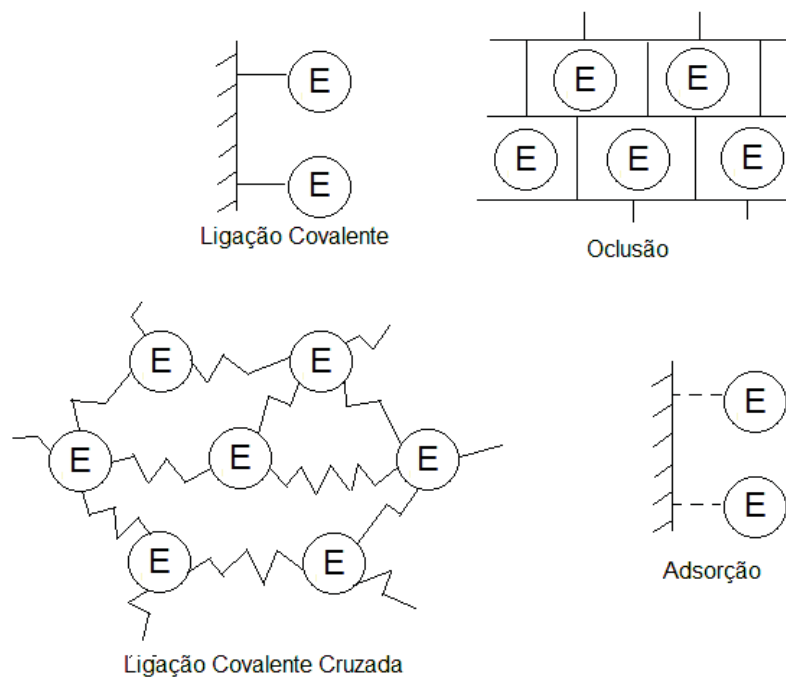


Figura 5. Esquema dos principais métodos de imobilização do elemento biológico em biossensores.

Na Tabela 2 é mostrado um resumo de todos os tipos de imobilização mostrados na Figura 5, apresentando-se as vantagens e desvantagens dos métodos.

Tabela 2. Procedimentos de imobilização de biomoléculas na superfície de sensores [43-45].

Tipo de Imobilização	Vantagens	Desvantagens
----------------------	-----------	--------------

Adsorção	<ul style="list-style-type: none"> - simples - realizados em condições brandas - menos destrutiva para o material biológico 	<ul style="list-style-type: none"> - ligações das (bio)moléculas são dependentes do pH, solvente e temperatura - alta taxa de lixiviação para a solução, comprometendo a estabilidade do sistema.
Ligação Covalente	<ul style="list-style-type: none"> - complexo estável biomolécula-substrato - lixiviação das moléculas é minimizada - maior sensibilidade 	<ul style="list-style-type: none"> - procedimentos mais laboriosos com consumo de tempo - possibilidade de perda da atividade biológica do material
Ligação Covalente Cruzada	<ul style="list-style-type: none"> - procedimento simples - forte ligação química das biomoléculas 	<ul style="list-style-type: none"> - dificuldade de controle de reação - pode ocorrer falta de rigidez da superfície
Oclusão	<ul style="list-style-type: none"> - podem ser utilizados diversos materiais - preservação da atividade biológica 	<ul style="list-style-type: none"> - o efeito do tamanho dos poros dos materiais pode comprometer a adsorção - perda da biomolécula por lixiviação

1.2.1. Mimetização de sistemas biológicos enzimáticos

As propriedades das enzimas, tanto do ponto de vista da reatividade quanto dos mecanismos de reação, e principalmente em relação à atividade catalítica frente a reações de oxidação e redução têm estimulado o estudo de substâncias redox de origem não-biológica capazes de mimetizar a atividade catalítica dos primeiros [46,47]. Neste sentido, foi introduzida uma inovação no campo dos biossensores, pois se vislumbrou a possibilidade das vantagens que poderiam advir da utilização de compostos biomiméticos.

Sabe-se que os fatores que aumentam a distância entre o centro redox da enzima e o eletrodo diminuem a eficiência dos biossensores [48]. Na

maioria das enzimas, a barreira limitante mais crítica em relação à distância enzima-eletrodo é a densa camada protéica ao redor do sítio ativo da enzima [18,19]. Então, a redução ou eliminação desta capa protéica responsável pela estrutura tridimensional da enzima pode ser realizada por meio da modificação das biomoléculas ou empregando-se complexos metálicos que imitem a estrutura do centro redox da enzima de interesse. A princípio, estes sensores biomiméticos devem ser tão ou mais sensíveis e estáveis quanto à versão que utiliza o componente biológico na íntegra.

Sabe-se que as enzimas são estruturas complexas existentes em organismos vivos, que possuem grupos catalíticos e muitas vezes requerem de cofatores específicos ou coenzimas para desempenhar a catálise bioquímica. Esta catálise enzimática altamente efetiva, existente na natureza, tem inspirado muitos pesquisadores como aconteceu com Cram [49], um dos pioneiros a perceber que as estruturas enzimáticas poderiam ser substituídas por modelos mais simples. Cram estudou estruturas hospedeiras (*host*) de criptanos que se ligavam seletivamente a moléculas hóspedes (*guest*).

Com a finalidade de sintetizar enzimas artificiais muitas configurações têm sido propostas, uma vez que a idealização do uso de modelos enzimáticos não está diretamente relacionada com a estrutura das enzimas naturais, mas sim com estruturas capazes de realizar catálises de espécies importantes. Têm-se partido desde a modificação de coenzimas ou cofatores naturais de enzimas [50,51], até a síntese de compostos que se apresentam como modelos enzimáticos [52,53]. As enzimas também podem ser imitadas fazendo uso de estruturas supramoleculares, que podem executar os mesmos processos realizados pelas enzimas, sem seguir estritamente o caminho pelo qual as enzimas realmente o fazem [54].

O importante papel de íons cobre para sistemas biológicos é reconhecido há muito tempo. Cobre é um componente essencial para os organismos vivos, isto pode ser atestado pelo grande número de proteínas que possuem íons cobre em sua estrutura, como por exemplo, as transportadoras de elétrons (plastocianina, azurina, pseudoazurina), as oxigenases (tirosinase, dopamina β -hidroxilase, fenilalanina hidroxilase, etc), as oxidases (galactose oxidase, amina oxidase, ascorbato oxidase, lacase, citocromo-c oxidase), as redutases (nitrito redutase etc), algumas proteínas que causam

desproporcionamento (superóxido dismutase) e outras de função ainda desconhecida como a umecianina e a estelacianina [55]. Na última década esforços têm sido realizados para entender como funcionam as enzimas dependentes de cobre que utilizam oxigênio para a funcionalização de substratos orgânicos. Baseado nas propriedades espectroscópicas, principalmente aquelas determinadas através de ressonância eletrônica paramagnética, os sítios ativos destas cuproproteínas eram classificadas em três grupos, tipo I, II e III. Contudo, graças ao grande número de informações estruturais recentes a respeito do sítio ativo destas proteínas novas classificações estão surgindo com até sete classes distintas descritas [55].

Com base na ampla informação existente na literatura a respeito das enzimas dependentes de cobre, alguns autores têm desenvolvido sensores quimicamente modificados, onde toda a estrutura enzimática pode ser substituída por um complexo de cobre mais simples [53-56]. No trabalho desenvolvido por Hasebe et al. [53], foi usado o complexo de poli-histidina cobre como espécie catalisadora na construção de um sensor biomimético com transdução amperométrica para ascorbato. Concluiu-se que o catalisador conseguiu imitar o sítio ativo da referida enzima devido ao perfil de resposta que seguiu a cinética de Michaelis – Menten.

Muitos complexos dinucleares de cobre com diferentes tipos de ligantes têm sido preparados e caracterizados de forma a se entender as relações entre a geometria ao redor dos sítios de íons cobre, o modo de coordenação com ligantes de oxigênio, a reatividade e suas propriedades espectroscópicas [57,58]. Um trabalho em especial, realizado por Rockcliffe e Martell [57] descreve a síntese, caracterização e utilização de complexos de cobre (I) e (II) formados a partir de ligantes macrocíclicos análogos ao sítio ativo da enzima tirosinase. No trabalho citado também foi atestada a atividade mimética destes compostos em relação à oxidação de compostos fenólicos.

Em 1972 foi publicado o primeiro artigo de revisão sobre o que havia sido descrito na literatura até então sobre a química biomimética [59]. Neste artigo foi definida por Ronald Breslow: como o ramo da química orgânica que tenta imitar reações químicas naturais e processos enzimáticos de forma a melhorar o desempenho da química orgânica. Esta primeira definição é muito subjetiva e restrita ao desenvolvimento de novas rotas sintéticas inspiradas em

processos enzimáticos. No entanto, isso não significava imitar um sistema enzimático em específico, mas ver nas enzimas exemplos de catalisadores polifuncionais que se ligam aos seus substratos a partir de geometrias bem definidas.

Existem enzimas que são capazes de realizar a reação de hidrólise de seus substratos com rapidez incomparável, no entanto, este tipo de reação é fácil de reproduzir no âmbito laboratorial. Muito mais inacessível é o que a natureza faz, por exemplo, na transformação de ácido esteárico, especificadamente, em ácido oléico que consiste em introduzir uma dupla ligação no meio de uma cadeia de carbonos homogênea sem a necessidade de ativar nenhum dos átomos de carbono da cadeia com grupos funcionais específicos [59]. Portanto, uma síntese biomimética deveria, a princípio, tentar desenvolver “reagentes rígidos” no sentido da orientação dos reagentes e do substrato em uma geometria bem definida, com ataque em local específico formando um complexo reagente-substrato [60]. Como exemplo pode-se citar a funcionalização seletiva de esteróis por meio da técnica biomimética [59-61]. O objetivo dos autores era incluir uma dupla ligação no composto coleste-3 α -ol entre os carbonos 14 e 15. Partindo do princípio que seria necessário utilizar um reagente rígido, selecionaram ácidos benzofenólicos de cadeias carbônicas de diferentes tamanhos dado que estes compostos são foto-excitáveis (ao seu estado tripleto), desta forma, capazes de atacar grupos metilênicos. Ao atacar um hidrogênio em particular do colesterol, o átomo de oxigênio do estado tripleto da benzofenona fica unido ao substrato na forma de um di-radical. Esta espécie intermediária pode entrar em colapso e formar uma nova ligação C-C, ou realizar a transferência de hidreto para formar uma nova dupla ligação no substrato e um grupo carbonílico reduzido na benzofenona. Depois de uma etapa de hidrólise, o ácido benzofenólico é recuperado. Foi verificado que utilizando o ácido benzofenoacético ocorreu um ataque seletivo ao carbono 14, produzindo o coleste-14-enol com 55 % de rendimento.

Depois deste primeiro passo, o desenvolvimento da química biomimética continuou ligado à química orgânica, mas voltado à utilização de cicloamiloses, ou como são mais conhecidas, as ciclodextrinas. O conceito de química biomimética foi redefinido por Kurganov e Topchieva [62] e ficou mais abrangente: “ciência que utiliza os princípios da organização bioquímica para

construir sistemas artificiais que apresentem propriedades próprias de sistemas químicos naturais”. Observa-se uma enzima verificar-se-á que a força que a une a um determinado substrato é, entre outras, devido ao efeito hidrofóbico. As ciclodextrinas apresentam a propriedade interessante de que elas são solúveis em água, mas possuem uma cavidade que é hidrofóbica, tal qual as enzimas [60,63]. Em particular, as ciclohexamiloses se ligam muito bem com derivados benzênicos, enquanto que as cicloheptamiloses apresentam cavidades maiores que dão mais flexibilidade à formação do complexo reagente/substrato e a diferentes constantes de ligação. Neste sentido a idéia de biomimetização está ligada a idéia de reações direcionadas. Em complexos formados entre ciclodextrinas e anéis aromáticos, como por exemplo, o anisol, a posição *orto* seria protegida enquanto que a *para* seria acessível. Neste caso seria possível alcançar uma substituição seletiva aromática [60].

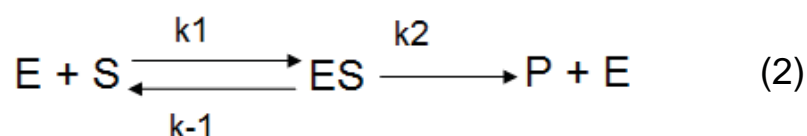
Já a primeira enzima artificial foi descrita em 1970, formada a partir de um dímero de ciclodextrina [64] e apresentavam somente seletividade geométrica entre compostos angulares e lineares, respectivamente. Anos mais tarde, um dímero de ciclodextrina foi ligado através de uma ponte de enxofre, este composto apresentou seletividade de ligação para moléculas de colesterol. Posteriormente, ao se formar dímeros de ciclodextrinas usando 2,2'-dipiridil como ligante [65], foi possível incorporar um metal entre as unidades de ciclodextrinas. Ao se complexar Cu^{2+} , verificou-se que a hidrólise de um éster realizada pelo composto é cerca de 200.000 vezes mais rápida que hidrólise em meio aquoso. Quando o ligante empregado foi piridina 2-carboxaldeído [65,66], a catálise foi da ordem de 1.700.000 vezes mais rápida que em meio aquoso.

Enzimas são catalisadores eficientes. Não é incomum para uma enzima o aumento da velocidade de uma determinada reação por um fator de 10 bilhões de vezes [67]. Uma vez que as moléculas podem constituir fortes e seletivos sítios de ligação para algum substrato, podem ser modificadas com o intuito de construir catalisadores que imitem enzimas, bem como servir de modelo para compreender e explicar mecanismos catalíticos e composição estrutural de moléculas biológicas complexas. O mecanismo de ação da enzima urease, por exemplo, foi proposto com base em estudos realizados com complexos mononucleares de níquel [68].

Desta forma, a química biomimética abre à possibilidade de usar estruturas químicas complexas ou simples que possam de fato realizar catálise de substratos enzimáticos tão eficientemente como as enzimas, e ao mesmo tempo de forma mais duradoura, principalmente em se tratando de sua aplicação na construção de sensores biomiméticos. Adicionalmente, outro fator atraente para o uso de catalisadores biomiméticos na construção de sensores amperométricos, é a possibilidade de uso de compostos químicos com estrutura análoga ao sitio ativo descoberto de enzimas, pois nesses casos a transferência eletrônica se tornará mais eficiente, fornecendo sensores com alta sensibilidade.

1.2.2. Constante de Michaelis-Menten

Em 1913, uma teoria geral de ação enzimática e cinética foi desenvolvida por L. Michaelis e M. L. Menten *apud* referência 70. Essa teoria é fundamental para análise quantitativa da cinética enzimática/biomimética e da inibição, e é melhor desenvolvida para reações nas quais existam apenas um substrato. Propõe-se que a reação global seja:



Onde E, S, ES e P simbolizam enzima, substrato, complexo enzimático e produtos, respectivamente. De acordo com este modelo, quando a concentração do substrato é suficientemente alta para converter a enzima para a forma ES, a segunda etapa da reação passa a ser a determinante da velocidade da reação, que se torna insensível ao aumento da concentração do substrato [69] A expressão geral para velocidade desta reação é então representada por:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (\text{eq. 1})$$

A velocidade global da produção de [ES] é:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (\text{eq. 2})$$

A [ES] permanece praticamente constante até que o substrato se esgote. Então, a síntese de ES deve ser igual à velocidade de consumo ao longo da equação, ou seja, está no estado estacionário.

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (\text{eq. 3})$$

A quantidade de [ES] e [E] não são medidas diretamente, mas a concentração de enzima total, $[E]_t$, é geralmente determinada. Então, na expressão da cinética global tem-se:

$$[E]_t = [E] + [ES] \quad (\text{eq. 4})$$

Combinando-se as expressões (2), (3) e (4), tem-se:

$$k_1([E]_t - [ES])[S] = [(k_{-1} + k_2)][ES] \quad (\text{eq. 5})$$

Rearranjando tem-se:

$$[ES](k_{-1} + k_2 + k_1[S]) = k_1[E]_t[S] \quad (\text{eq. 6})$$

Dividindo-se os dois termos por k_1 e isolando [ES]:

$$[ES] = \frac{[E]_t[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{eq. 7})$$

onde, K_m é conhecido como constante de Michaelis definida como:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{eq. 8})$$

A velocidade inicial pode ser expressa experimentalmente medindo-se as quantidades de $[E]_t$ e $[S]$:

$$v_0 = \left. \frac{d[P]}{dt} \right|_{t=0} = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_t[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{eq. 9})$$

A medida da eficiência catalítica da enzima através da determinação da taxa máxima em que ela converte o substrato em produto, é expresso como $V_{m\acute{a}x}$, ou mais precisamente, como número de “turnover” (conversão), o número de mols do substrato convertidos em por minuto (min) por miligrama (mg) de enzima, quando a enzima encontra-se saturada com o substrato, ou seja, quando está toda na forma de ES [69,70]

$$V_{m\acute{a}x} = k_2[E]_t \quad (\text{eq. 10})$$

Combinando-se as equações (9) e (10) tem-se:

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{eq. 11})$$

Esta expressão é chamada de Equação de Michaelis-Menten.

A constante de Michaelis, K_M , é a concentração de substrato no qual a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima, ou seja, é a constante de dissociação [69]. O K_M da reação de um substrato tem a dimensão mols por litro, e é independente da concentração enzimática. O K_M não é um valor fixo, pois varia com a estrutura do substrato, com o pH e com a temperatura. Para enzimas que apresentam mais de um substrato, cada uma possui um K_M

característico. Assim, o substrato com mais baixo valor de K_M , significa que a enzima tem maior afinidade por ele [69,70].

A relação de Michaelis-Menten pode ser transformada algebricamente em outras formas que são mais úteis na obtenção de gráficos dos dados experimentais. Uma delas é obtida simplesmente substituindo os valores inversos de ambos os lados da equação de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{m\acute{a}x} [S]} \quad (\text{eq. 12})$$

Rearranjando e reduzindo, tem-se:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (\text{eq. 13})$$

que é chamada de Equação de Lineweaver-Burk. Quando plotado um gráfico de $1/v_0$ contra $1/[S]$, obtêm-se uma linha reta que possui inclinação $K_M/V_{m\acute{a}x}$; a interceptação no eixo das ordenadas é $1/V_{m\acute{a}x}$ e no eixo das abcissas é $-1/K_M$ [69,70].

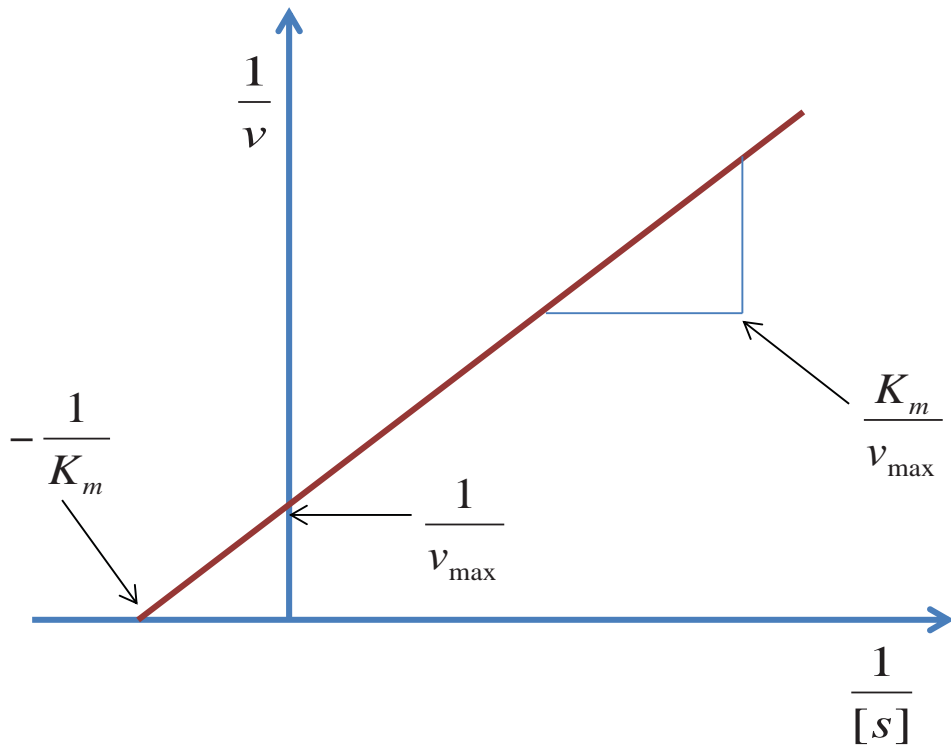


Gráfico 1: Gráfico de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco).

No caso de sensores que usam enzimas ou compostos que as mimetizem, este perfil hiperbólico de resposta também é esperado, e desde que as constantes de Michaelis-Menten são calculadas com estes compostos em solução, quando imobilizados a constante obtida nos biossensores corresponderá a uma constante aparente de Michaelis-Menten (K_{MM}^{app}), que descreve a atividade e afinidade do componente biológico/biomimético após imobilização.

2. Objetivo

Este projeto de mestrado visa à construção e aplicação de sensores amperométricos à base de catalisador biomimético da enzima Tirosinase, visando investigar a ação mimética do complexo $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2$, cloreto de *tris*(bipiridina) cobre (II) para determinação de Hidroquinona em amostras de interesse farmacêutico em batelada utilizando-se eletrodo do tipo impresso (SPE).

3. Parte experimental

3.1. Reagentes

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico. As soluções de complexo de cobre, tampão Pipes, tampão fosfato, Hidroquinona e peróxido de hidrogênio foram preparadas usando água deionizada (sistema Millipore Milli-Q) e o pH da solução tampão foi determinado usando eletrodo de pH conectado a pH-metro da marca Thermo Scientific®, modelo Orion Star 3.

Hidroquinona foi adquirida pela J.T. Baker, São Paulo, Brasil. Peróxido de Hidrogênio foi fornecido pela Synth®, São Paulo, Brasil. Os Tampões foram preparados a partir de reagente Pipes (sal sódico) e fosfato de potássio dibásico fornecidos pela Sigma® e Synth®, respectivamente. O complexo cloreto de *tris*-2,2'-bipiridil cobre II foi preparado a partir da reação entre cloreto de cobre e 2,2'-bipiridina fornecidos pela Sigma-Aldrich®.

Nas soluções padrão de HQ, soluções na concentração de $1,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ foram utilizadas. Para tal, pesou-se uma massa de 0,0110 g HQ e dissolvidas em 10,0 mL de água deionizada, tomando-se o cuidado de vedar o balão e o frasco onde a solução fica mantida durante a análise com papel alumínio, evitando a oxidação da HQ. A massa de HQ foi calculada de acordo com a relação:

$$m_{HQ} = C(\text{mol L}^{-1}) \times V(\text{L}) \times MM(\text{mol L}^{-1})$$

levando-se em consideração que a massa molar da HQ é de 110,11 g mol⁻¹.

As amostras contendo Hidroquinona foram adquiridas em farmácia, sendo uma das amostras o creme clareador Clariderm®, da indústria Stiefel® e amostra magistral, ambas contendo 2% de hidroquinona (m/m) por cada 50 g de creme.

3.2. Preparação do complexo cloreto de *tris*-2,2'-bipiridil cobre(II)

O complexo $[\text{Cu}(\text{Dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, foi preparado seguindo o procedimento descrito por Meyer [31]. Para isto; 25,0 mL de uma solução aquosa $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol) foram misturados com 25,0 mL de uma solução etanólica $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ de 2,2'-dipiridina (3 mmol), formando uma solução de cor azul. A solução foi evaporada sob vácuo, até reduzir o volume para 20 mL, e mantida a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 30 dias aproximadamente para completa secagem e de forma gradual. Após este período, um sólido em forma de escamas de cor azul turquesa correspondente ao complexo $[\text{Cu}(\text{Dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Dipy 1:3) foi obtido. Para efeitos de caracterização do complexo foi empregada a técnica de Análise Elementar, a fim de verificar os teores de Cu, C, N e H.

3.3. Construção dos sensores

O uso de Nafion® foi atribuído por ser largamente utilizado na modificação de superfícies de eletrodos com filmes poliméricos fornecendo um método simples, reprodutível e conveniente para fixar centro redox ativos com carga oposta na superfície dos eletrodos. Assim, o Nafion® (negativamente carregado) foi usado para imobilizar a espécie redox ativa (complexo de Cu^{2+}) sobre a superfície dos eletrodos.

Para a preparação das membranas sensoras, a solução do complexo em dimetilformamida (DMF) foi misturada com a solução alcoólica a 5% (v/v) de Nafion®, e colocada na superfície de eletrodos de carbono vítreo ou do eletrodo impresso de grafite, deixando secar a temperatura ambiente para permitir a formação da membrana na superfície de ambos os eletrodos, conforme ilustrado na Figura 6.

Para as medidas eletroquímicas usando os sensores à base de carbono vítreo modificado com a membrana de Nafion®, foi usado eletrodo de referência de $\text{Ag}/\text{AgCl}, \text{KCl}_{\text{sat}}$ e como eletrodo auxiliar uma espiral de platina. A área dos eletrodos de carbono vítreo e de trabalho (grafite) no SPE foi de $0,126 \text{ cm}^2$. O sistema de eletrodos impressos (FS-1, Florence sensors®) utilizado neste trabalho é dotado de eletrodo de referência de Ag, eletrodo auxiliar e eletrodo

de trabalho de grafite. A Figura 7 mostra os eletrodos utilizados e a respectiva montagem da cela unitária.

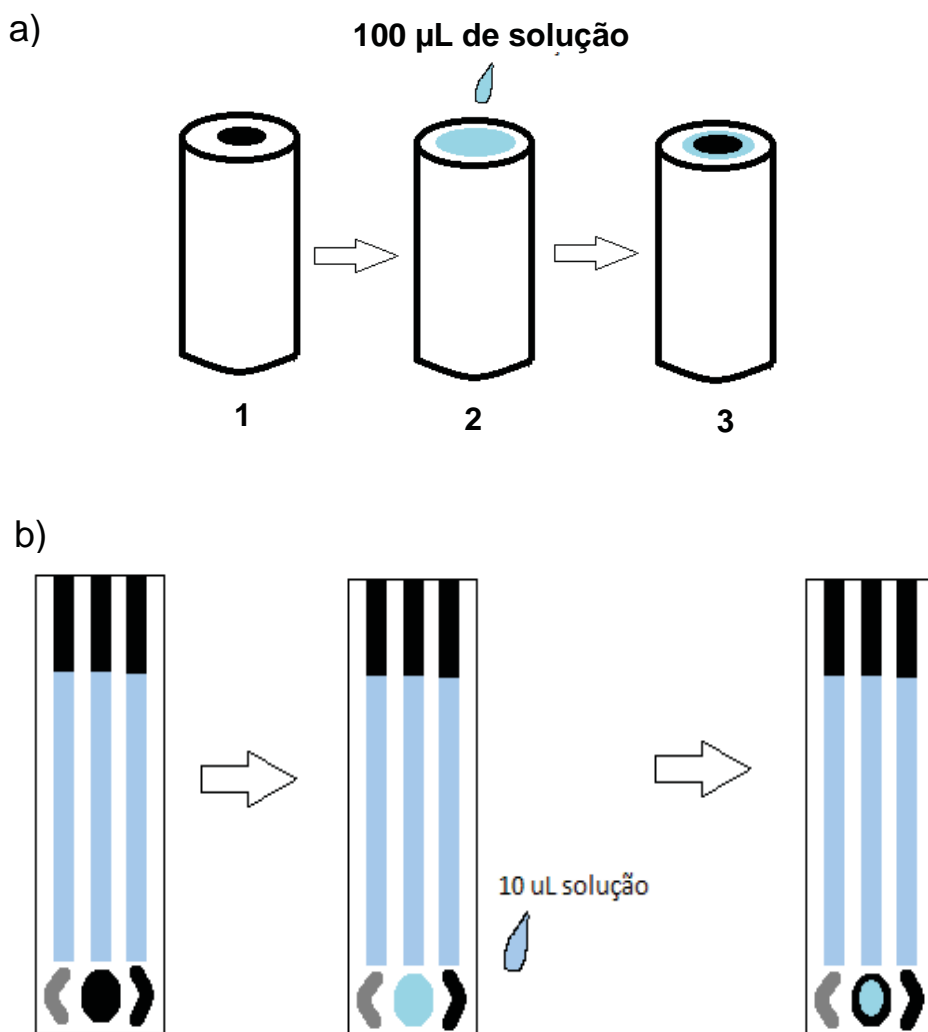


Figura 6. a) Esquema de formação da membrana de Nafion® modificada com o complexo cloreto de *tris*-2,2'-bipiridil cobre II sobre eletrodo de carbono vítreo. Etapa 1: eletrodo limpo; etapa 2: aplicação de 100 µL de solução de Nafion® + complexo de cobre; etapa 3: após 24 horas de secagem em temperatura ambiente; b) Esquema de formação da membrana de Nafion® modificada com o complexo cloreto de *tris*-2,2'-bipiridil cobre II sobre eletrodo impresso de carbono grafite (SPE). Etapa 1: eletrodo limpo; etapa 2: aplicação de 10 µL de solução de Nafion® + complexo de cobre; etapa 3: após 24 horas de secagem em temperatura ambiente.

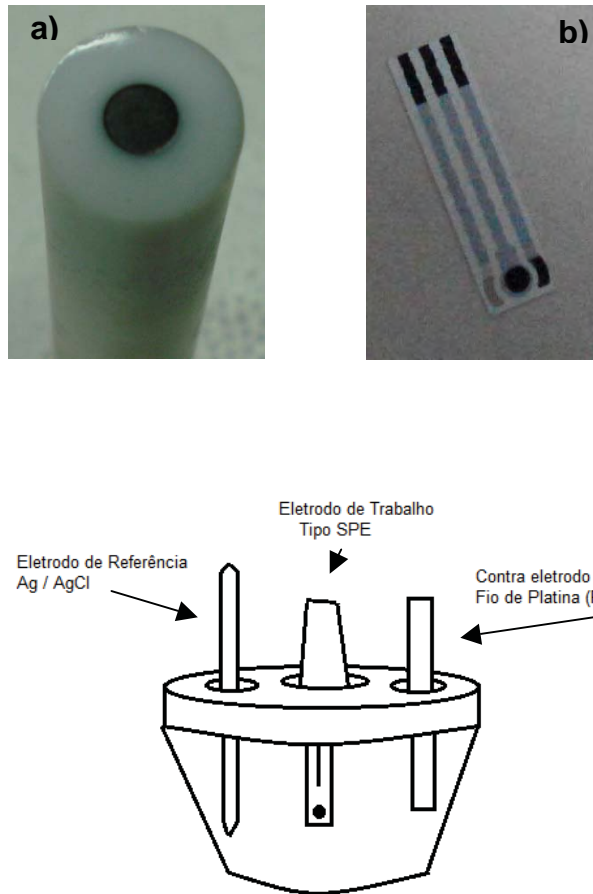


Figura 7. a) Eletrodo de carbono vítreo, sendo que o eletrodo de trabalho possui 4 mm de diâmetro; b) Eletrodo micro-impregnado de grafite com área de 4 mm de diâmetro no eletrodo de trabalho. Ambos sem modificação; c) montagem da cela eletroquímica de três eletrodos.

3.4. Medidas eletroquímicas

As medidas voltamétricas e amperométricas foram realizadas em potenciostato da marca PalmSense[®], da Palm Instruments BV (Holanda) utilizando o programa PS Lite versão 1.7.3 para leitura das voltametrias e o programa IVIUM Technologies versão 2.33 para as leituras amperométricas. Ambos os programas foram desenvolvidos pela Palm Instruments BV. O

aparelho Autolab[®] da Metrohm Instruments também foi utilizado para realizar as medidas, a fim de se avaliar a resposta do eletrodo frente a equipamentos de análise distintos. Os resultados obtidos em ambos foram semelhantes e por isso, pode-se concluir que o instrumento utilizado para a medição depende unicamente do tipo de eletrodo utilizado e não do aparelho de medição.

A realização das medidas consistia na adição de 5,00 mL de solução tampão (eletrólito) na cela eletroquímica com capacidade de 10 mL (Figura 7c), onde foi adicionado volume conhecido de uma solução padrão contendo HQ. Uma barra magnética foi inserida dentro da cela eletroquímica para que fosse possível manter agitação quando houvesse adição de analito para homogeneização da solução e que durante as análises era desativada. Para que ocorresse a agitação, um agitador magnético, modelo HI 190M da Hanna Instruments BV, foi colocado sob a cela eletroquímica.

3.5. Preparação das amostras cosméticas contendo HQ

As soluções de HQ contendo os cosméticos analisados foram preparadas calculando-se a massa necessária do creme que contém a massa adequada para preparar 10,0 mL de uma solução de HQ a $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Para isto, inicialmente, foi calculada a massa de HQ contida nos 50 g de creme (1 g), e a seguir calculando-se a massa de creme que continha 0,011 g de HQ.

Assim, uma massa de 0,55 g de creme foi pesada e diluída em água destilada. Como a amostra não é totalmente solúvel em água, antes das análises, uma etapa de filtração à vácuo em funil de Buchner com papel filtro comum foi realizada, e a solução residual foi utilizada nas análises posteriores.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização do complexo sintetizado

Para efeitos de caracterização do complexo foi empregada a técnica de Análise Elementar, a fim de verificar os teores de Cu, C, N e H. A amostra de complexo $[\text{Cu}(\text{Dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ indicou que o composto foi sintetizado adequadamente. Os valores obtidos são mostrados na Tabela 3 e são comparados com os correspondentes valores teóricos.

Tabela 3. Valores obtidos por Análise Elementar das quantidades em percentagem de Cobre, Carbono, Nitrogênio e Hidrogênio para o complexo $[\text{Cu}(\text{Dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Átomo	Valor teórico (%)	Valor experimental (%)	Erro (%)
C	49,4	54,93	10
H	4,9	3,91	- 25
N	11,5	13,07	12
Cu	8,7	9,1	4,4

4.2. Influência do complexo na modificação das superfícies eletródicas

Inicialmente, estudos voltamétricos com utilização de eletrodo de carbono vítreo (CV) foram realizados para comprovar a resposta para detecção de hidroquinona (HQ) usando-se voltametria cíclica. Os eletrodos foram

preparados com filmes de Nafion[®] dopado com o Dipy 1:3. Análises com o eletrodo sem o complexo na membrana de Nafion[®] foram realizadas também, para comparar o comportamento do sistema usando o complexo de cobre. As Figuras 8 e 9 demonstram que quando usado o complexo [Cu(dipy)₃]Cl₂.6H₂O, grandes sinais de corrente de redução são visivelmente. Adicionalmente, o perfil obtido sugere um processo eletrocatalítico, visto o grande aumento de corrente no sentido da redução na Figura 9 após adição de HQ.

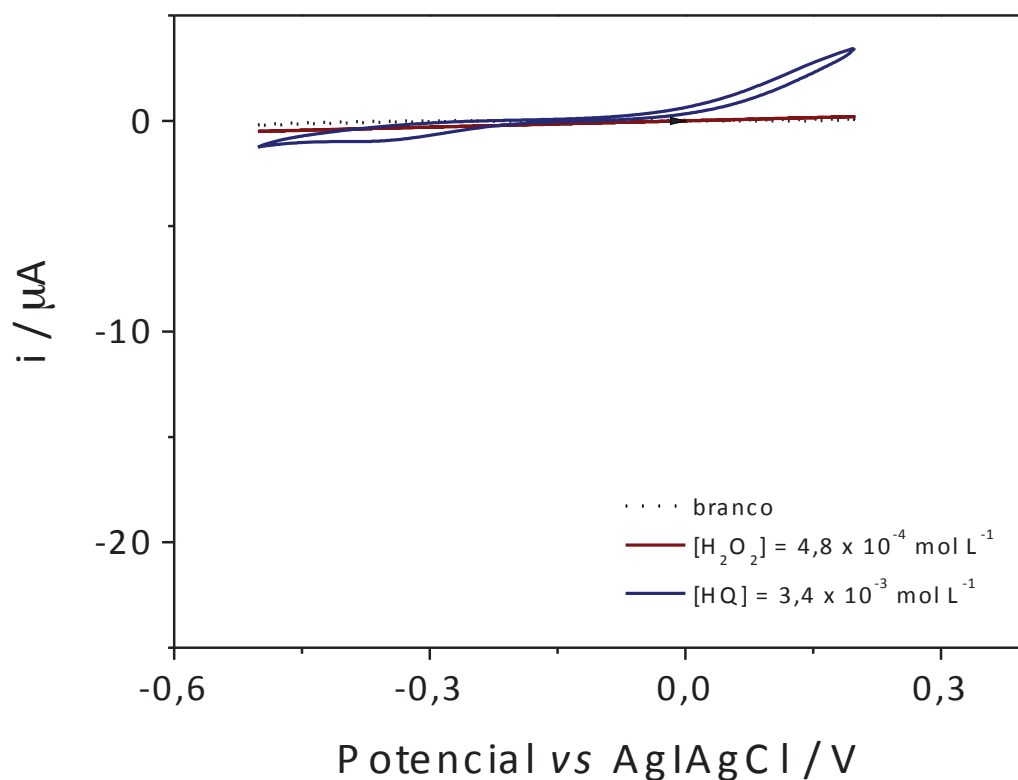


Figura 8. Voltamograma Cíclico do sensor de CV modificado somente com Nafion[®] na presença de H₂O₂ e HQ. Velocidade de varredura: 20 mV s⁻¹ e eletrólito tampão Pipes (pH 7,0) 0,01 mol L⁻¹.

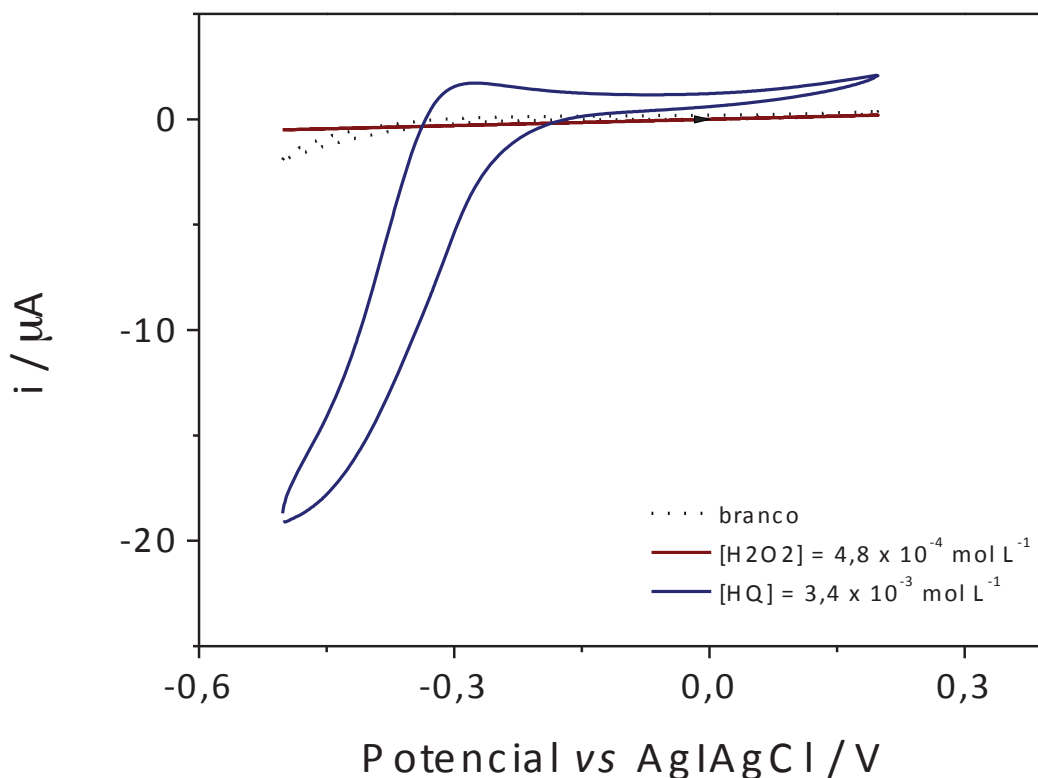


Figura 9. Voltamograma Cíclico do sensor de CV modificado com Nafion[®] dopado com o complexo $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de peróxido de hidrogênio e hidroquinona. Velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} sendo o eletrólito utilizado nas medidas Tampão Pipes $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

Mediante os resultados obtidos, pode-se concluir que o complexo promove um grande aumento na corrente de redução na presença de HQ, e desta forma, poderia ser imobilizado na superfície de eletrodos impressos (SPE), para avaliar seu comportamento.

Assim, inicialmente estudos voltamétricos com o eletrodo de grafite impresso modificado com Nafion[®] dopado com o Dipy 1:3 foram realizados. Análises com o eletrodo sem o complexo na membrana de Nafion[®] foram realizadas também, para comparar o comportamento do sensor. As Figuras 10 e 11 mostram, que quando usado o complexo $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, novamente

grandes sinais de corrente de redução são visivelmente obtidas. Mostrando a importância da presença deste composto na catálise da hidroquinona (HQ), independente do tipo do eletrodo usado como base (CV na Figura 9 e grafite na Figura 11). A Figura 11 mostra também que a resposta do sensor para HQ, é visivelmente catalítica, tal como esperado, uma vez que já é conhecida a mimetização da enzima tirosinase por este complexo cúprico [11].

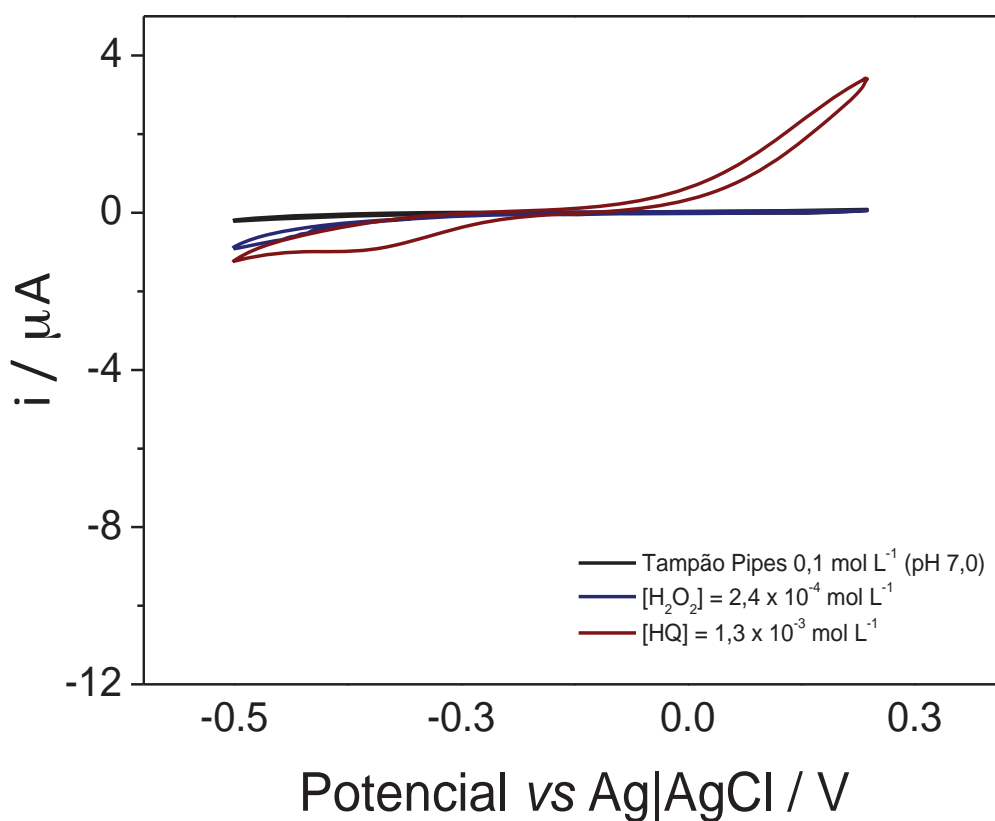


Figura 10. Voltamograma Cíclico do sensor impresso modificado somente com Nafion[®] na presença de peróxido de hidrogênio e hidroquinona. Velocidade de varredura: 20 mV s⁻¹.

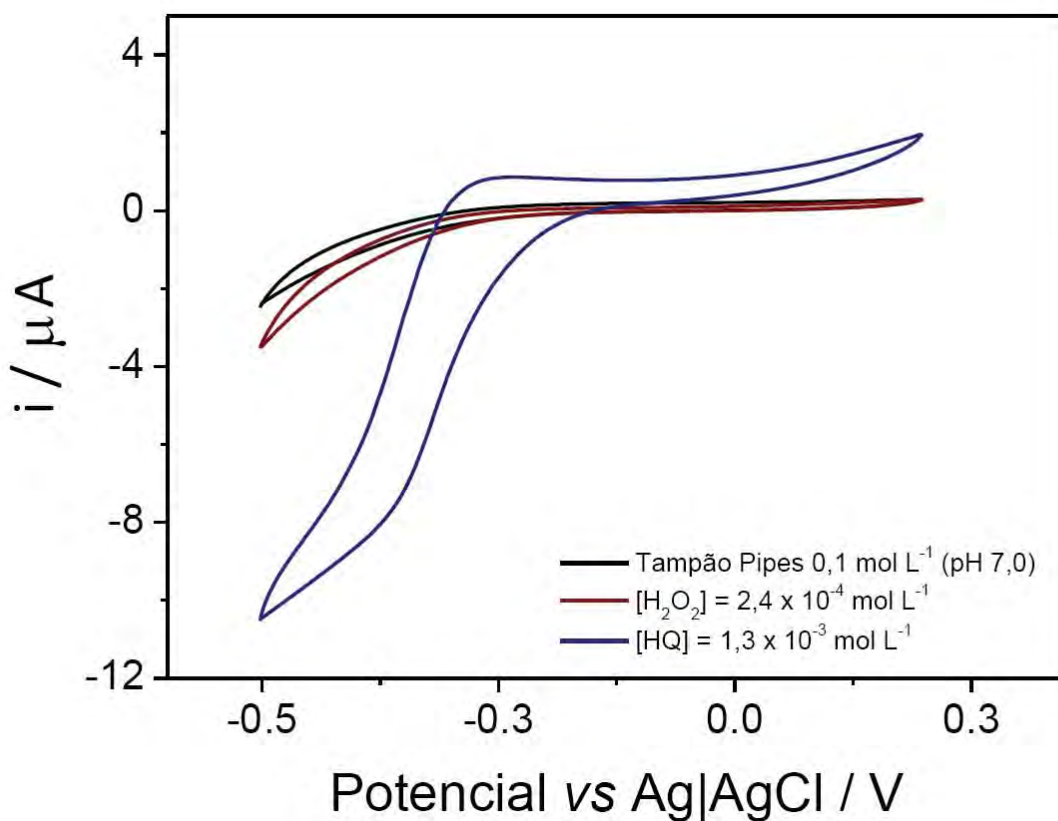


Figura 11. Voltamograma Cíclico do sensor impresso modificado com Nafion[®] dopado com o complexo $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de peróxido de hidrogênio e hidroquinona. Velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} .

A eficácia do uso do complexo de cobre nos sensores foi também avaliada pela técnica amperométrica, conforme ilustrado na Figura 12, na qual é mostrada a resposta do eletrodo impresso modificado somente com membrana de Nafion[®] e a resposta do sensor à base de membrana de Nafion[®] dopada com Dipy 1:3.

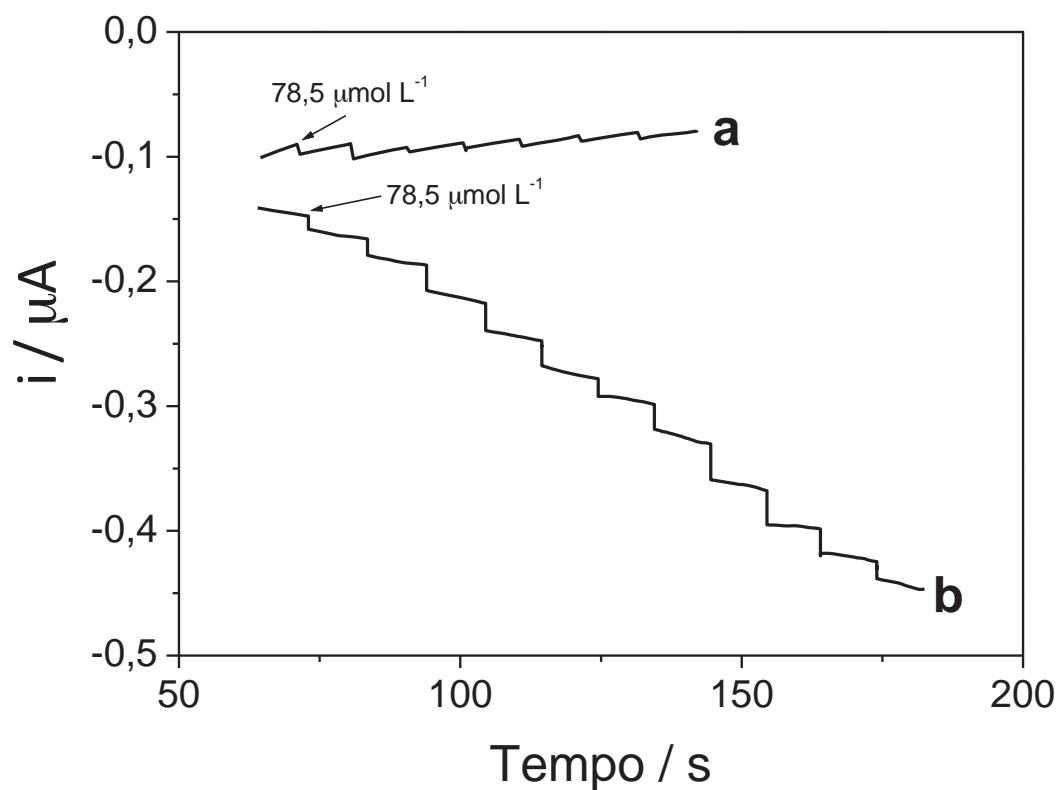


Figura 12. Estudo comparativo da dependência do uso do complexo na construção do sensor micro-impresso, através da amperometria. a) Eletrodo micro-impresso modificado somente com Nafion[®]. b) Sensor à base de Nafion[®] e complexo [Cu(dipy)₃]Cl₂.6H₂O. Medidas realizadas em tampão Pipes 0,01 mol L⁻¹ contendo 60 μmol L⁻¹ de H₂O₂ e sucessivas adições de hidroxiquinona, aplicando potencial de -100 mV.

Pelos resultados obtidos, pode-se notar que a presença do complexo Dipy 1:3 (curva b da Figura 12) gera correntes significativas em comparação com a ausência do complexo (curva a). Assim sendo, foi adotado o uso do complexo de cobre na construção do sensor biomimético usando o eletrodo impresso.

4.2.1. Estudos eletroquímicos realizados com o sensor impresso: dependência do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Em seguida, para mostrar a influência do H₂O₂ na resposta do sensor foram realizados estudos comparativos na presença e na ausência deste reagente. A Figura 13 mostra a necessidade da adição de H₂O₂ na solução de medida para a obtenção de sinal. Pode se observar que, na presença da mesma quantidade de hidroquinona, quando as medidas foram realizadas na presença de peróxido correntes de redução proporcionais à concentração de HQ foram geradas (curva a da Figura 13). Já sem adição de peróxido (curva b inserida), sinais insignificantes e com ruído, foram obtidas.

A necessidade da adição de peróxido para poder gerar a corrente de redução na presença do analito pode ser explicada devido à necessidade de formação do intermediário hidroperóxido de cobre (Cu^{II}-O-O-H), para poder realizar a oxidação da hidroquinona e subsequente re-redução da quinona para obter as correntes de redução proporcionais à [HQ} na cela de medida, segundo relatado na literatura [7,12,19].

Desta forma, em todos os experimentos subsequentes, antes das adições de HQ, sempre foi adicionado peróxido de hidrogênio na cela de medida.

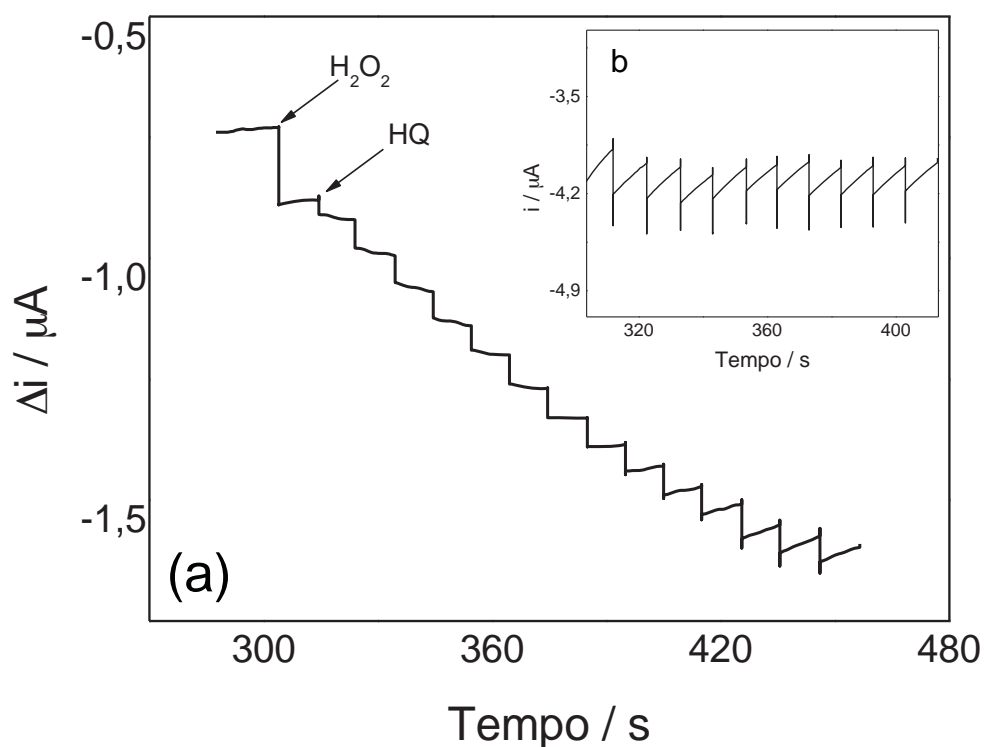


Figura 13. Influência do uso de peróxido de hidrogênio nas medidas eletroquímicas a) adição inicial de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 e sucessivas adições de $39,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de hidroquinona; b) somente adições de $39,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HQ. Medidas realizadas em solução tampão Pipes $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e aplicando potencial de -300 mV no SPE.

4.3. Otimização da resposta do sensor impresso modificado com complexo de cobre Dipy 1:3

No estudo de otimização do sensor para hidroquinona foi empregada a técnica eletroanalítica de amperometria. Nestes estudos, almejou-se escolher os parâmetros que permitissem obter maior sensibilidade, estabilidade e seletividade das medidas. Para isto, parâmetros como natureza, pH e concentração do tampão e potencial aplicado, foram otimizados.

Referente ao tampão, os resultados mostraram que em tampão Pipes na concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, foram obtidos maiores sensibilidades quando comparados com os tampões TRIS e fosfato (Tabela 4), e por isto este tampão foi usado em todos os experimentos adicionais.

Tabela 4. Dados avaliados na escolha dos parâmetros para realização das medidas eletroquímicas. Medidas realizadas em soluções tampão $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de diversos pH, contendo $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 e aplicando potencial -300 mV nos SPE.

Tampão	pH	Sensibilidade ($\mu\text{A L mol}^{-1}$)
Fosfato	5,00	96,16
Fosfato	5,50	96,93
Fosfato	6,00	94,35
Fosfato	6,50	96,20
Fosfato	7,00	95,50
Tris	7,00	89,74
Tris	8,00	90,21
Tris	8,50	89,11
Tris	9,00	91,20
Pipes	7,00	856

A Figura 14 mostra o perfil de resposta do sensor SPE em função do pH do tampão Pipes. Pode-se observar que em pH 6,5 são obtidas as melhores respostas, e este pH foi adotado para o uso deste sensor.

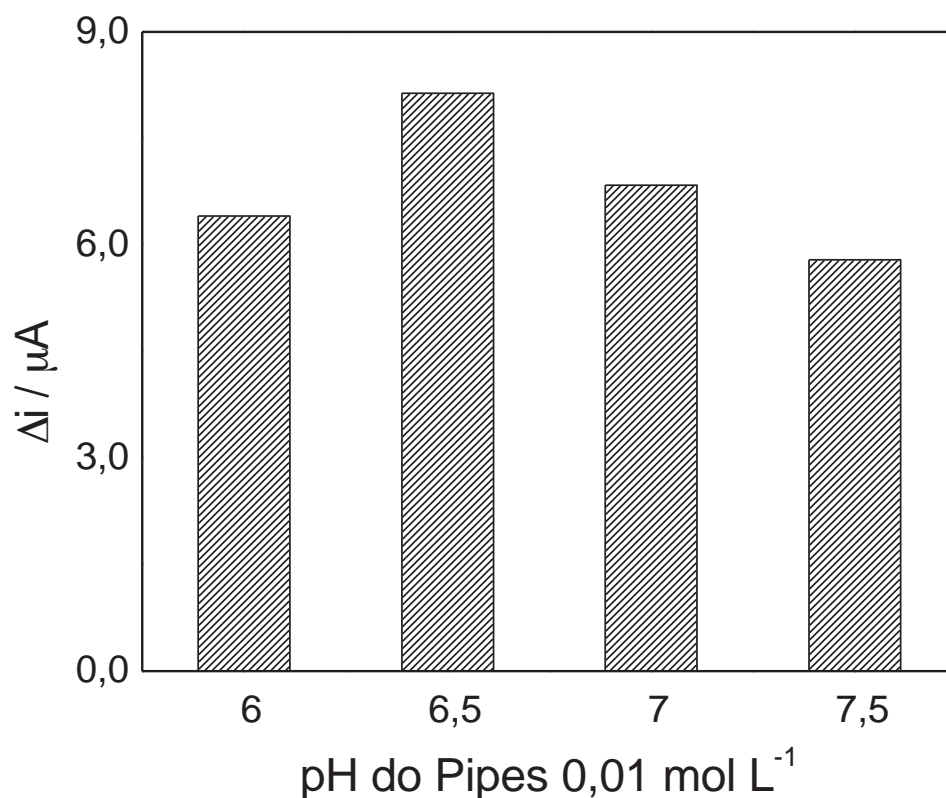


Figura 14. Perfil de resposta do sensor em função do pH do tampão Pipes na presença de $47 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 e HQ.

4.4. Perfil de resposta do sensor impresso modificado com complexo de cobre Dipy 1:3

Na Figura 15, é mostrado o perfil de resposta amperométrico para o sensor nas condições de análise previamente otimizadas. O potencial aplicado foi de -100 mV e as medidas foram realizadas em tampão Pipes $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,00) contendo $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 e sucessivas adições de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HQ.

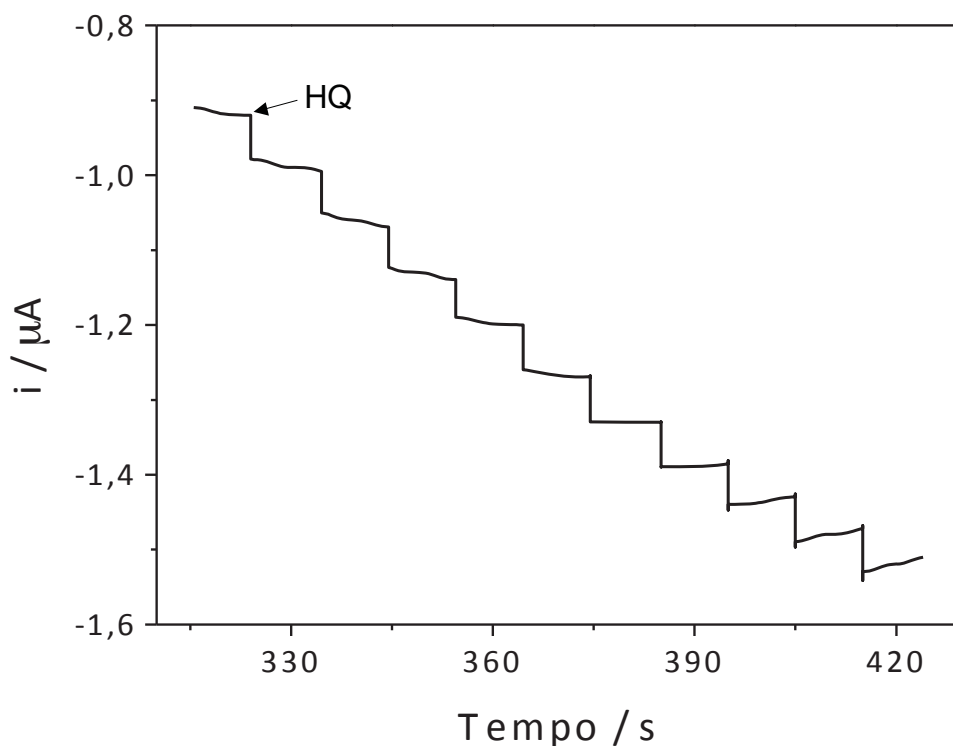


Figura 15. Cronoamperograma do sensor impresso modificado com Nafion[®] dopado com complexo $[Cu(dipy)_3]Cl_2 \cdot 6H_2O$. Medidas realizadas nas condições otimizadas.

Na Figura 16, é mostrada a correspondente curva analítica para a Figura 15. A equação que ajustou os dados dessa reta é mostrada na Equação 1, e mostra uma faixa de resposta entre $8,0 \times 10^{-5}$ e $7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

$$\Delta i / \mu A = 0,101(\pm 0,009) + 856,4(\pm 21,2)[HQ] / \text{molL}^{-1} \quad (\text{eq. 14})$$

ajustada com um coeficiente de correlação linear de 0,994.

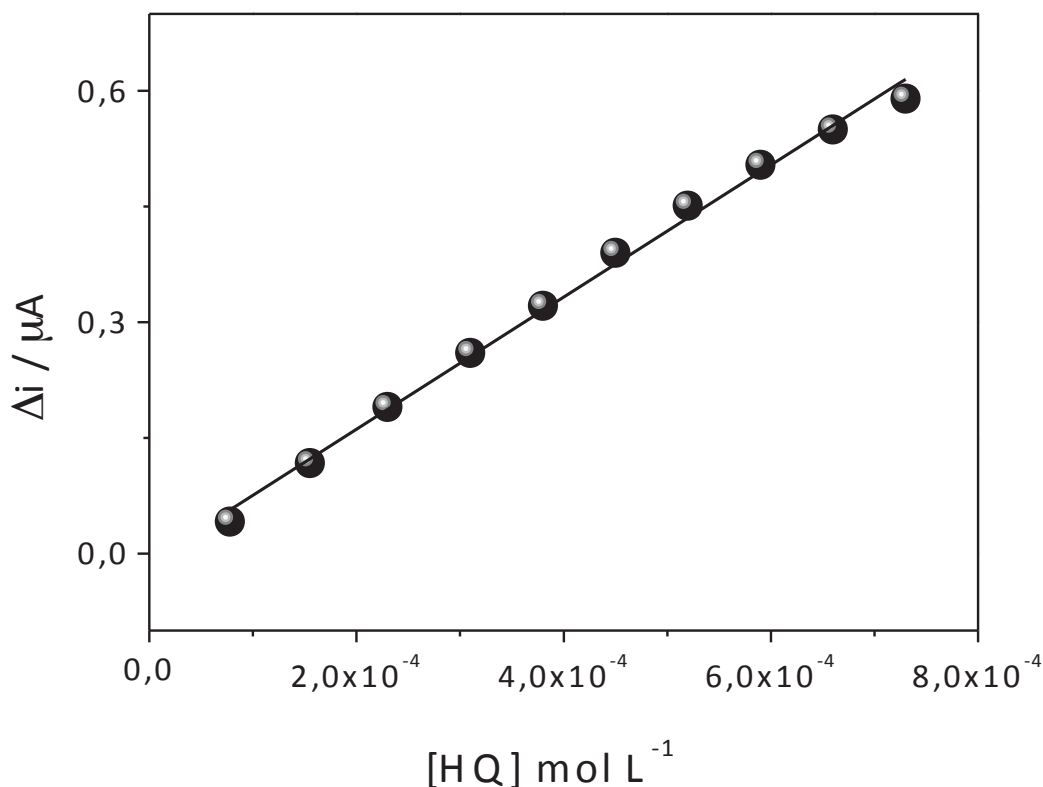


Figura 16. Curva analítica obtida através do amperograma do sensor impresso modificado com complexo $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ da Figura 15.

Entretanto, apesar de ter conseguido otimizar a resposta do sensor SPE, parâmetros como reprodutibilidade entre sensores não foram possíveis de serem avaliados, pois, após a obtenção destes resultados, problemas na repetibilidade do eletrodo impresso começaram a surgir, impossibilitando a obtenção de resultados confiáveis e sequenciais. O problema foi atribuído à visível oxidação do eletrodo de referência do SPE com o passar do tempo. Adotando-se como solução o uso de eletrodo de referência externo de $\text{Ag}|\text{AgCl}, \text{KCl}_{\text{sat}}$ obtendo-se os resultados mostrado a seguir.

4.4.1. Uso do eletrodo impresso (SPE) acoplado a eletrodos de referência e contra-eletrodo externos

Visando minimizar o ruído e a pouca reprodutibilidade entre sensores, decorrente da “perda” na estabilidade do conjunto SPE comercialmente

disponível, este foi desmembrado, conforme ilustrado na Figura 17a. Após ter o eletrodo de trabalho separado do eletrodo de referência e contra-eletrodo com o auxílio de uma tesoura, este foi acoplado a eletrodo referência $\text{Ag}|\text{AgCl}, \text{KCl}_{\text{sat}}$ (Analion[®]) e contra eletrodo de espiral de platina (Figura 17b).

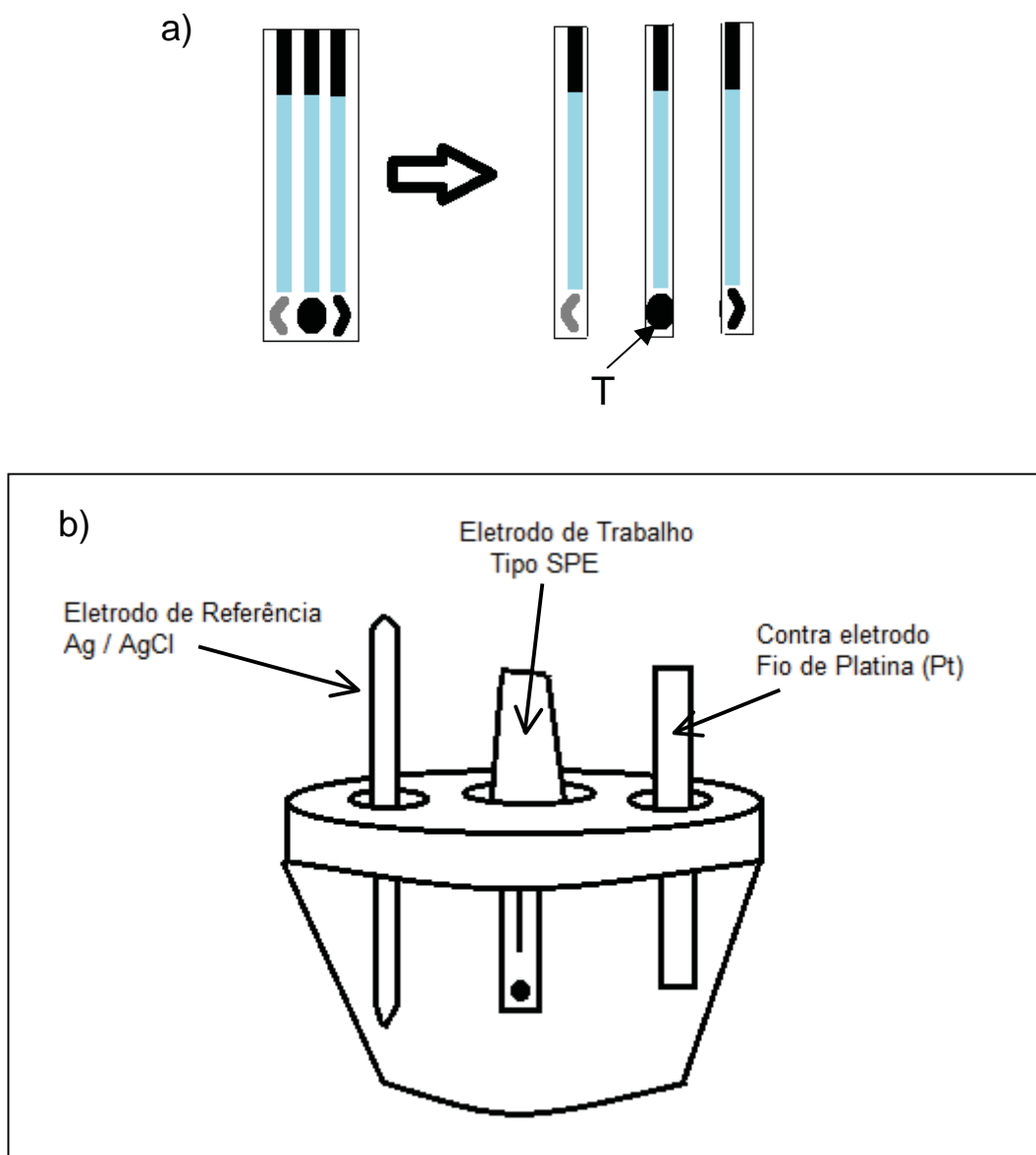


Figura 17. a) Retirada do eletrodo de trabalho de grafite do eletrodo impresso, com auxílio de uma tesoura. T: Eletrodo de trabalho de grafite. b) cela eletroquímica acoplada com eletrodos de trabalho impresso; referência Ag/AgCl e contra eletrodo de platina.

Assim sendo, voltametrias foram realizadas em tampão Pipes pH = 6,50, segundo os parâmetros de otimização relatados anteriormente, para avaliar o perfil de resposta do sensor acoplado aos eletrodos externos. O potencial estudado foi entre -0,5 V e 0,8 V e velocidade de varredura 20 mV s⁻¹. O perfil obtido foi satisfatório, análogo ao perfil obtido com o sistema de eletrodos impressos SPE anteriormente descritos. O resultado obtido está ilustrado na Figura 18.

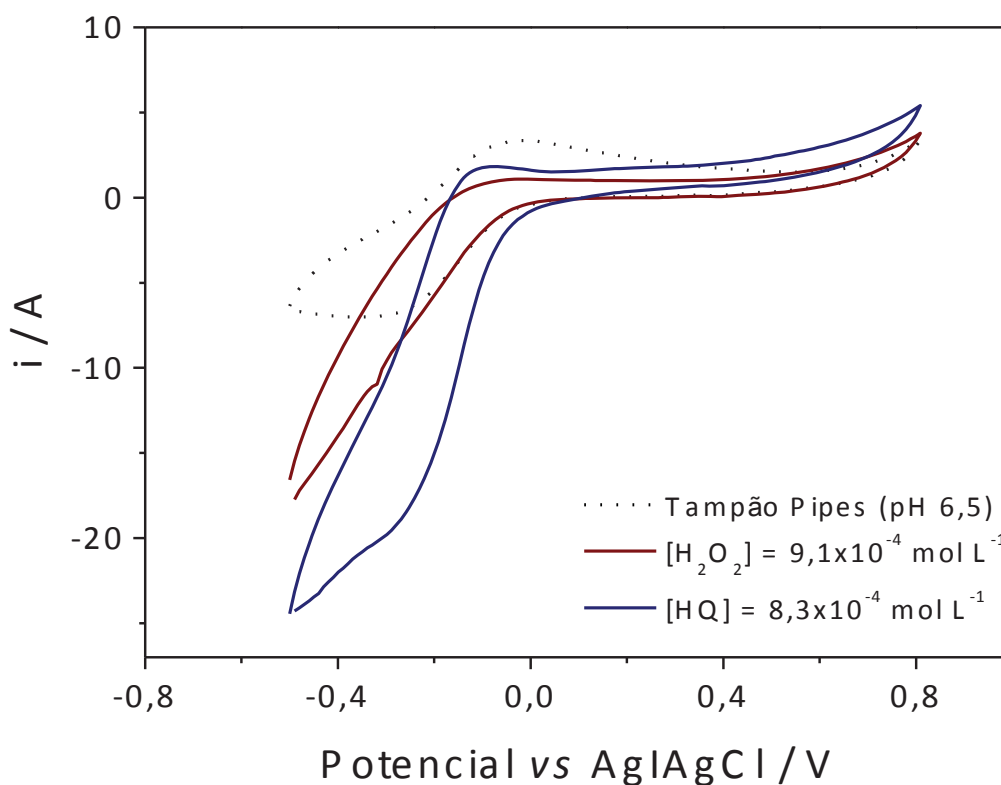


Figura 18. Voltamograma cíclico usando eletrodo de trabalho micro-impresso de grafite acoplado a eletrodo referência externo de Ag|AgCl,KCl_{sat} e contra eletrodo de Pt.

Em sequência, medidas de corrente em função do tempo foram realizadas em tampão Pipes 0,01 mol L⁻¹ (pH 6,5) com a primeira adição de 60 μmol L⁻¹ de H₂O₂ e de sucessivas adições de 60 μmol L⁻¹ HQ, em potencial aplicado de -300 mV. O resultado obtido encontra-se na Figura 19.

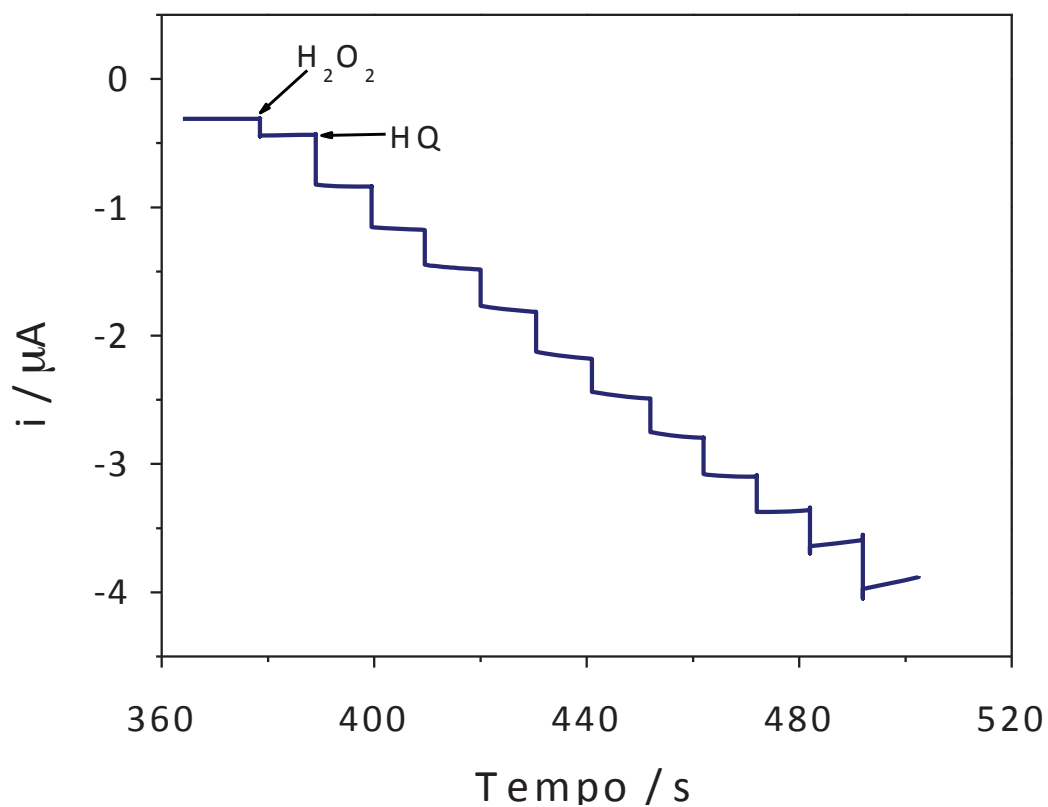


Figura 19. Amperograma do sensor impresso isolado do SPE e acoplado a eletrodo de referência externo.

O perfil de resposta mostra o ganho obtido na corrente de redução e desta forma na sensibilidade, ao separar o eletrodo de trabalho do SPE e usar um eletrodo de referencia comercial.

A curva analítica para a Figura 19 é mostrada na Figura 20. A equação matemática mostrada em eq. 15 mostrou-se linear na faixa entre $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

$$\Delta i / \mu A = 0,084(\pm 0,026) + 5594(\pm 73)[HQ] / \text{molL}^{-1} \quad (\text{eq. 15})$$

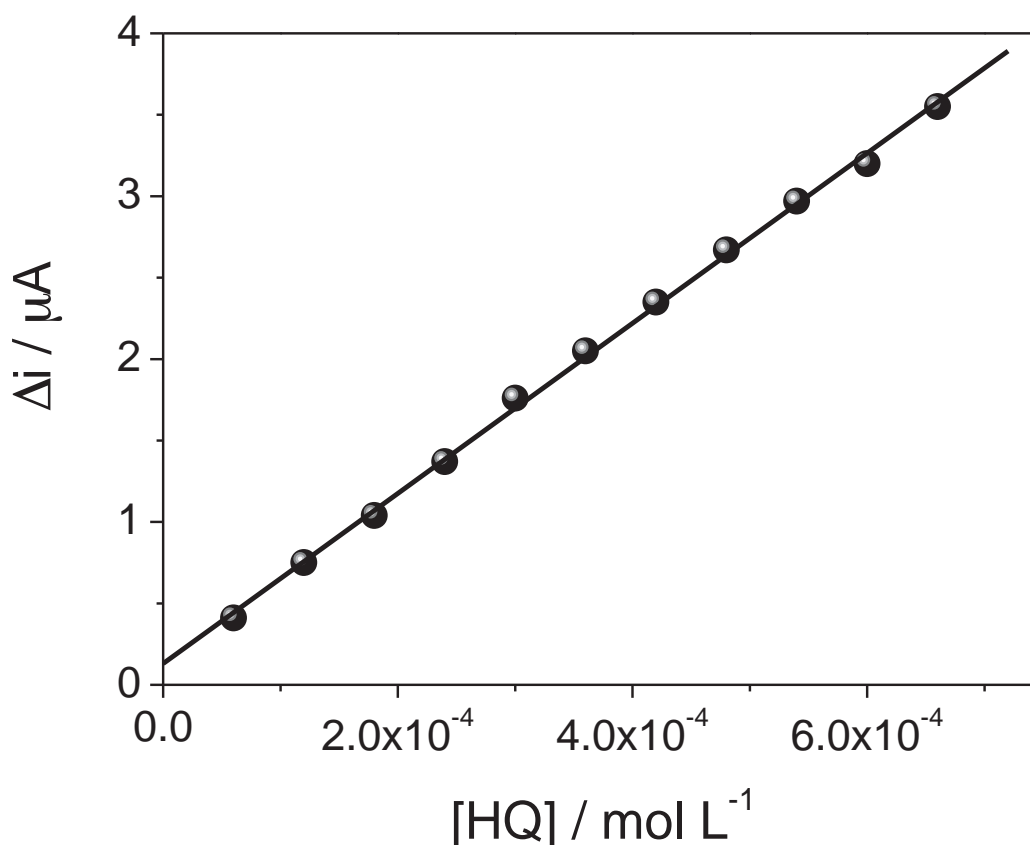


Figura 20. Curva analítica obtida através do amperograma do sensor impresso de trabalho isolado do conjunto de SPEs, e modificado com complexo [Cu(dipy)₃]Cl₂.6H₂O.

4.4.1.1. Parâmetros analíticos do sensor-SPE acoplado a eletrodo de referência externo

Os cálculos de repetibilidade das medidas por amperometria através do eletrodo impresso de grafite modificado com Nafion[®]/Dipy 1:3, foi realizado obtendo-se resultados em triplicata, de modo a obterem-se curvas distintas e três valores de sensibilidade correspondentes a cada uma delas. A repetibilidade do eletrodo mediante esses resultados da sensibilidade foram avaliados através do cálculo do Desvio Padrão Relativo (RSD), cujo valor foi de 3,0%, indicando que o eletrodo se aplica para uso por mais de uma vez.

Para cálculo da reprodutibilidade na construção dos sensores, foram avaliados três sensores construídos em diferentes dias e calculado o valor de RSD para as curvas analíticas obtidas, sendo de 2,3%. Este valor indica que os sensores impressos usados neste trabalho são altamente reprodutíveis, garantindo seu uso em sistemas descartáveis sem comprometimento da qualidade dos resultados obtidos. Cabe ressaltar que estes resultados foram obtidos somente após ter isolado o eletrodo de grafite dos outros componentes do sistema de SPE.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as normas previstas pela ANVISA [71] onde se tem que o limite de detecção (LD) é dado pela equação 3:

$$LD = \frac{3x\sigma_a}{IC} \quad (eq. 16)$$

Onde; IC é a inclinação da curva de calibração, e σ_a corresponde ao desvio padrão da média do coeficiente linear calculado para várias curvas analíticas. Assim, obteve-se o valor para o Limite de Detecção de $5,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

O limite de quantificação (LQ) foi calculado baseado também nas normas da ANVISA e consiste em $3,3 \times LD$. Portanto, calculou-se um valor de $1,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para este parâmetro.

Assim, iniciaram-se estudos para avaliar o tempo de vida do eletrodo. Para isto, a resposta do sensor foi monitorada por alguns dias, e o gráfico da Figura 21, mostra o perfil de resposta do tempo de vida do sensor impresso modificado com Nafion®/Dipy.

Cabe ressaltar que no primeiro dia o sensor apresentou uma boa repetibilidade e estabilidade entre as medidas. Entre o 3º e 5º dia o valor da sensibilidade se manteve praticamente constante e correspondente a um valor de 50% do valor inicial. Já para o 7º dia a resposta do sensor é apenas 25% do valor inicial. A pesar destes resultados, como o sensor apresenta-se bastante reprodutível na preparação, a aplicação do mesmo, será preferencialmente para uso descartável.

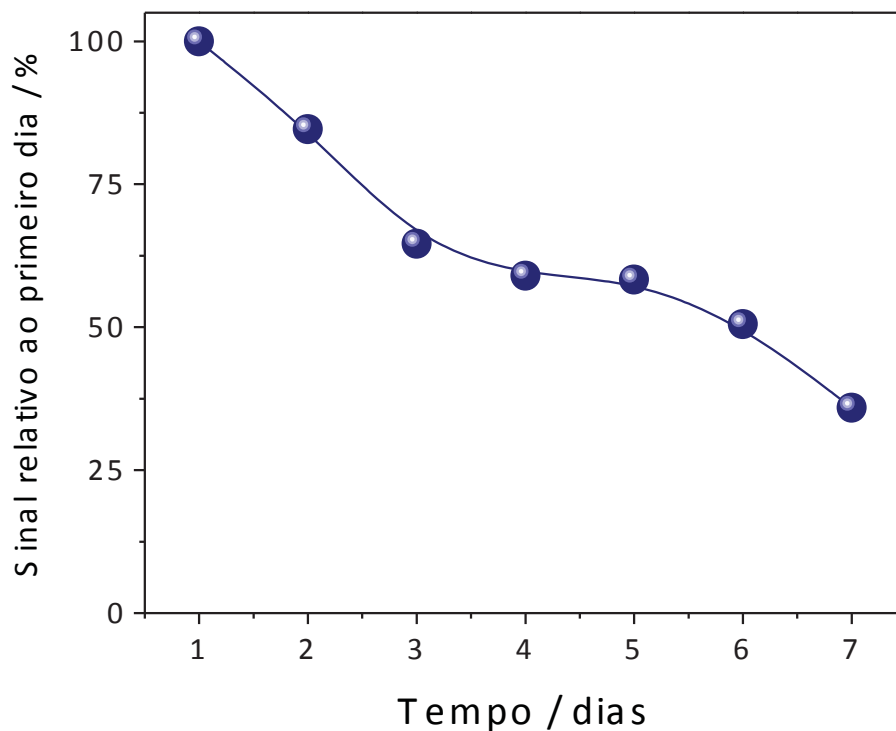


Figura 21. Perfil da variação da resposta do sensor impresso de grafite à base de membrana de Nafion[®] dopada com Dipy 1:3 acoplado a eletrodos de referência e contra-eletrodo externos, em um período de sete dias de uso consecutivos.

4.5. Caracterização do perfil biomimético do sensor impresso à base de Nafion[®] dopado com Dipy 1:3: Estudos de biomimeticidade

4.5.1. Cálculo da constante aparente de Michaelis-Menten

$$(K_{MM}^{app})$$

Partindo da premissa que, se o mecanismo de reação do complexo de cobre é análogo ao da enzima tirosinase, ao se traçar uma curva segundo os conceitos propostos por Michaelis-Menten um perfil característico de resposta

enzimático será observado. Para obter tais dados, o perfil hiperbólico da resposta do sensor para HQ, foi investigado plotando sinais de corrente até a região da saturação do sensor (Figura 22), e a seguir construindo o gráfico correspondente mostrado na Figura 23.

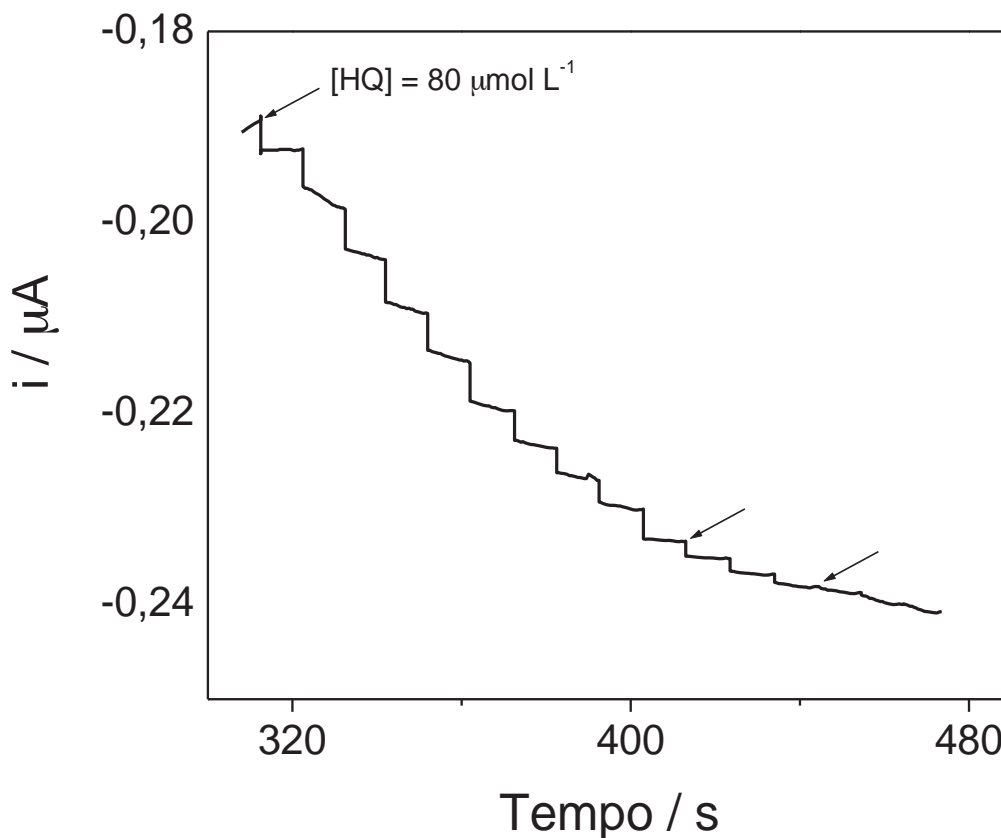


Figura 22. Perfil amperométrico completo (até saturação). Potencial aplicado de -300 mV e adição inicial de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e sucessivas adições de $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HQ.

Como pode ser observado o perfil da resposta do sensor se encaixa perfeitamente em um perfil hiperbólico, tal como esperado e analogamente ao que ocorre em sistemas enzimáticos convencionais e em outros sistemas biomiméticos também.

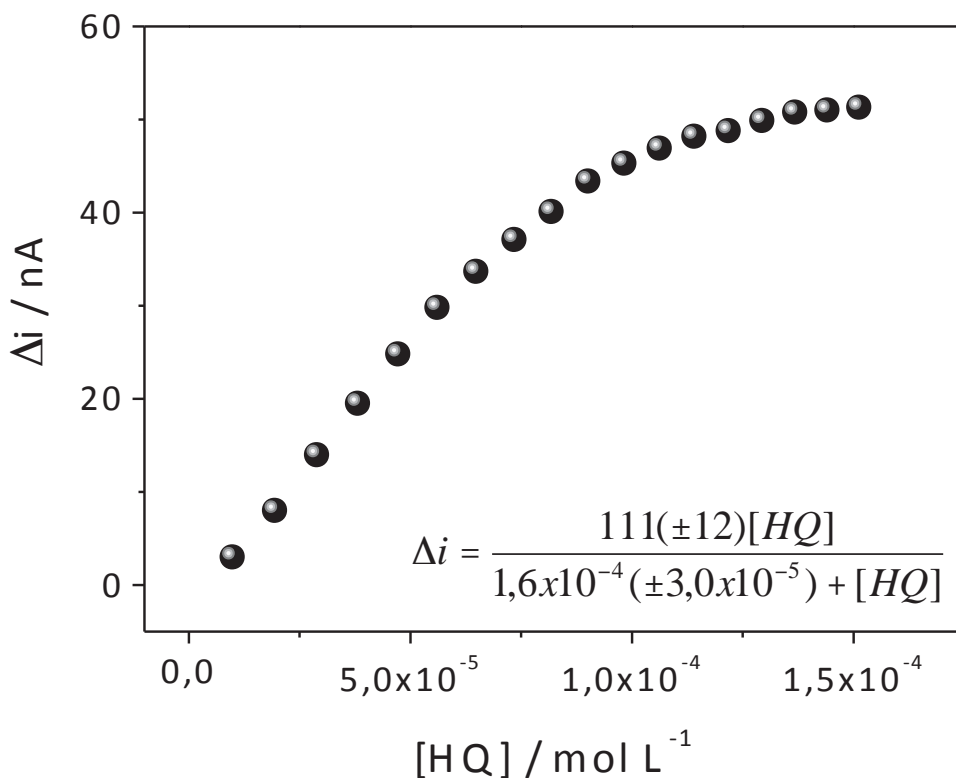


Figura 23. Gráfico da curva de Michaelis-Menten obtido a partir da cronoamperometria da Figura 22.

A partir da Figura 23, pode ser plotado o gráfico do duplo recíproco (Figura 24) para linearizar a hipérbole e desta forma calcular o valor da K_{MM}^{app} e desta forma ter uma ideia da afinidade do complexo de cobre Dipy 1:3 pela HQ.

A equação da reta que foi ajustada com os dados mostrados na Figura 24, pode ser expressa em termos da K_{MM}^{app} , e da corrente máxima de redução (i_{max}), que é proporcional à velocidade máxima da reação, tal como mostrado a seguir na equação 17.

$$\frac{1}{\Delta i} = \frac{1}{\Delta i_{max}} + \frac{K_{MM}^{app}}{\Delta i_{max}} \frac{1}{[HQ]} \quad (eq.17)$$

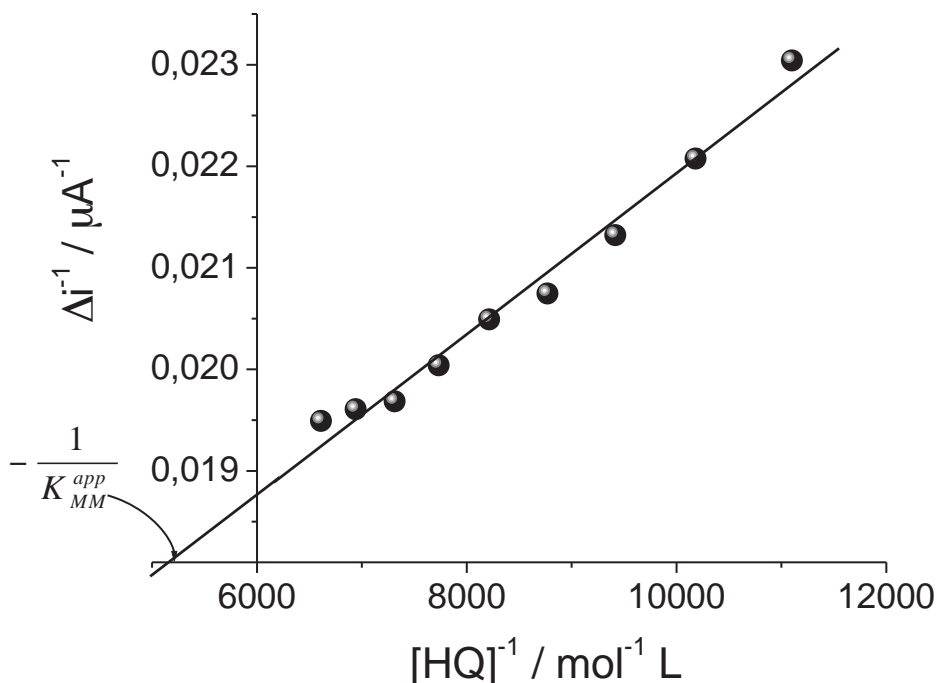


Figura 24. Gráfico do duplo recíproco, que permitiu calcular o valor da constante aparente de Michaelis-Menten, do sensor para hidroquinona.

Os dados plotados na Figura 24 foram ajustados à reta da equação 18, com um coeficiente de correlação linear de 0,991. Obtendo-se um valor para a K_{MM}^{app} de $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Indicando uma alta afinidade do complexo pela HQ.

$$\frac{1}{\Delta i} = 1,4 \times 10^{-2} (\pm 5,1 \times 10^{-4}) + 7,9 \times 10^{-7} (\pm 4,1 \times 10^{-8}) \frac{1}{[HQ]} \quad (\text{eq. 18})$$

4.5.2. Seletividade do sensor

A seletividade do sensor impresso de grafite modificado com Dipy 1:3 foi estudado. O analito alvo é a hidroquinona, composto pertencente à classe dos fenóis; assim sendo, compostos com estrutura análoga foram avaliados para

realização do teste de seletividade do sensor. Soluções estoque de concentração $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas a partir dos seguintes compostos: catecol, resorcinol, *p*-aminofenol, 3,5-diclorofenol e paracetamol. As fórmulas estruturais destes compostos estão representadas na Figura 25.

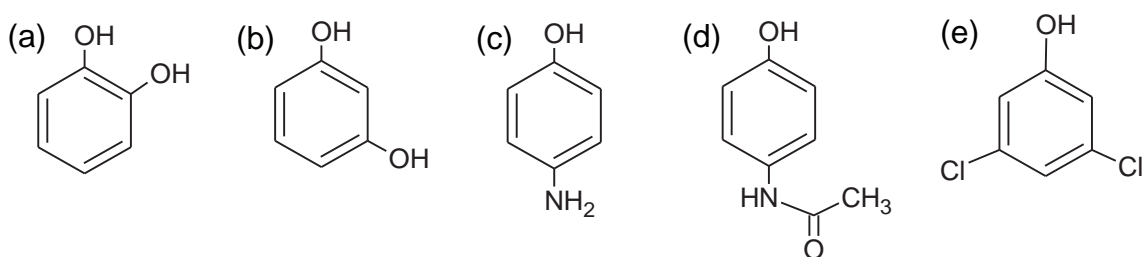


Figura 25. Fórmulas estruturais dos compostos a) catecol; b) resorcinol; c) *p*-aminofenol; d) paracetamol; e) 3,5-diclorofenol.

Amperometrias em meio de tampão Pipes $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) foram realizadas adicionando-se $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 e sucessivas adições de $30 \mu\text{L}$ da solução estoque de cada um dos compostos em estudo em $5,0 \text{ mL}$ de eletrólito (Pipes).

Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 5, e mostram que o sensor impresso de grafite é sensível à HQ e a *p*-aminofenol, provavelmente pela presença de dois grupos ricos em elétrons presentes em sua molécula. Contudo, observando a diferença de sensibilidade para HQ e *p*-aminofenol (Figura 26), este composto não apresentará interferência na quantificação da HQ.

Tabela 5. Compostos fenólicos utilizados nos testes de seletividade em meio de tampão Pipes 0,01 mol L⁻¹(pH 7,0) aplicando potencial de -300 mV.

Analito	Sinal Analítico
Catecol	Não
Resorcinol	Não
p-aminofenol	Sim
3,5-diclorofenol	Não
Paracetamol	Não

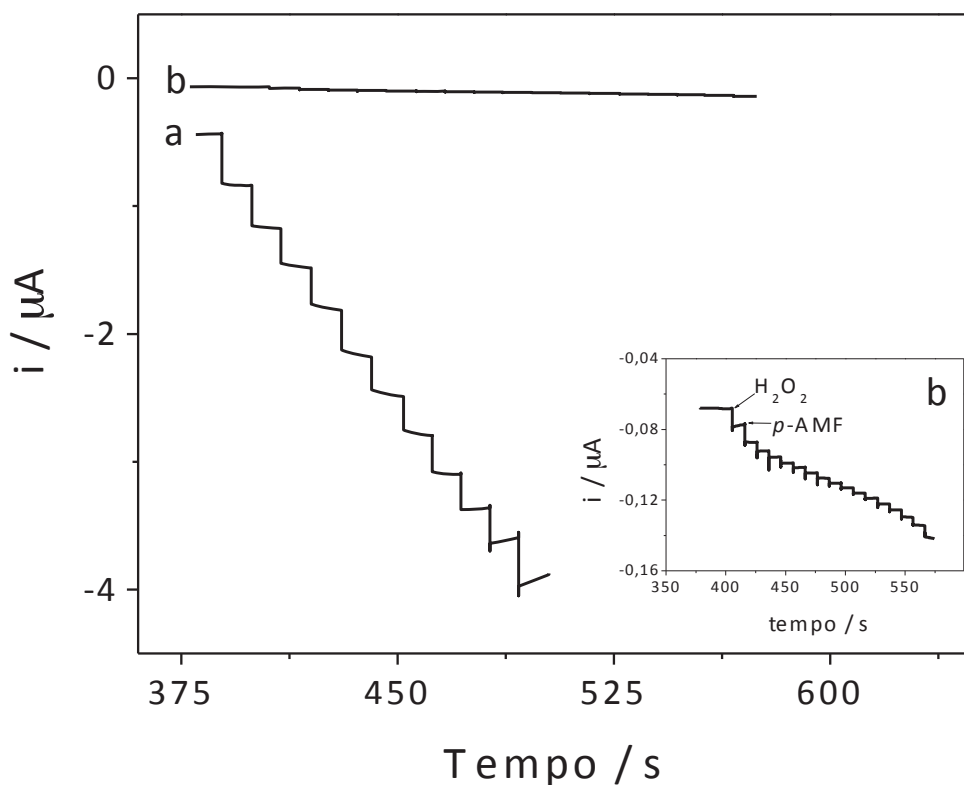


Figura 26. Perfil da seletividade do sensor: a) resposta para HQ e b) resposta para *p*-aminofenol (*p*-AMF). Na figura inserida mostra-se amplificada a resposta para *p*-AMF. Medidas realizadas em potencial de -300 mV em solução tampão pipes contendo 60 μmol L⁻¹ de H₂O₂ e sucessivas adições de 60 μmol L⁻¹ de analito.

Já para os outros compostos fenólicos estudados (paracetamol e 3,5, diclorofenol) e difenólicos em posições *orto* (catecol) e *meta* (resorcinol) o sensor não apresentou nenhuma resposta, mesmo sendo, estes últimos, compostos isoméricos da HQ.

Assim, o sensor aqui mostrado oferece uma alta seletividade para identificação de HQ, mesmo na presença de outros compostos com estrutura análoga.

4.5.3. Caracterização do sistema sensor através de estudos voltamétricos

No intuito de avaliar as características deste sistema biomimético como reversibilidade e outros aspectos mecanísticos. Foi realizado um estudo voltamétrico em várias velocidades de varredura, partindo-se da velocidade de 2 mV s^{-1} até 1000 mV s^{-1} , em uma faixa de potencial de -500 mV a 800 mV . O resultado é ilustrado na Figura 27.

A partir das voltametrias cíclicas apresentadas na Figura 27 foi possível construir o gráfico mostrado na Figura 29, de corrente de pico catódico (i_{pc}) vs $v^{1/2}$. Para isto, na Figura 28, é mostrada, a maneira de exemplo, o pico de redução obtido na velocidade de varredura (v) de 2 mV s^{-1} .

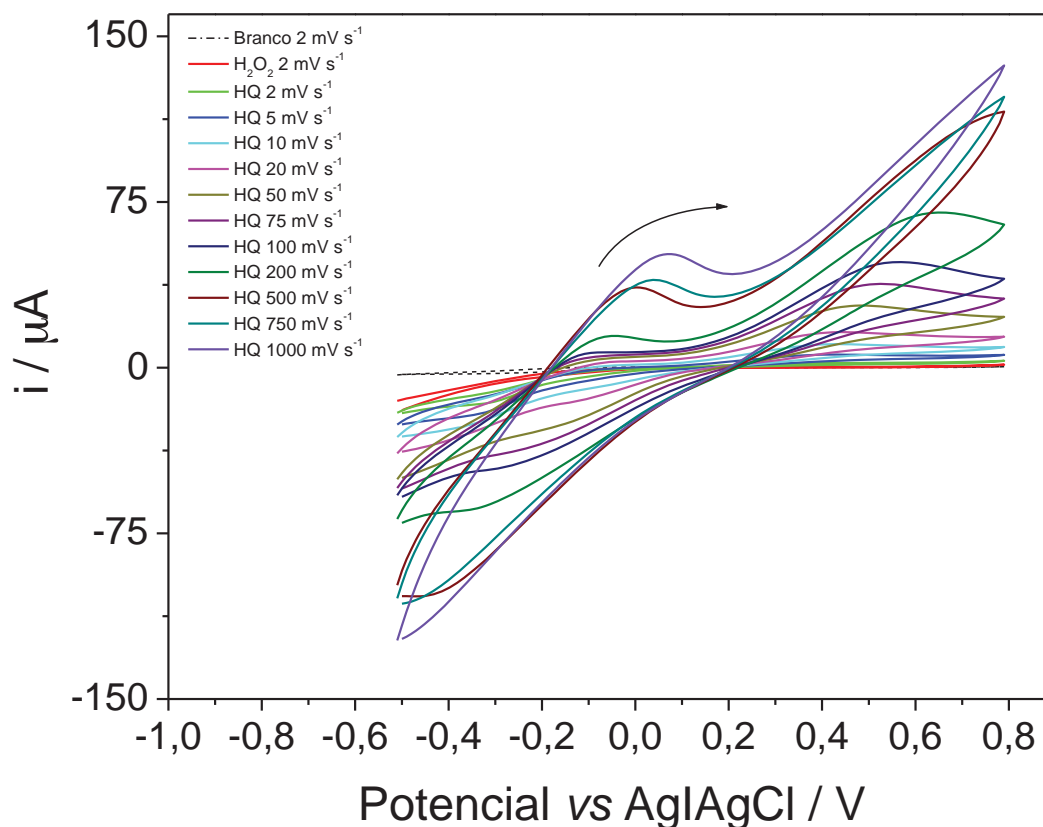


Figura 27. Voltamogramas cíclicos registrados em diferentes velocidades de varredura obtidos com o sensor impresso de grafite modificado com o complexo $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Medidas realizadas em solução tampão Pipes $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona. A velocidade de varredura para o branco, adição de H_2O_2 $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ e primeira adição de HQ $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ foi de 2 mV s^{-1} ; após a adição de HQ foi aumentada a velocidade de varredura (v), seguindo a ordem de 5 a 1000 mV s^{-1} .

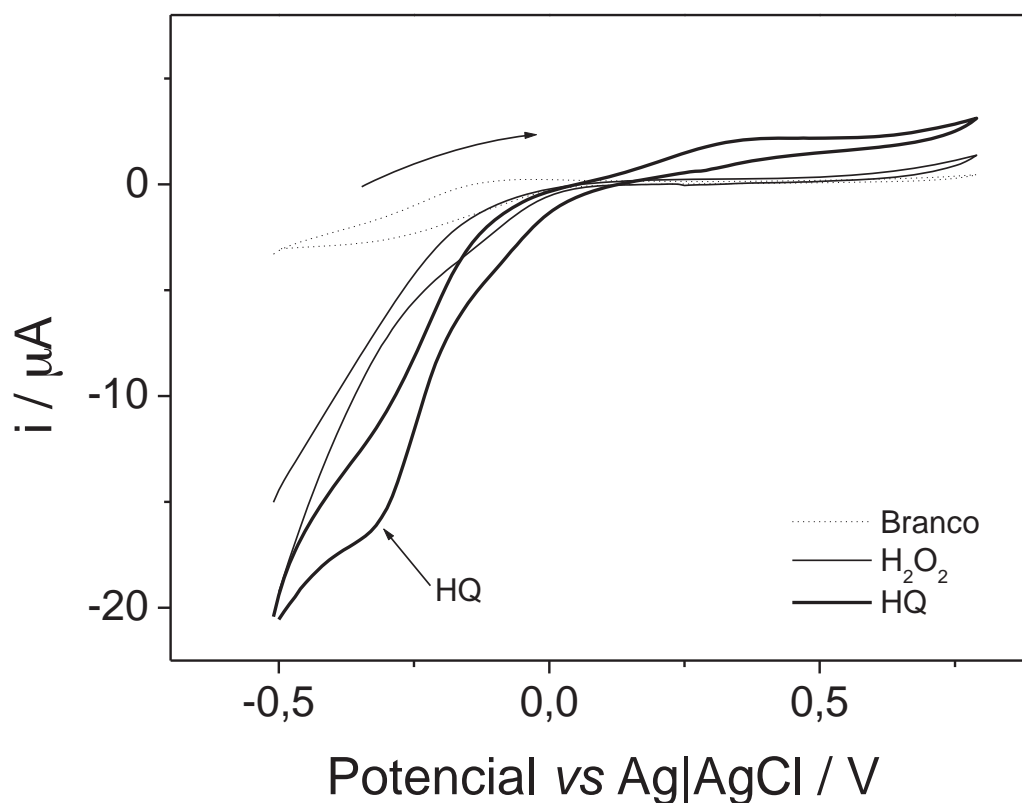


Figura 28. Voltamogramas cíclicos registrados na velocidade de varredura de 2 mV s^{-1} , indicando o pico de redução usado para a construção do gráfico da Figura 29.

A Figura 29 mostra um perfil linear de resposta, tal como esperado, desde que o perfil voltamétrico do sensor sugere um comportamento catalítico (Figuras 18 e 28). Sendo conhecido que um sistema catalítico comporta-se como um sistema eletroquímico controlado por difusão o qual é perfeitamente mostrado na Figura 29 [72].

A equação da reta que ajusta os dados da Figura 29 ($R=0,9966$) é dada por:

$$i_{pc} = -11,63(\pm 0,73) + 3,43(\pm 0,07)v^{1/2} \quad (\text{eq. 19})$$

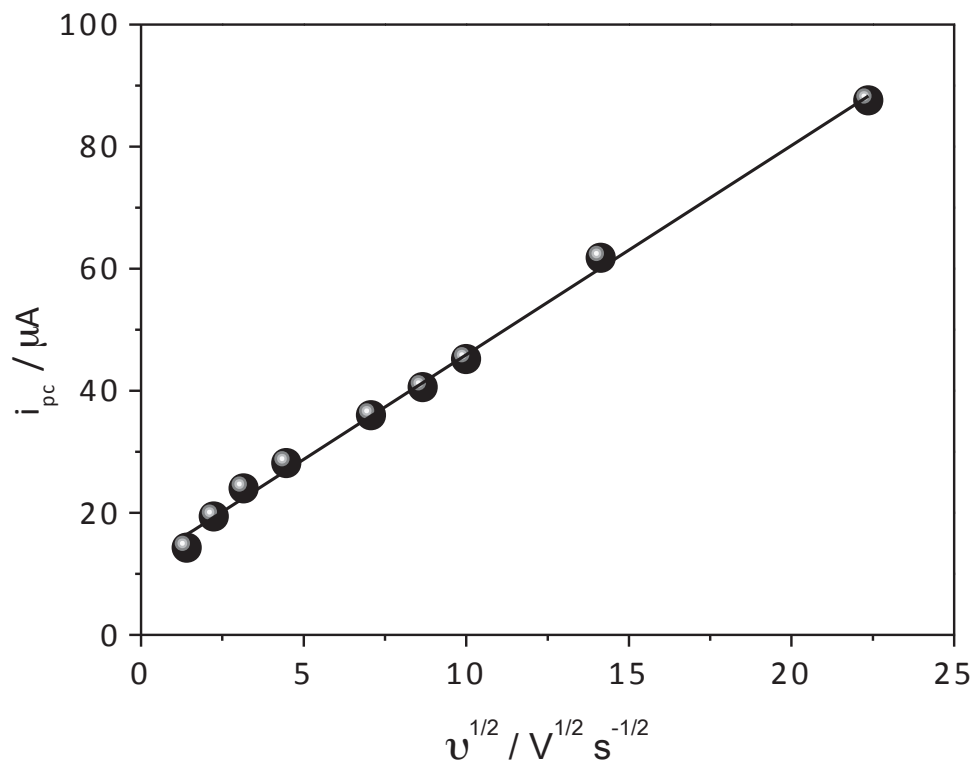


Figura 29. Variação da corrente de pico catódica (i_{pc}) vs $v^{1/2}$ no sensor micro-impresso modificado com o complexo $[Cu(dipy)_3]Cl_2 \cdot 6H_2O$. Gráfico obtido a partir do Gráfico ilustrado na Figura 27.

Pelos resultados obtidos no perfil hiperbólico de resposta do sensor, pelo valor calculado para a constante aparente de Michaelis-Menten, pela seletividade mostrada pelo sensor, e pelo perfil característico de um sistema catalítico, pode-se sugerir e/ou comprovar que o complexo Dipy 1:3 mimetiza a enzima tirosinase, e desta forma o sensor impresso de grafite para detecção de HQ pode ser considerado como sendo um sensor biomimético.

4.6. Aplicação do sensor em amostras farmacêuticas

Finalmente, os SPE-modificados foram aplicados na detecção de hidroquinona em amostras cosméticas, no intuito de corroborar a eficácia do sensor construído. Assim, amostras de cremes contendo HQ em sua formulação foram avaliadas neste trabalho.

A metodologia adotada para a determinação de Hidroquinona nas formulações foi a de adição de padrão, e a formulação escolhida para analisar o teor de HQ foi o cosmético de aplicação tópica em forma de gel-creme com ação clareadora de manchas da pele.

Uma das amostras foi preparada em farmácia magistral localizada em Araraquara / SP, e que por solicitação dos autores deste trabalho deveria conter exatamente 2,0% de Hidroquinona (m/m) em cada 50 g de creme. Esta amostra foi preparada tal como descrito na parte experimental para obter uma solução $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de HQ, a qual foi empregada na análise amperométrica mostrada na Figura 30. Nesta curva a primeira adição corresponde ao peróxido de hidrogênio, a segunda adição corresponde à solução cosmética anteriormente preparada em concentração na cela de medida de $3,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, e a seguir adições sucessivas de solução padrão de hidroquinona.

O perfil de resposta obtido para a curva de adição de padrão é mostrado na Figura 31. A equação da reta ajustada para esta curva analítica, com coeficiente de relação linear $R = 0,9986$, é:

$$\Delta i = 2,7(\pm 0,3) + 92.505(\pm 2470)[HQ]_{\text{padrão}} \quad (\text{eq. 20})$$

Com base nesta curva foi calculada uma concentração para a amostra na cela de medida de $2,92 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, muito próximo ao valor esperado. Por outro lado observa-se na Figura 30 que o sensor não apresentou efeito de matriz. Este resultado tinha sido previamente observado quando um placebo da formulação cosmética magistral foi analisado usando o sensor proposto, e nenhuma resposta foi observada, uma vez que o placebo estava isento de HQ.

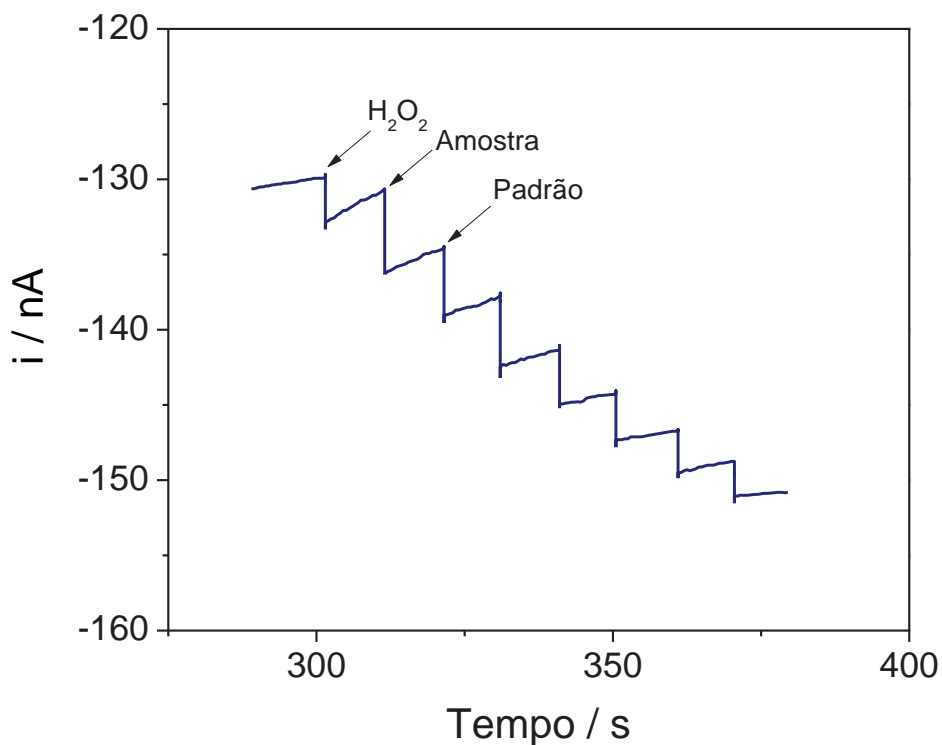


Figura 30. Amperometria obtida para a análise por adição de padrão da amostra magistral analisada. Na cela de medida $[\text{H}_2\text{O}_2] = [\text{HQ}]_{\text{AM}} = [\text{HQ}]_{\text{P}} = 3,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

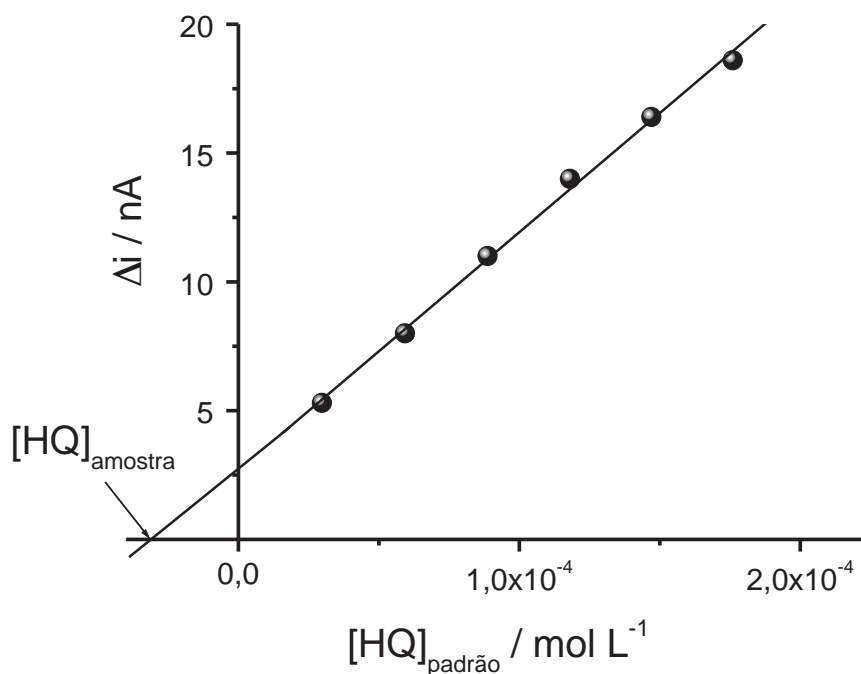


Figura 31. Curva analítica da adição de padrão para a amostra magistral, preparada conforme solicitação dos autores deste trabalho.

A outra amostra analisada foi de origem comercial da marca Clariderm[®] produzido pela indústria farmacêutica Stiefel[®], foram realizados os mesmos procedimentos de pré-tratamento descritos para a amostra magistral. A amostra de Clariderm[®] indica como valor rotulado também 2% de hidroquinona (m/m) para cada 50 g de creme.

Os resultados obtidos para estas duas amostras são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados obtidos em diferentes amostras cosméticas contendo Hidroquinona a 2% para cada 50 g de creme. Valor nominal de 1 g HQ / 50 g CREME.

Amostra	[HQ] na cela	Massa de HQ na amostra / g		Erro relativo/ %
		Real ^a ou nominal ^b	Encontrada	
Farmácia Magistral	$2,92 \times 10^{-5}$	^a 1,0	0,97 g	- 2,7
Clariderm [®]	$3,12 \times 10^{-5}$	^b 1	1,04 g	+ 4,0

Pelos resultados obtidos, pode-se observar que o sensor proposto mostrou resultados consistentes, validando a metodologia proposta para a análise de HQ em amostras comerciais e viabilizando seu uso em outros tipos de amostras, como ambientais ou industriais.

5. Conclusões e perspectivas futuras

Os excelentes resultados aqui obtidos viabilizam os eletrodos impressos de grafite modificados com solução de Nafion® e complexo de $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ como ferramentas a serem aplicadas em análises sensíveis e seletivas para detecção de HQ, o qual foi demonstrado na análise de formulações cosméticas e que poderá ser estendido à análise em amostras ambientais e efluentes industriais.

Por outro lado, as evidências experimentais mostradas neste trabalho, sugerem que o complexo $[\text{Cu}(\text{dipy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, comporta-se como um catalisador biomimético da tirosinase na catálise de HQ.

Futuramente, a proposta é acoplar o sensor a sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) visando aplicação em amostras ambientais e efluentes *in situ*.

Referências Bibliográficas

- 1 FREIRE, R. S.; ROSSATO, S. S.; KUBOTA, L.T.; DURAN, N. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.
2. CENTRO DE CAPACITAÇÃO E PESQUISA EM MEIO AMBIENTE (CEPEMA). *Relatório anual do CEPEMA de 2008*. Disponível em: <http://www.cepema.usp.br/novosite/wp-content/uploads/2009/11/Relatorio_CEPEMA_2008.pdf>. Acesso em: 11 julho 2010
- 3 SALEH AHAMMAD, A.J.; SARKER, S.; RAHMAN, A.; Lee, J.J. Simultaneous Determination of Hydroquinone and Catechol at an Activated Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis* v. 22, n. 6, p. 694-700, March 2010.
- 4 FRIZON, T. *Comportamento molecular da Hidroquinona em preparações farmacêuticas*. 2010. 45 f. Dissertação (Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica) – Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2010.
- 5 PANICO R.; POWELL W.H.; RICHER J.C. (ed.). INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, COMMISSION ON NOMENCLATURE OF ORGANIC CHEMISTRY (1993). *A guide to IUPAC nomenclature of organic compounds: recommendations 1993*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- 6 MINISTÉRIOS DA ECONOMIA E DA SAÚDE. Portaria nº 1192/97 de 22 de novembro de 1997. Altera a Portaria n.º 503/94, de 6 de Julho (define os métodos de análise necessários ao controlo da composição dos produtos cosméticos e de higiene corporal e respectivas matérias-primas). *Diário da República*, n. 271, s. I-B, Brasília, 22 de nov. 1997. Disponível em: <<http://www.dre.pt/cgi/dr1s.exe>. Acesso em: 06 de julho 2011.
- 7 SOTOMAYOR, M.D.P.T.; TANAKA, A.A.; KUBOTA, L.T. Development of an enzymeless biosensor for the determination of phenolic compounds. *Anal. Chim. Acta*, v. 455, n. 2, p. 215-223, 2002.
- 8 DAMOS, F.S.; SOTOMAYOR, M.D.P.T.; KUBOTA, L.T.; TANAKA, S.M.C.N.; TANAKA, A.A. Iron (III) tetra (*N*-methyl-4-pyridyl)-porphyrin as a biomimetic catalyst of horseradish peroxidase on the electrode surface: an amperometric sensor for phenolic compounds determinations. *Analyst*, London, v. 128, p. 255-259, Feb. 2003.
- 9 SOTOMAYOR, M.D.P.T.; SIGOLI, A.; LANZA, M.R.V.; TANAKA, A.A.; KUBOTA, L.T. Construction and application of an electrochemical sensor for paracetamol determination based on iron tetrapyrroline as a biomimetic catalyst of P450 enzyme. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 734-743, 2008.

- 10 SOTOMAYOR, M.D.P.T.; TANAKA, A.A.; KUBOTA, L.T. Development of an amperometric sensor highly selective for dopamine and analogous compounds determination using bis(2,2'-bipyridil) copper(ii) chloride complex. *Electroanalysis*, New York, v. 15, n. 9, p. 787-796, 2003.
- 11 SOTOMAYOR, M.D.P.T.; TANAKA, A.A.; KUBOTA, L.T. Tris(2,2'-bipyridil) copper (II) chloride complex: a biomimetic tyrosinase catalyst in amperometric sensor construction. *Electrochimica Acta*, v. 48, n. 7, p. 855-865, Feb. 2003.
- 12 SOTOMAYOR, M.D.P.T.; TANAKA, A.A.; KUBOTA, L.T. Development of an amperometric sensor for phenol compounds using a nafion membrane doped with copper dipyrindyl complex as a biomimetic catalyst. *J. Electroanal. Chem.*, v. 536, n. 1-2, p. 71-81, Nov. 2002.
- 13 SCHMIDT, H.-L.; GUTBERLET, F.; SCHUHMANN, W. New principles of amperometric enzyme electrodes and of reagentless oxidoreductase biosensors. *Sens. Actuators B*, v. 13, n. 1-3, p. 366-371, Maio 1993.
- 14 LIU, H.; YING, T.; SUN, K.; LI, H.; QI, D. Reagentless amperometric biosensors highly sensitive to hydrogen peroxide, glucose and lactose based on *N*-methyl phenazine methosulfate incorporated in a Nafion film as an electron transfer mediator between horseradish peroxidase and an electrode. *Analytica Chimica Acta*, v. 344, n. 3, p. 187-199, Jun. 1997.
- 15 OKAWA, Y.; NAGANO, M.; HIROTA, S.; KOBAYASHI, H.; OHNO, T.; WATANABE, M. Tethered mediator biosensor. Mediated electron transfer between redox enzyme and electrode via ferrocene anchored to electrode surface with long poly(oxyethylene) chain. *Biosens. Bioelectron.*, v. 14, n. 2, p. 229-235, Feb. 1999.
- 16 LÖTZBEYER, T.; SCHUHMANN, W.; SCHMIDT, H.L.; Electron transfer principles in amperometric biosensors: direct electron transfer between enzymes and electrode surface. *Sens. Actuators B*, v. 33, n. 1-3, p. 50-54, Jul. 1996.
- 17 LÖTZBEYER, T.; SCHUHMANN, W.; SCHMIDT, H.L.; Minizymes. A new strategy for the development of reagentless amperometric biosensors based on direct electron-transfer processes. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, v. 42, n. 1, p. 1-6, Abr. 1997.
- 18 SOTOMAYOR, M.D.P.T.; KUBOTA, L.T. Enzymeless biosensors : uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 123-128, 2002.
- 19 SOTOMAYOR, M.D.P.T.; TANAKA, A.A.; FREIRE, R.S.; KUBOTA, L.T. Amperometric Sensors based on Biomimetic Catalysts. In *Encyclopedia of Sensors*. California: American Scientific Publishers, 2006. Volume 1, cap. A, p. 195-210.

- 20 BRESLOW, R.; Biomimetic control of chemical selectivity. *Acc. Chem. Res.*, v. 13, n. 6, p. 170-177, 1980.
- 21 BRESLOW, R. Biomimetic chemistry and artificial enzymes - catalysis by design. *Acc. Chem. Res.*, v. 28, n. 3, p. 146-153, Mar. 1995.
- 22 D´SOUZA, V.T.; BENDER, M.L Miniature Organic Models of Enzymes. *Acc. Chem. Res.*, v. 20, n. 4, p. 146-152, 1987.
- 23 MURAKAMI, Y.; KIKUCHI, J.; HISAEDA, Y.; HAYASHIDA, O. Artificial Enzymes. *Chem. Rev.*, v. 96, n. 2, p. 721-758, Mar.1996.
- 24 BRESLOW, R.; OVERMAN, L.E. "Artificial enzyme" combining a metal catalytic group and a hydrophobic binding cavity. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 92, p. 1075-1077, Feb. 1970.
- 25 HISAEDA, Y.; KIHARA, E.; NISHIOKA, T. Nonenzymic reactions mediated by vitamin B12 artificial enzyme. *J. Inorg. Biochem.*, v. 67, n. 1-4, p. 235, Jul. - Set. 1997.
- 26 MURAKAMI, Y.; AOYAMA, Y.; KIKUSHI, J.I. Syntheses of macrocyclic enzyme models. Part 5. Preparation and metal-co-ordination behaviour of [20]paracyclophane bearing 1,4-dihydropyridinamide and pyridine-2-carboxylic acid moieties as an alcohol dehydrogenase model. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, v. 11, p. 2809-2815, 1981
- 27 KAJIKI, T.; MORIYA, H.; HOSHINO, K.; KUROI, T.; KONDO, S.; NABESHIMA, T.; YANO, Y. Functionalized Flavin Receptors. Regulation of Redox Properties of 6-Azaflavin via Hydrogen Bondings with Melamine Derivatives Bearing Guanidinium Ion(s) in Organic Solvents. *J. Org. Chem.*, v. 64, p. 9679-9689, Dec. 1999.
- 28 LEHN, J.M. Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture). *Angew. Chem., Int. Ed.*, v. 27, n. 1, 89-112, Jan. 1988.
- 29 BERGAMINI, M.F.; OLIVEIRA, F.C.M., ZANONI, M.V.B. Análise voltamétrica do corante têxtil do tipo antraquinona empregando eletrodos de carbono impresso. *Eclética Química*, v. 30, n. 2, 53-59, 2005.
- 30 LUO, P.; XIE, G.; LIU, Y.; XU, H.; DENG, S.; SONG, F. Electrochemical detection of blood alcohol concentration using a disposable biosensor based on screen-printed electrode modified with Nafion and gold nanoparticles. *Clin Chem Lab Med*, v. 46, p. 1641-1647, 2008.
- 31 MEYER, R.J., *Gmelins Handbuch der Anorganischen Chemie*, Berlin: Springer-Verlag, 1958. 60 p.

- 32 SOLOMON, E.I.; SUNDARAM, U.M.; MACHONKIN, T.E.; Multicopper Oxidases and Oxygenases, *Chem. Rev.*, v. 96, p. 2563-2606, Nov. 1996.
- 33 RILEY, P.A. Tyrosinase Kinetics: A Semi-quantitative Model of the Mechanism of Oxidation of Monohydric and Dihydric Phenolic Substrates. *J. Theor. Biol.* v. 203, n. 1, p. 1-12, Mar. 2000.
- 34 MARKO-VARGA, G.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; RUZGAS, T.; Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds, *Trends Anal. Chem.*, v. 14, n. 7, p. 319-328, Aug.1995.
- 35 MATOBA, Y.; KUMAGAI, T.; YAMAMOTO, A.; YOSHITSU, H.; SUGIYAMA, M. Crystallographic Evidence That the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase Is Flexible during Catalysis. *JBC Papers in Press*, v. 281, n. 13, p. 8981-8990, Jan. 2006.
- 36 SOLOMON, E.I.; SUNDARAM, U.M.; MACHONKIN, T.E.; Multicopper Oxidases and Oxygenases, *Chem. Rev.*, v. 96, p. 2563-2606, Nov. 1996.
- 37 FONTECAVE, M.; PIERRE, J.-L. Oxidations by copper metalloenzymes and some biomimetic approaches, *Coord. Chem. Rev.*, v. 170, n. 1, p. 125-140, Mar. 1998.
- 38 WILCOX, D.E.; PORRAS, A.G.; HWANG, Y.T.; LERCH, K.; WINKLER, M.E.; SOLOMON, E.I. Substrate analog binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. *J. Am Chem. Soc.*, v. 107, n. 13, p. 4015–4027, Jun. 1985. 4015.
- 39 P. Luo, G. Xie, Y. Liu, H. Xu, S. Deng, F. Song, Electrochemical detection of blood alcohol concentration using a disposable biosensor based on screen-printed electrode modified with Nafion and gold nanoparticles *Clin Chem Lab Med*, v. 46, n. 11, p. 1641-1647, 2008.
- 40 RODRIGUEZ, M.O.; FLURKEY, W.H.; A biochemistry project to study mushroom tyrosinase: Enzyme localization, isoenzymes, and detergent activation. *J. Chem. Educ.*, v. 69, n. 9, p. 767-769, Set. 1992.
- 41 MURPHY, L.; Biosensors and bioelectrochemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v. 10, n. 2, p. 177-184, Abril 2006.
- 42 ZHANG, S.; WRIGHT, G.; YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosens. Bioelectron.*, v. 15, n. 5-6, p. 273-282, Agosto 2000.
- 43 MENDES, R. K. *Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização em monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor*. 2006. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

- 44 CUNNINGHAM, A.J. *Introduction to Bioanalytical Sensor*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998.
- 45 LOJOU, E.; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. *J. Electroceram.* v. 16, n. 1, p. 79-91, Feb. 2006.
- 46 NISTOR, C.; EMNÉUS, J. Bioanalytical tools for monitoring polar pollutants. *Waste Management*, v. 19, n. 2, p. 147-170, Ab. 1999.
- 47 ZHANG, S.; WRIGHT, G.; YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosens. Bioelectron.*, v. 15, n. 5-6, p. 273-282, Agosto 2000.
- 48 FREIRE, R.S.; DURÁN, N.; Kubota, L.T. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. *Talanta*, v. 54, n. 4, p. 681-686, Maio 2001.
- 49 CRAM, D.J. The Design of Molecular Hosts, Guests, and Their Complexes (Nobel Lecture). *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* v. 27, n. 8, p. 1009–1020, 1988.
- 50 MURAKAMI, Y.; AOYAMA, Y.; KIKUSHI, J. SYNTHESSES OF MACROCYCLIC ENZYME MODELS .5. Preparation And Metal-Coordination Behavior Of [20]Paracyclophane Bearing 1,4-Dihydronicotinamide And Pyridine-2-Carboxylic Acid Moieties As An Alcohol-Dehydrogenase Model. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* v. 11, p. 2809-2815, 1981.
- 51 BRESLOW, R.L.; OVERMAN, E. "Artificial enzyme" combining a metal catalytic group and a hydrophobic binding cavity. *J. Am. Chem. Soc.* v. 92, n. 4, p. 1075-1077, Feb. 1970.
- 52 IKEDA, H.; HORIMOTO, Y.; NAKATA, M.; UENO, A. Artificial holoenzymes for benzoin condensation using thiazolio-appended β -cyclodextrin dimers. *Tetrahedron Lett.* v. 41, n. 33, p. 6483-6487, Aug. 2000.
- 53 HASEBE, Y.; AKIYAMA, T.; YAGISAWA, T.; UCHIYAMA, S. Enzyme-less amperometric biosensor for L-ascorbate using poly-L-histidine-copper complex as an alternative biocatalyst. *Talanta*, v. 47, n. 5, p. 1139-1147, Dec.1998.
- 54 KIKUSHI, J.; THANG, Z.; Murakami, Y. Enantioselective Catalysis by Supramolecular Bilayer Membrane as Artificial Aminotransferase. *Chem. Lett.* v. 23, n. 8, p. 1559, 1994.
- 55 KITAJIMA, N.; Synthetic Approach to the Structure and Function of Copper Proteins. *Adv. Inorg. Chem.* v. 39, p. 1-77, 1992.
- 56 FERNANDES, J.C.B.; ROVER, L.; OLIVEIRA NETO, G.; KUBOTA L.T. Development of a New FIA-potentiometric sensor for dopamine based on EVA-Copper (II) ions. *J. Electroanal. Chem.* v. 481, n. 1, p. 34-44, 2000.

- 57 D. A. Rockcliffe, A. E. Martell, *Inorg. Chem.* 32 (1993) 3143.
- 58 P. M. Ngwenya, D. Chen, A. E. Martell, J. Reibenspies, *Inorg. Chem.* 30 (1991) 2732.
- 59 BRESLOW, R. Centenary Lecture - Biomimetic Chemistry. *Chem. Soc. Rev.*; v. 1, n. 4, p. 553-580, 1972.
- 60 BRESLOW, R. Biomimetic Chemistry. *Pure & Appl. Chem.*, v. 66, n. 8, p. 1573-1582, 1994.
- 61 BRESLOW, R.; WINNIK, M. A. Remote Oxidation Of Unactivated Methylene Groups. *Journal of the Am. Chem. Soc.* v. 11, n. 91, p. 3083, 1969.
- 62 B. I. Kurganov, I. N. Topchieva, *Biochemistry-Moscow*, 56 (1991) 1374.
- 63 KATAKY, R.; MORGAN, E. Potential Of Enzyme Mimics In Biomimetic Sensors: A Modified-Cyclodextrin As A Dehydrogenase Enzyme Mimic. *Biosens Bioelectron.* v. 11, n. 18, p. 1407-17, 2003.
- 64 OKAMOTO, S. *Utilização de diferentes tipos de imobilização da enzima oxalato oxidase na construção de biossensores.* 1996. 144 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1996.
- 65 BRESLOW, R; ZHANG, B. Very Fast Ester Hydrolysis by a Cyclodextrin Dimer with a Catalytic Linking Group. *J. Am. Chem. Soc.* v. 114, p. 5882-5883, 1992.
- 66 BRESLOW, R.; CHIPMAN, D. Mixed Metal Complexes as Enzyme Models. I. Intracomplex Nucleophilic Catalysis by an Oxime Anion. *J. Amer. Chem. Soc.* v. 87, p. 4195-4196, 1965.
- 67 BRESLOW, R. Bioorganic chemistry: A natural and unnatural science. *J. Chem. Educ.* v. 75, n. 6, p. 705-718, 1998.
- 68 HALCROW, M. A.; CHRISTOU, G. Biomimetic chemistry of nickel. *Chem. Rev.*, v. 94, p. 2421-2481, 1994.
- 69 OKAMOTO, S. *Utilização de diferentes tipos de imobilização da enzima oxalato oxidase na construção de biossensores.* 1996. 144 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1996.
- 70 LEHNINGER, L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica.** São Paulo, Sarvier, ed. 3, p. 157, 1995.
- 71 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, D.O.U. 02/06/2003: guia para validação de*

métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em 24/07/2011.

72 ANDRIEUX, C. P.; SAVÉANT, J. P. Heterogeneous (chemically modified, electrode polymer electrodes) vs. homogeneous catalysis of electrochemical reactions. *J. Electroanal. Chem.* v. 93, p. 163, 1978.